

93 - 97E

CODIGO 090734504

# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

---

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS  
BIOLOGICAS Y AGROPECUARIAS  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



POTENCIALIZACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD  
ANTIVIRAL CONTRA EL VIH DE LA ZIDOVUDINA,  
DIDANOSINA, SULFATO DE INDINAVIR Y SAQUINAVIR  
MEDIANTE EL BEL 222142

## TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

## LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A

**MARTHA ESCOTO DELGADILLO**

DIRECTOR: M en C EDUARDO VÁZQUEZ VALLS

ZAPOPAN, JALISCO. ENERO DE 1999



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS  
DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**C. MARTHA ESCOTO DELGADILLO**  
**P R E S E N T E.**

Manifestamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de TESIS " **POTENCIALIZACION IN VITRO DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL CONTRA EL VIH DE LA ZIDOVUDINA, DIDANOSINA, SULFATO DE INDINAVIR Y SAQUINAVIR MEDIANTE EL BEL 222142** " para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicho trabajo al **M. EN C. EDUARDO VAZQUEZ VALLS.**

**A T E N T A M E N T E**  
**" PIENSA Y TRABAJA "**  
**"AÑO HOSPITAL CIVIL DE GUADALAJARA"**  
**Las Agujas, Zapopan, Jal., Mayo 7 de 1997**

**M. EN C. ARTURO OROZCO BAROCIO**  
**PRESIDENTE DEL COMITE DE TITULACION**

**C.U.C.B.A**

**M. EN C. JOSE LUIS NAVARRETE HEREDIA**  
**SECRETARIO DEL COMITE DE TITULACION**



c.c.p. **M.C. EDUARDO VAZQUEZ VALLS.-** Director del Trabajo.  
c.c.p. El expediente del alumno.

**DIV. DE CS.**  
**BIOLÓGICAS Y**  
**AMBIENTALES**

**AOB/JLNH/memn\***

C. M. C. ARTURO OROZCO BAROCIO.  
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITILACIÓN  
DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES  
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA  
P R E S E N T E.

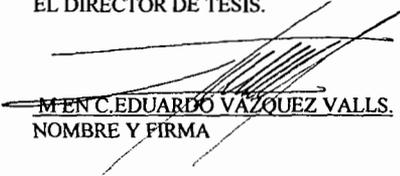
Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó el (la) pasante:

**MARTHA ESCOTO DELGADILLO** Código **090734504** con el título :  
**POTENCIALIZACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL CONTRA EL VIH DE LA ZIDOVUDINA, DIDANOSINA, SULFATO DE INDINAVIR Y SAQUINAVIR MEDIANTE EL BEL 222142**, consideramos que ha quedado concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para la autorización de impresión y en su caso programación de fecha de exámenes de tesis y profesional respectivos.

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva brindar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

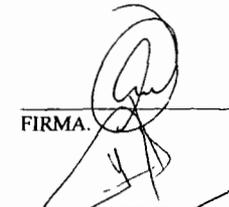
A T E N T A M E N T E.  
LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JALISCO A 14 DE ENERO DE 1999.

EL DIRECTOR DE TESIS.

  
M. EN C. EDUARDO VAZQUEZ VALLS.  
NOMBRE Y FIRMA

SINODALES.

1.- DR. EN C. ARTURO OROZCO BAROCIO.  
NOMBRE COMPLETO

  
FIRMA.

2.- M. EN C. ALFONSO ENRIQUE ISLAS RODRIGUEZ.  
NOMBRE COMPLETO

  
FIRMA.

3.- DR. SERGIO AGUILAR BENAVIDES.  
NOMBRE COMPLETO

  
FIRMA.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Inmunodeficiencias y Retrovirus Humanos, en la división de Inmunología del Centro de Investigación Biomédica de Occidente, Centro Medico Nacional de Occidente del Instituto Mexicano del Seguro Social en Guadalajara Jalisco.

TESISTA MARTHA ESCOTO DELGADILLO.

DIRECTOR DE TESIS M en C EDUARDO VAZQUEZ VALLS.

## AGRADECIMIENTOS.

A mis Papas Lourdes y Pepe, a mis Hermanos Lulu, Chacho y Vero, por todo el apoyo y amor que recibo de ellos.

A mi tío José y mi tía Amelia, por el apoyo que recibí de ellos.

A mi abuelito y a mi tía Coco, por sus consejos y su amor.

A Eduardo, por su paciencia y su cariño.

A mis grandes amigas, Lili, Elia, Magaly y Edith, por la amistad que me brindan y el cariño que he recibido de ellas.

A mis amigos y compañeros de laboratorio Mary, Julio y Paco por su ayuda.

A Blanca y a Katy por su amistad y ayuda en la realización de éste trabajo.

Un especial agradecimiento al Dr. Eduardo por la oportunidad, la paciencia y la confianza que deposito en mi, por guiarme en la realización de éste trabajo y por todos los conocimientos he recibido de él.

# INDICE

I. INTRODUCCION.....	1
II. ANTECEDENTES.....	2
PATOGENESIS DE LA INFECCION DEL VIH.....	3
ESTRUCTURA DEL VIH.....	6
CICLO DE REPRODUCCION.....	8
ETAPAS DE LA INFECCION.....	11
DEFINICION DE SIDA PARA ADOLESCENTES Y ADULTOS.....	13
CARGA VIRAL.....	14
ANTIGENO p24.....	17
TRATAMIENTOS.....	18

a) INHIBIDORES DE LA TRANSCRIPTASA REVERSA..	18
ANALOGOS DE LOS NUCLEOSIDOS.....	19
NO NUCLEOSIDOS.....	21
b) INHIBIDORES DE LAS PROTEASAS.....	22
c) BEL222142.....	24
CITOCINAS Y ENFERMEDAD POR VIH.....	26
III. JUSTIFICACION.....	33
IV. OBJETIVOS.....	34
V. HIPOTESIS.....	35
VI. CRITERIOS DE INCLUSION Y EXCLUSION.....	36
VII. MATERIAL Y METODO.....	37

VIII. RESULTADOS.....	48
IX. DISCUSION.....	60
X. CONCLUSIONES.....	63
XI. BIBLIOGRAFIA.....	65

## I. INTRODUCCION.

Desde que aparece el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), se han hecho diversos esfuerzos por detener la replicación del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) y por lo tanto la propagación de la enfermedad. Para ello se han usado diferentes fármacos, entre ellos, destacan los análogos de los nucleósidos y no nucleósidos de la Transcriptasa Reversa, los inhibidores de las proteasas y una serie de fármacos experimentales que aun queda por demostrar su efectividad; sin embargo, todos ellos al estar encaminados a controlar al virus, han dejado a un lado parcialmente la recuperación del sistema inmune.

Se conoce que entre otras células del organismo, Los linfocitos T cooperadores CD4+ (T CD4+), coordinadores de la respuesta inmune celular e indirectamente humoral, son las células más afectadas por el VIH, principalmente al verse disminuidas tanto en cantidad como en la producción de algunas de la citocinas que median la respuesta inmune, como las, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10 y TNF  $\alpha$ , entre otras.

En esta tesis se pretende evaluar *in vitro* el uso de una combinación de citostáticos y mediadores de la respuesta inmune, en presencia o ausencia de fármacos antiretrovirales, con el objeto de identificar si mejora la respuesta inmune, expresada ésta, en términos de proliferación linfocítica.

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

## II. ANTECEDENTES

A pesar de la intensa investigación sobre el SIDA, queda mucho por aprender acerca de la serie de eventos que se llevan a cabo durante la infección por el VIH, cuyo curso y resultado está determinado por la interacción entre el virus y los factores del huésped, influenciado por agentes adicionales o cofactores. Un aspecto a considerar durante este periodo de la enfermedad, es la replicación viral en varios eventos post-infección, matizada por la naturaleza y la efectividad de la respuesta inmune del huésped (1).

El primer caso de SIDA del mundo fue reportado en 1981, pero no fue sino hasta 1983, que el agente etiológico fue aislado y parcialmente caracterizado como un retrovirus al que llamaron: Virus Asociado a la Linfadenopatía o Virus Linfotrópico Humano de Células T, mismo que a partir de 1986 se conoce como Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

Ahora se conocen 5 especies de retrovirus Humanos: Virus Linfotrópico de Células T (HTLV) tipo I, HTLV tipo II, VIH-1, VIH-2 y Espumavirus Humano (2).

De los cuales sólo el VIH 1 y 2 están asociados a la enfermedad del SIDA.

## PATOGENESIS DE LA INFECCION DEL VIH.

El desarrollo del SIDA es el resultado de la progresión crónica de la infección por el VIH. Aunque cada individuo VIH positivo tiene un diseño único de progresión de la enfermedad en función de su estado nutricional, reinfecciones, integridad del sistema inmune, propiedades del virus, acceso a medicamentos, sexo (masculino o femenino), etc; todos ellos cursan en lo general con una historia natural de la enfermedad que se agudiza entre los 8 y 11 años, a partir de la infección inicial.

La disminución progresiva de los linfocitos T CD4+ en el síndrome de inmunodeficiencia humana, se debe al tropismo que tiene el VIH por el receptor CD4+. Estos linfocitos interactúan con las células presentadoras de antígeno (CPA), células B, células T citotóxica y natural killer entre otras, por lo que resulta fácil entender que la infección y posterior disminución de los linfocitos T CD4+, puede inducir una inmunodeficiencia severa (3).

Los mecanismos propuestos para explicar la desregulación inmune y pérdida de las células T por VIH incluye a:

- Defectos en las CPA
- Efectos tanto de inmunosupresión como de inmunoestimulación.
- Coinfecciones
- Producción de citocinas (4).

La infección inicial con VIH puede ser seguida por una enfermedad aguda, similar a una infección de mononucleosis infecciosa. Durante el inicio de la infección, aparecen niveles altos de replicación, el Antígeno p24 (Ag. p24), puede ser fácilmente detectable y el virus puede ser aislado de la sangre. La replicación del VIH se asocia con el número de linfocitos CD4+ muertos, aunque en la infección temprana la habilidad para producir nuevos linfocitos CD4+, hace que se mantengan los niveles de estas células dentro del rango normal. Una consecuencia de la infección es que se provee de un sitio de replicación viral continua en los ganglios linfáticos (1, 5-6).

Seguida de la infección inicial, los individuos entran en un estado de latencia clínica, llamado periodo asintomático, durante el cual el número de células CD4+ quedan dentro de un rango normal y poco a poco decrecen con el paso del tiempo. Comparada con la infección inicial, la replicación viral está marcadamente disminuida, esta disminución en la viremia se asocia con la inmunidad humoral y celular del huésped.

El progreso de la infección sintomática, se caracteriza por manifestaciones clínicas no específicas, tales como linfadenopatía, diarrea, pérdida de peso, infección por Cándida. La progresión clínica, que define al SIDA se caracteriza por la dramática pérdida de los linfocitos CD4+ y el desarrollo de enfermedades oportunistas y malignas.

En síntesis, acompañando el desarrollo del SIDA se observa un incremento en la replicación viral asociada con la pérdida efectiva de la respuesta inmune contra el VIH (1, 4, 5-6).

## ESTRUCTURA DEL VIH.

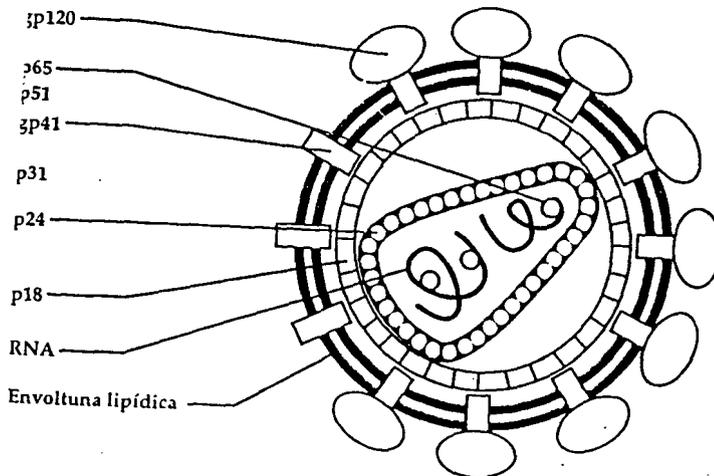
Como todos los virus, el VIH es un parásito intracelular; es decir, la partícula no puede propagarse o hacer daño alguno hasta que entra a la célula huésped. Pertenece a la subfamilia de los retrovirus que se caracterizan por tener periodos largos de infección asintomática.

El virión del VIH es una esfera que transversalmente mide unos 1000 Angstrom. Tiene una estructura icosaédrica. La partícula está recubierta por una membrana formada por dos capas de material lipídico. La membrana con 72 puntas está compuesta por glucoproteínas (gp), cada una de las cuales posee dos componentes, gp 41 que atraviesa la membrana, y la gp 120 que sobresale de ella.

En el interior del virión, se encuentran las proteínas p15, p18 y p24 en forma cilíndrica englobando al núcleo, constituido éste por dos moléculas de ARN, con 9.7 kb de nucleótidos. También se encuentran tres importantes enzimas: a) la enzima Transcriptasa reversa, cuyo trabajo es copiar el ARN a ADN de doble cadena, b) la enzima integrasa, la cual toma la doble cadena de ADN y la integra a los cromosomas de la célula huésped, y c) la proteasa, que se encarga de ensamblar las proteínas del virus (7-8).

## ESTRUCTURA DEL VIH

Gen del virus	Producto génico
env:	gp160 ( precursor de la proteína env) gp120 (proteína env exterior) gp41 (proteína transmembranal)
pol:	p65 (transcriptasa reversa) p51 (transcritasa reversa) p31 (endonucleasas)
gag:	p55 (precursor de la proteína del núcleo) p24 (núcleo) p18 (núcleo)



## CICLO DE REPRODUCCION VIRAL.

El primer paso de la infección es la unión de la partícula viral, por medio de la gp 120 del VIH, a la molécula de superficie CD4+ de la célula huésped, presente en la membrana de linfocitos T cooperadores y en menor cantidad en células mononucleares fagocíticas.

Cuando se realiza la unión, hay una fusión de membranas del virus y la célula que permite la entrada del material del virus constituido por ARN y la enzima transcriptasa reversa, entonces el virus rápidamente pierde su envoltura.

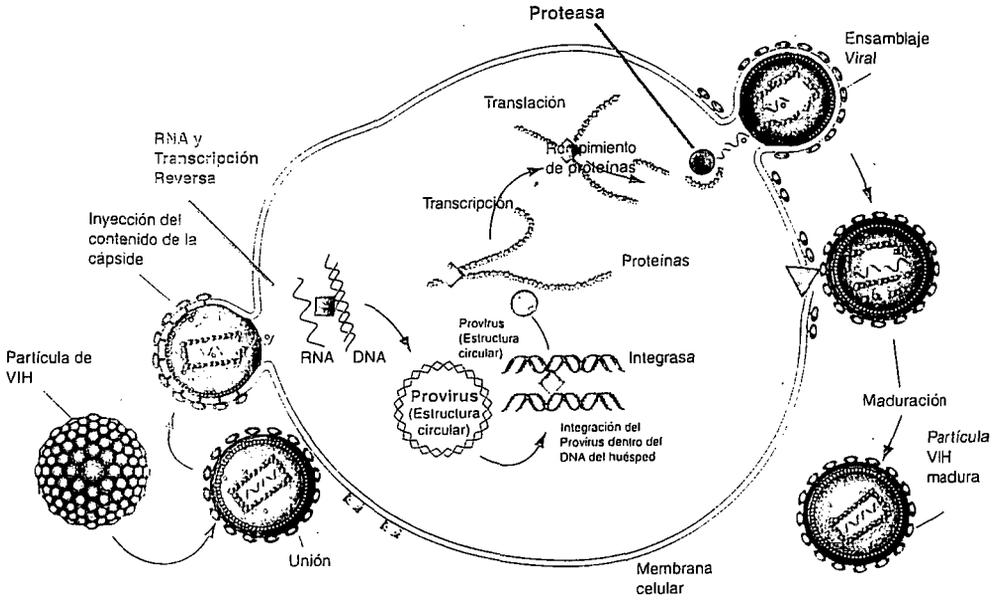
La transcriptasa reversa toma como molde el ARN viral, para sintetizar ADN de hebra sencilla, el cual es complementario al ARN; Una vez que ha sido sintetizada la cadena sencilla, esta es tomada por la misma enzima para construir una cadena complementaria de ADN, esta pasa al núcleo y gracias a la integrasa virica se inserta en los cromosomas de la célula huésped.

El ADN viral integrado a los cromosomas de la célula huésped se le denomina **provirus**, aquí son transcritas las diferentes proteínas y genes. Estos genes contienen la información para sintetizar los componentes del virus.

El siguiente paso requiere factores del huésped para desempeñar la síntesis de proteínas virales, procesamiento del ARN viral y traslación del ARNm a los

ribosomas del huésped. La señal para la iniciación de la transcripción se encuentra en el extremo 5' de la región LTR (long terminal repeat), la cual está formada por duplicación del extremo terminal del genoma del virus durante la transcripción reversa.

Una vez que ha sido sintetizado el ARN, este pasa al citoplasma, donde los ribosomas lo reconocen y se inicia la traducción del mensaje, sintetizadas las proteínas, estas junto con el ARN viral son ensamblados para formar nuevos virus, y son liberados por unión a través de la membrana de superficie de la célula para iniciar otro ciclo de infección (7, 9).



Adaptado de *HIV/AIDS Handbook*, Total Learning Concepts, Boston, Mass., 1995

## ETAPAS DE LA INFECCION POR EL VIH

Como se mencionó la enfermedad del VIH esta dividida en cuatro etapas o fases:

### 1.- Fase de infección aguda.

Se refiere particularmente al periodo comprendido desde que el VIH ingresa al organismo de una persona, hasta la formación de anticuerpos específicos contra el VIH, esta etapa es por lo regular de 8 a 12 semanas y en la mayoría de los casos puede pasar inadvertida o con manifestaciones clínicas que pueden semejar las de un resfriado.

### 2.- Fase de infección asintomática.

Etapa después de la seroconversión hasta que aparecen los primeros síntomas y signos de la inmunodeficiencia, puede extenderse hasta más de 10 años.

### 3.- Linfadenopatía Generalizada Persistente.

Durante ésta etapa se presenta una inflamación de los ganglios linfáticos, como un signo evidente de que se encuentra activamente trabajando para contrarrestar la infección viral por el VIH; es posible que aquí se presenten las primeras manifestaciones como fiebres ocasionales, diarreas de corta

duración, sudoraciones nocturnas, pérdida de peso o dificultad para ganar peso, fatiga, etc.

#### 4.- Fase SIDA.

Esta etapa constituye la última etapa de la infección por el VIH, se relaciona con la presencia de enfermedades sistémicas como el Síndrome de Desgaste y una serie de infecciones oportunistas, es decir aquellas producidas por agentes extraños al organismo que ante un sistema inmunocompetente, no produce ninguna enfermedad, pero que ante un sistema inmunocomprometido, aprovecha la oportunidad para producir enfermedad; estas enfermedades pueden ser tan graves que generalmente ocasionan la muerte de las personas en etapas tardías de SIDA. En esta etapa final es posible que se presenten algunos tipos de neoplasias como el Sarcoma de Kaposi (10).

## DEFINICION DE SIDA PARA ADOLESCENTES Y ADULTOS

La clasificación se basa en la cuantificación de linfocitos CD4, en el manejo clínico de las personas infectadas por el VIH.

### SISTEMA DE CLASIFICACION

CATEGORIAS DE CELULAS CD4+	CATEGORIAS CLINICAS		
	A	B	C
1) $\geq 500/\text{mm}^3$	A1	B1	C1*
2) 200-499/ $\text{mm}^3$	A2	B2	C2*
3) $< 200/\text{mm}^3$	A3*	B3*	C3*

\*Deben reportarse como SIDA.

### CATEGORIAS CLINICAS

Categoría Clínica A	Categoría Clínica B	Categoría Clínica C
<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Infección asintomática por VIH.</li> <li>◆ Linfadenopatía Generalizada persistente.</li> <li>◆ Nódulos en más de 2 sitios extrainguales, por lo menos de 1 cm de diámetro durante <math>\geq 3</math> meses).</li> <li>◆ Enfermedad aguda primaria por VIH.</li> </ul>	<p>Síntomas atribuidos a infección por VIH o tener curso clínico o manejo complicado por VIH y sin trastornos enlistados en las categorías A o C ej.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Angiomatosis bacilar</li> <li>◆ Candidiasis vulvovaginal: persistente <math>&gt; 1</math> mes con poca respuesta al tratamiento.</li> <li>◆ Candidiasis orofaríngea.</li> <li>◆ Displasia cervical, grave o carcinoma <i>in situ</i>.</li> <li>◆ Síndrome constitucional: ej. Fiebre (<math>38.5^\circ\text{C}</math>) o diarrea <math>&gt; 1</math> mes.</li> <li>◆ Leucoplaquia pilosa oral.</li> <li>◆ Herpes zoster, dos episodios distintos en más de un dermatoma.</li> <li>◆ Púrpura trombocitopénica idiopática.</li> <li>◆ Listeriosis</li> <li>◆ Neuropatía periférica.</li> </ul> <p>Enfermedad pélvica inflamatoria, si esta complicada por abscesos tubo-ováricos.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Candidiasis: esófago, traquea, bronquios.</li> <li>◆ Coccidioidomicosis extrapulmonar</li> <li>◆ Criptococosis extrapulmonar</li> <li>◆ Cáncer cervical invasor</li> <li>◆ Criptosporidiosis crónica intestinal (<math>&gt; 1</math> mes)</li> <li>◆ Retinitis por CMV, o CMV en lugares diferentes al hígado, bazo, ganglios.</li> <li>◆ Encefalopatía por VIH</li> <li>◆ Herpes simple con úlcera mucocutánea <math>&gt; 1</math> mes, bronquitis crónica, neumonía.</li> <li>◆ Histoplasmosis: diseminada, extrapulmonar</li> <li>◆ Isosporiasis crónica <math>&gt; 1</math> mes</li> <li>◆ Sarcoma de Kaposi</li> <li>◆ Linfoma: Burkitt, inmunoblástico, primario cerebral</li> <li>◆ <i>M. avium</i> o <i>M. Kansasi</i> extrapulmonar</li> <li>◆ Neumonía por <i>Pneumocystis carinii</i></li> <li>◆ Leucoencefalopatía multifocal progresiva.</li> <li>◆ Bacteremia por <i>Salmonella</i> recurrente</li> <li>◆ Toxoplasmosis cerebral</li> <li>◆ Síndrome de desgaste por VIH.</li> </ul>

(11)

## CARGA VIRAL

La cuantificación del número de copias del virus VIH existentes en el organismo por unidad de volumen de sangre es llamada comunmente carga viral y es útil para:

- a) Monitorear la efectividad de los medicamentos.
- b) Evaluar la progresión de la enfermedad.

Existe una clara asociación entre el incremento de la cantidad de virus y la progresión clínica (9)

En la etapa de **infección aguda** hay niveles de virus circulando y la respuesta inmune del huésped reprime la cantidad dentro de 4 – 8 semanas. A pesar de la baja de virus circulante, sigue habiendo replicación viral en el tejido linfoide, durante el **estado de latencia** clínica de la enfermedad (9, 12).

Como resultado de un incremento en la replicación viral, hay una disminución de la cantidad de Linfocitos T CD4+ y un aumento aparente en los CD8+, que ocurre relativamente tarde en el proceso de la enfermedad (9, 13, 14). Los cambios en las cuentas de CD4+ / CD8+ solamente indican el estadio de la enfermedad y la respuesta del huésped, mientras que la carga viral indica la actividad de la enfermedad (15-19).

Mientras más baja sea la carga viral, mayor será el tiempo que transcurra a SIDA y mayor el tiempo de sobrevida, por el contrario mientras más elevada sea la carga viral, menor será el tiempo transcurrido a SIDA y menor el tiempo de sobrevida (13).

Los marcadores inmunológicos y virológicos que se han usado tentativamente para entender la historia natural de la infección y para valorar la eficacia de tratamientos antivirales y vacunas, son: 1) Las cuentas de los Linfocitos CD4+ / CD8+, que se usan para evaluar el riesgo de la destrucción inmune, sin embargo, no es un buen marcador para predecir la respuesta clínica de la terapia antiviral, 2) El producto del gen gag del VIH, la proteína 24 (p24), que es una de las primeras moléculas detectables en circulación; aunque la correlación entre la antigenemia de p24 en sangre y el estado de la enfermedad está bien establecida, la falta de detección del Antígeno p24 (Ag p24) en pacientes asintomáticos y sintomáticos limita el uso de esta prueba. (12,15-20).

El control de la carga viral permite a los pacientes hacer decisiones más tempranas sobre el tratamiento, antes de sufrir una pérdida significativa de sus Linfocitos T CD4+ y mucho antes de experimentar el deterioro clínico (13).

Al interpretar los resultados de la carga viral, es importante hacer notar que sólo los incrementos o las reducciones de 3 veces o más, son considerados

como cifras significativas que merecen el cambio o el inicio del régimen antiviral (13)

Aunque existen varios métodos para cuantificar la carga viral, parecen ser similarmente efectivos como indicadores de la eficacia del tratamiento. Mientras que los números absolutos no corresponden precisamente, cada técnica es muy constante en el tiempo y tiene un alto grado de correlación entre sí. Los efectos dependientes del tratamiento son comparables, independientemente de la técnica usada (15-19).

Los métodos utilizados para la cuantificar de la carga viral son:

**I. Antígeno p24:** Un componente de la partícula de VIH que se mide usando una técnica de ELISA de captura de antígeno.

**II. Viremia celular:** Medición del virus intracelular por medio de un ensayo de infectividad.

**III. ARN del VIH:** La prueba más sensible disponible mide fragmentos genómicos del VIH (15-21).

## ANTIGENO P24

Una de las pruebas usadas más comúnmente en la clínica para medir la infección del VIH-1 es el ensayo de la captura de antígeno p24. Este ensayo permite la detección de la infección VIH-1 antes que el desarrollo de anticuerpos, solamente en algunos individuos. Es útil como indicador pronóstico y ha sido valorado particularmente en el monitoreo de los efectos antivirales de agentes terapéuticos potenciales. Pacientes con Ag p24 positivos tienen un alto riesgo de progresar a SIDA más rápido que pacientes con Ag p24 negativo (22-24). Ag p24 es detectable en sangre en individuos infectados en la fase de infección aguda y en la última fase de la enfermedad (1, 10, 3).

El grupo clínico de estudios sobre SIDA (ACTG), sugiere que la baja de un 50% en la concentración de los niveles de p24, debe considerarse como respuesta positiva a la terapia; y si persisten elevados los niveles de p24 puede indicar la falta o pérdida de los efectos terapéuticos (24).

## TRATAMIENTOS.

El objetivo primario de la terapia contra el VIH es reducir rápido la replicación viral, permitiendo que se establezca o recupere la cuenta de células CD4+ del paciente (15-19).

Los tratamientos contra el VIH pueden dividirse en dos grupos; según la fase de replicación vírica en la que intervengan. Y son:

1.-Los inhibidores de la transcriptasa reversa (T.R.):

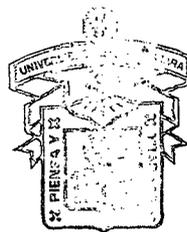
a) análogos de los nucleósidos.

b) no nucleósidos de la transcriptasa reversa.

2.-Los inhibidores de la proteasas.

(7)

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

### 1. INHIBIDORES DE LA ENZIMA TRANSCRIPTASA REVERSA.

Esta enzima tiene tres principales funciones dentro del ciclo viral:

- a) Forma el híbrido ADN-ARN
- b) Forma la doble cadena de ADN
- c) Destruye el ARN que ya fue transcrito

## Análogos de los nucleósidos.

Estos actúan tanto por inhibición competitiva, simulando los substratos naturales para la síntesis de ADN, como en la terminación de la cadena, impidiendo el agregado de nuevos nucleótidos a la creciente de ADN (25-28).

Los medicamento que actualmente están disponibles en el mercado son: Zidovudina (AZT), Didanosina (ddI), Zalcitavina (ddC), Stavudina (D4T), lamivudina (3TC).

### ZIDOVUDINA.

Fue el primer tratamiento desarrollado para la infección por VIH. Se ha demostrado que aumenta la sobrevida y disminuye la frecuencia y la gravedad de las infecciones oportunistas en los pacientes en etapas avanzadas del SIDA y disminuye el avance de la enfermedad en pacientes asintomáticos (29).

También es conocida como azidotimidina, AZT, o Retrovir, el nombre químico es 3'-azido 3'-desoxitimidina. La zidovudina es un análogo de la timidina de los nucleótidos del ADN. Difiere de la timidina porque tiene un ácido en lugar de un grupo hidroxilo en la posición 3' de anillo dextrosirbosa (30-33).

Mecanismo de acción.

La zidovudina es fosforilada en las células infectadas y no infectadas en forma monofosfatada por la timidina kinasa de la célula, y subsecuentemente a la forma difosfatada por esta misma enzima, luego la forma difosfatada es convertida a forma trifosfatada. Esta zidovudina trifosfatada es activa y trabaja como un potente inhibidor de la replicación del virus, a través de la siguiente estrategia:

Un paso esencial en la replicación del VIH es la formación del transcrito de ADN, el cual se integra en el ADN de la célula huésped. La formación del transcrito es mediada por la T.R. y requiere de la presencia de timidina. La Zidovudina trifosfatada actúa como falsificación de la timidina, pero esta es reconocida por la T.R. como una timidina real. El medicamento hace como una barrera dentro del ADN transcrito, y como resultado la terminación prematura de la transcripción del ADN viral (25-33).

## DIDANOSINA

La didanosina fue inicialmente aprobada para el uso en pacientes con la infección de VIH avanzada y que fueron no tolerantes al tratamiento con AZT o a quien tal tratamiento no le había sido exitoso.

También es conocida como ddI, su fórmula química es 2'3'-dideoxinosina. La didanosina es un análogo de la adenina.

El único mecanismo de acción identificado para la didanosina es muy similar que fue descrito para el AZT. Compite el un nucleótido natural adenosina y la terminación de la cadena después de incorporar el inhibidor. El ddA es fosforilado por enzimas de la célula a ddA trifosfatado que compite para que la T. R. la una como cualquier dexosiadenonina trifosfatada (29, 33).

No nucleósidos de la Transcriptasa Reversa.

Son inhibidores altamente específicos no competitivos de la enzima T.R. del VIH. Se unen directamente a la enzima en los residuos de la tirosina localizados en la posición 181 y 188. Estas causan una disrupción en la enzima en el sitio catalítico e impiden la síntesis de ADN a partir de ARN genómico. No compiten por la plantilla o por nucleósidos. La actividad de éstos antirretrovirales es específica para el VIH-1. Son activos en estado nativo. No necesitan ser fosforilados por las enzimas celulares para empezar a ser activos en contra del VIH.

Los estudios clínicos muestran que éstos agentes tienen mayor eficacia en terapia combinada. Actualmente se encuentran disponibles en el mercado mexicano 3: Mesilato de Delavirdine, Nevirapina, Cidofovir (34-36).

## 2. INHIBIDORES DE LAS PROTEASAS.

La acción de un inhibidor de alta afinidad por el punto activo de la molécula de proteasa interrumpe la fragmentación de las cadenas proteicas gag y pol, que después se ensamblan en virus incompletos no infectantes.

La postraslación de los polipéptidos gag y gag-pol por la proteasa del VIH es esencial para el ensamblaje y maduración dentro de los viriones. Si esta función se bloquea por una mutación inactivante o un inhibidor, las partículas virales saldrían no maduras y no infecciosas de las membranas de las células (29).

Los inhibidores de las proteasas son compuestos que bloquean esta enzima, impidiendo el procesamiento de poliproteínas virales de reciente formación, producto de los genes gag y gag-pol a proteínas funcionales como p17, p24, p9, p7, transcriptasa reversa y proteasas. Los medicamentos actualmente disponibles en el mercado son: Sulfato de Indinavir, Mesilato de saquinavir, ritonavir, Melsinato de Nelfinavir (37-41).

### Mecanismo de Acción

La proteasa del VIH es un blanco terapéutico atractivo, porque cataliza un paso crítico que hace posible el ensamble final de los viriones infectantes.

Normalmente, los polipéptidos precursores gag y pol son divididos por la proteasa del VIH en enzimas funcionales, las cuales se ensamblan en una configuración específica para formar virus completos viables.

La cavidad del punto activo hidrófobo esta formada por un surco cilíndrico, el cual contiene las fracciones catalíticas Asp 25 y 25', que están centradas en el punto activo. En el extremo del surco del punto activo se encuentran las porciones hidrófilas asparto y asparagina.

La proteasa del VIH rompe los enlaces peptídicos entre la fenilalanina y la prolina, y libera así las proteínas virales individuales gag (p17, p24, p15, p9 y p6) y pol (T.R., ribonucleasa e integrasa). El patrón de la proteasa del VIH es exclusivo de la proteasa de los retrovirus (33-41).

#### SAQUINAVIR.

También es conocida como Invirase su fórmula química es Cis-N-tert-butyl-decahydro - 2- ( 2(R) - hidroxy - 4 - phenyl- 3 (5) - ((N - 2 - quinolylylcarbonyl - 2 - asparaginylyl ) amino) butyl) - (4 a 5,8 a5) - isoquinolina -3 (5)- carboxamida. El mecanismo de acción es igual al antes descrito. Es un agente inhibidor exclusivo de la proteasa del VIH y esta indicado para combinarlo con inhibidores de la T.R. análogos de los nucléosidos para el tratamiento de la infección por el VIH en etapa avanzada (42-43).

## SULFATO DE INDINAVIR.

También es conocido como CRIXIVAN, MSD. Su fórmula química es la siguiente: sulfato (1:1) de (1(1S,2R),5(S))-2,3,5 - trideoxi - N - (2,3 - dihidro - 2 - 1H - inden - 1 - il)- 5 -(2- (((1,1 - dimetiletil) - D - eritro - pentonamida.

En experimentos *in vitro* el Sulfato de Indinavir inhibe la proteasa purificada del VHI-1 Y VHI-2, con una selectividad aproximada de diez veces mayor por el VHI-1. El compuesto se une directamente al punto de acción de la proteasa, por lo que es un inhibidor competitivo de la enzima. El mecanismo de acción es similar que al descrito con anterioridad (34).

## BEL222142

El BEL222142 es un inmunoestimulador conformado por mediadores de la respuesta inmune, que ha demostrado su efecto *in vivo* en animales y humanos, en padecimientos que cursan con inmunosupresión como el cancer y la desnutrición y en algunas enfermedades de la colágena como el Lupus eritematoso y Artritis reumatoide.

Nombre genérico 2L.VS. Esta compuesto por  $\beta 2$  Microglobulina,  $INF\alpha$ ,  $TNF\alpha$  ,  
IL1, IL3, Eritropoyetina, anticuerpos anti HLA DR5, Acido desoxiribonucleico y  
Acido ribonucleico especifico contra el VIH.

Algunas diferencias que tiene el BEL222142 con los antirretrovirales  
disponibles son:

- ° No ha causado toxicidad en estudios de fase I y II.
- ° Potencializa al sistema inmune, contra el VIH.
- ° No inhibe en el ciclo viral.
- ° Se utiliza a dosis estimulantes

Se propone que el mecanismo de acción del BEL222142 es a través de la  
activación con dosis no saturantes de los receptores para los mediadores de la  
respuesta inmune, como las IL's, INF, TNF, HLA entre otros. Sin embargo los  
estudios que se han llevado a cabo sobre la expresión, reconocimiento y  
activación de dichos receptores, aún no han sido publicados en virtud de que  
se trata de una combinación experimental en desarrollo.

CITOCINAS Y ENFERMEDAD POR VIH: desregulación en la producción de citocinas.

Una compleja red de citocinas operan y regulan el sistema inmune. Esta red es superflua y pleiotrópica, funciona de manera autócrina o parácrina para estimular o suprimir la proliferación y diferenciación celular y así modular las funciones inmunes. La desregulación inmune en la red de citocinas resulta de la activación inmune crónica inducida por la infección de VIH y la asociación de infecciones oportunistas. Las alteraciones observadas en la producción de las citocinas, contribuyen a la patogénesis del VIH estimulando la replicación viral y suprimiendo la habilidad del sistema inmune para establecer una respuesta antiviral fuerte e induciendo efectos citopáticos mediados por citocinas (44-45).

De manera similar a otras infecciones crónicas, la infección por el VIH se asocia con el incremento de la expresión de citocinas proinflamatorias, especialmente durante los últimos estadios de la enfermedad. Secretándose niveles altos de TNF-  $\alpha$ , IL-1  $\beta$  y de IL-6 por las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y macrófagos de las personas infectadas con el VIH. El TNF-  $\alpha$ , IL-1  $\beta$  y la IL-6, se encuentran en niveles elevados en suero, líquido cefaloraquídeo y diversos tejidos. Los niveles altos de expresión de estas citocinas como de interferon (INF)  $\gamma$  e IL-10, son particularmente evidentes en el tejido linfóide, un sitio de replicación en el curso natural de la

enfermedad. Se piensa que la actividad crónica y la expansión de las células CD8+ y macrófagos, contribuye a que se observen niveles elevados de citocinas en sujetos VIH positivos (46-48).

En una infección *in vitro* la producción de citocinas inflamatorias pueden estar reguladas en CMSP, células mononucleares de ganglios linfáticos y macrófagos, después del tratamiento con proteínas del VIH tales como la gp 120 y los polipéptidos producidos por la expresión del gen Tat.

Otra anomalía observada en el perfil de citocinas en la enfermedad del VIH, es la pérdida progresiva en la habilidad de producir citocinas inmunoregulatoras tales como IL-2 e IL-12. Estas citocinas son críticas para la efectividad de las células mediadoras de la respuesta inmune, como en la proliferación y actividad de los linfocitos T citotóxicos y las células asesinas naturales. Estas células mediadoras de los efectos inmunes representan un mecanismo primario donde la infección viral es clara. La IL-12 es esencial para la estimulación de la producción de citocinas de células T cooperadoras (Th) tipo 1, incluyendo IL-2 y INF gamma que favorecen el desarrollo de las células mediadoras de la respuesta inmune. Esta claro que las células Th 1 que producen IL-2, INF gamma, TNF- $\beta$ , son miembros de la respuesta inmune celular y se dañan durante el curso de la infección por VIH. Por otra parte se propone a las células Th 2, que producen IL-4, IL-5, IL-6 y IL-10, como respuesta durante la progresión de la enfermedad del VIH (49-51).

Clerici y col. mostraron que la estimulación de CMSP de pacientes VIH positivos muestran preferentemente una secreción de citocinas tipo Th 2 con el progreso de la enfermedad. Sin embargo, otros investigadores han encontrado el cambio en el modelo de secreción de citocinas de las células T de individuos infectados al estado Th 0 (secreción de las citocinas de las células Th 1 y Th 2), mas hacia un estado Th 2. En cualquier caso, se encontró que la replicación del VIH es mas eficientemente en las Th 0 comparada con clones de Th 1, destaca entonces la importancia del daño de las Th 1 en la respuesta de la patogénesis de la enfermedad del VIH (49-51).

Efectos de la citocinas en la replicación del VIH.

Los efectos de la citocinas en la replicación del VIH es controversial y se reconocieron en estudios tempranos sobre de la actividad de CMSP, macrófagos y células B, donde se mostraron factores solubles que podían dramáticamente regular la expresión del VIH en la infección aguda y crónica en las células infectadas de los linajes de linfocitos y macrófagos. Estas observaciones sirvieron para identificar numerosas citocinas que pueden directamente influenciar la replicación del VIH en células infectadas (52).

Dentro de las citocinas que han sido reportadas para la regulación de la replicación *in vitro* del VIH se incluyen: IL-1  $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, TNF-  $\alpha$ , TNF  $-\beta$  y factor estimulante de colonias (FEC) de macrófagos, FEC de

macrófagos-granulocitos. El INF-  $\alpha$ , INF-  $\beta$  y la IL-16 son supresores primarios de la producción del VIH, mientras otras citocinas, como IL-4, IL-10, IL-13, IFN-gamma y TGF- $\beta$ , reduce o realza la replicación viral dependiendo del tipo de células infectadas y las condiciones del cultivo. Muchas citocinas, tales como interferones y TNF-  $\alpha$  pueden influenciar la replicación del VIH en células T y macrófagos, mientras que otras como FEC de macrófagos están en células de linaje específico. Los efectos de las citocinas en particular son frecuentemente influenciados por la actividad de otras citocinas presentes en el microambiente. Ciertas citocinas han demostrado actuar de manera sinergista o antagonista con otras citocinas en la regulación de la replicación del VIH. Finalmente las citocinas que son pleiotrópicas y el total de efectos de las citocinas en particular sobre la replicación del VIH, frecuentemente reflejan el balance de ambas actividades VIH-inductoras y VIH-inhibidoras (45, 53-55).

Entre las citocinas proinflamatorias, particularmente el TNF-  $\alpha$  está considerada como la citocina más potente que induce VIH y sus mecanismos de acción están relativamente bien entendidos. EL TNF-  $\alpha$  y IL-1  $\beta$  activan el factor transcripcional de la célula, inducen fuertemente el LTR mediador de la transcripción. La IL-6 sola parece incrementar la expresión del VIH mediante mecanismos post-transcripcionales, sin embargo, la IL-6 puede ser sinérgica con el factor transcripcional de las células, induciendo citocinas para aumentar la transcripción del VIH. El papel de las citocinas proinflamatorias endógenas

en la regulación de la replicación del VIH, ha sido demostrado en varios sistemas celulares *in vitro*. La producción del VIH por macrófagos o CMSP estimuladas con inductores fisiológicos de citocinas proinflamatorias, tales como endotoxinas de bacterias o IL-2, pueden parcialmente o completamente revocar cuando se le añaden citocinas antiproinflamatorias, como anticuerpos neutralizantes, receptores antagonistas como IL-1ra. En cultivos de macrófagos infectados, la actividad supresora viral de varias citocinas, como IL-10 y TNF- $\beta$  es atribuido a la habilidad de éstas células de inhibir la secreción o la actividad de citocinas proinflamatorias. La producción de VIH por células T infectadas, es sensible tanto, a la actividad antiproinflamatorias y antiproliferativa de algunas citocinas (55-58).

Aunque el papel de la citocina proinflamatoria y antiproinflamatoria en la regulación de la replicación del VIH *in vivo*, no se ha demostrado, se sugiere que estas citocinas pueden estar involucradas en la regulación de la replicación viral. La administración de pentoxifilina, como inhibidor de la secreción y la actividad de TNF; en los individuos VIH positivos se encontró que reduce la concentración de la viremia con una reducción de los niveles en plasma de TNF- $\alpha$ . El papel de las citocinas proinflamatorias que mantienen los niveles de replicación de VIH, se sugiere por la observación *in vivo* de la infusión de IL-10 de pacientes VIH positivos, provocando una rápida y modesta aunque trascendente disminución de la viremia en plasma. En la cinética de supresión del VIH *in vivo*, que se correlaciona con la reducción dramática en la

habilidad de estas células para secretar *in vitro* TNF- $\alpha$  e IL - 1  $\beta$ . Se ha encontrado que la IL-10, inhibe la infección aguda del VIH en varias combinaciones de inmunodeficiencias en ratón con injertos de timo fetal e hígado humano. La habilidad de la IL-10 de suprimir la activación y proliferación de los linfocitos T juegan un papel prominente en la habilidad de suprimir la replicación del VIH *in vivo* (59-60).

El uso de citocinas inmunosupresoras que pueden deprimir la respuesta inmune del VIH, por otra parte se han administrado citocinas que estimulan células T o células presentadoras de antígeno a individuos infectados por varios años. El uso de la terapia basada en citocinas finalizó en los últimos años, particularmente con el desarrollo de las terapias antiretrovirales, más eficaces que limitan el potencial de aplicación de las citocinas en la disminución de la replicación viral. La administración de IL-2 en personas infectadas asintomáticas que están recibiendo concomitantemente terapia antiretroviral, tienen un significativo incremento en el número de CD4+, sin efectos sobre la viremia. De una manera similar en terapias de reconstrucción inmune, se han comenzado a proponer el uso de las IL-12, IL-13 y IL-15, sin embargo nuevos estudios han continuado una larga lista de las citocinas para su uso como agentes potenciales inmunoterapéuticos. El enfoque inmunoterapéutico se basa en un reporte reciente donde se demuestra que la transfección a las células CD4+ el ADN que codifica los 130 aminoácidos de la IL16, convierte virtualmente éstas células resistentes a la infección. La IL-16

que media la actividad inhibitoria del VIH en este sistema, parece estar relacionada con la transcripción viral. Estos efectos se pueden explicar la habilidad de la IL-16 de suprimir la activación de las células T. La combinación de IL-2 y IL-16 es una opción sinérgicamente atractiva, que puede realzar la expansión de células T CD4+ (53, 61-63).

Además de las citocinas mencionadas, se estudiaron varios factores solubles no identificados que también han mostrado ejercer una dramática actividad de la modulación del VIH. Entre estos, están los factores derivados de las células CD8+ que tienen actividad lítica como un componente importante de las células CD8+ mediadoras de supresión, sobrenadantes de cultivos libre de células CD8+ activadas, son capaces de inhibir drásticamente la replicación del VIH en células T y macrófagos. Los factores antivirales de CD8+ primero descritos por Walker y col, son citolíticos, suprimen la replicación y favorecen la falta de identidad para conocer las citocinas (64-66).

Un grupo distinto de factores supresores secretados por linfocitos CD8+, fueron identificados por Cocchi y col., quienes atribuyen la actividad supresiva de las células CD8+ a una combinación de ciertas citocinas, incluyendo las proteínas inflamatorias de macrófagos (MIP)  $-1 \alpha$ , MIP-  $1 \beta$  y RANTES que regulan la activación de la célula T, la expresión y la secreción. Sin embargo, aunque la combinación de citocinas MIP-  $1 \alpha$ , MIP-  $1 \beta$  y RANTES suprimen potencialmente varias cepas M del VIH, virtualmente no tienen efectos en la replicación de las cepas VIH-1 IIIB (67).

### III. JUSTIFICACION

Actualmente los tratamientos antirretrovirales para el VIH, tienen por objeto disminuir la carga viral y mejorar la cantidad de linfocitos T CD4+. Sin embargo, en la mayoría de los casos no se logra restablecer o mejorar el sistema inmunológico eficientemente, por lo que un inmunoestimulador asociado a los inhibidores de la transcriptasa reversa y las proteasas puede potencializar la viabilidad linfocítica y la disminución de la carga viral.

## IV. OBJETIVOS

## OBJETIVO GENERAL.

1.0 Evaluar *in vitro* el efecto del BEL222142 asociado con la didanosina, zidovudina, sulfato de indinavir y saquinavir, en la potencialización del sistema inmune y de la actividad antiviral contra el VIH.

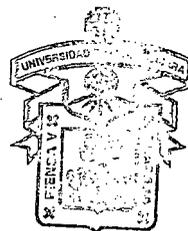
## OBJETIVO PARTICULAR.

1.1 Establecer un modelo de disminución de la carga viral *in vitro*, mediante el BEL222142.

## V. HIPOTESIS

El BEL222142 es un inmunoestimulador, que favorece *in vitro* la proliferación linfocítica y la disminución de la carga viral del VIH en presencia de didanosina, zidovudina, saquinavir y sulfato de indinavir.

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

**VI. CRITERIOS DE INCLUSION  
Y EXCLUSION.**

## CRITERIOS DE INCLUSION.

- \* Aceptar por escrito su inclusión en el estudio.
- \* Hombres de 70 Kg. Aproximadamente.
- \* VIH positivos.
- \* Entre 18 y 60 años de edad,
- \* En fases de infección aguda y de infección asintomática de la enfermedad.
- \* Sin tratamiento antiviral o de cualquier otra índole por lo menos.

## CRITERIOS DE EXCLUSION.

- \* Estar bajo tratamiento antiretroviral contra el VIH.
- \* No completar la cantidad de muestra biológica (sangre).
- \* Cultivos contaminados durante la fase experimental.

## VII. MATERIAL Y METODOS.

Se estudiaron 10 individuos VIH positivos, de los cuales se obtuvo 30 ml de sangre con heparina y 5 ml de sangre sin anticoagulante; de los 5 ml de sangre sin anticoagulante se separó por centrifugación y se obtuvo el suero, que se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ , en un congelador (marca Kelvinator modelo HFM 151K6W1), hasta su procesamiento y cuantificación simultánea del Ag p24.

De la sangre con heparina se separaron los linfocitos mediante gradientes de densidad de Ficoll / Hypaque. Se contaron las células y se midió su viabilidad. Las células se pusieron en cultivo por 72 hrs a  $37^{\circ}\text{C}$ . Se tomó una alícuota para medir Ag p24 y con el resto se midió proliferación linfocítica con MTT.

Se trabajó con todo el material estéril y los cultivos se realizaron en campana de flujo laminar marca VECO, tanto el RPMI como el MTT se filtraron para su esterilización en filtros marca Millipore ( No. de catálogo HAWP 02500, tipo del filtro HA, tamaño del poro  $0.45\ \mu\text{m}$ ). Los tubos cónicos se esterilizaron en autoclave de gas, el resto del material se esterilizó en autoclave de vapor.

En el procesamiento estadístico se utilizaron la regresión lineal para el análisis de la cuantificación de Ag p24 y para la proliferación se convirtió primero a porcentajes y se analizaron con la prueba T de student.

# METODOLOGIA

30ml DE SANGRE CON HEPARINA  
5ml DE SANGRE SIN ANTICOAGULANTE  
DE CADA PACIENTE

5ml SIN ANTICOAGULANTE  
CENTRIFUGAR POR  
10 min.

30ml DE SANGRE CON HEPARINA  
SEPARACION DE  
CELULAS FICOLL / HYPAQUE

SEPARACION DE  
SUERO  
CD4/CD8

CULTIVO  
72 H A 37°C  
DE CADA  
GRUPO (14)

CARGA VIRAL  
Ag p24  
BASAL

CARGA VIRAL  
Ag p24

COMPARA RESULTADOS

## SEPARACION DE LINFOCITOS

La separación de los linfocitos se hizo en tubos cónicos de 15 ml (Nunc No. de catálogo 335165). Bajo el siguiente procedimiento se colocan 3ml de Ficoll / Hypaque, sobre el ficoll se coloca la sangre ya diluida 1:1 con PBS (buffer salino fosfato). Se centrifuga a 1,500 rpm durante 30 min. a temperatura ambiente. Se extraen los linfocitos con una pipeta Pasteur y se colocan en tubo de ensaye para hacerles un lavado con RPMI 1640. Se mezcla por inversión cuidadosamente, se centrifuga a 1500 rpm durante 10 min. a 4°C. Se desecha el sobrenadante y al botón se le añade 1 ml de RPMI 1640 para su posterior conteo, se colocan en hielo. Se toman 100  $\mu$ l y se colocan con 900  $\mu$ l de RPMI, se agita para homogeneizar, se toma y se cuenta en la cámara de Newbauer. Se cuentan los cuatro cuadrantes externos y el resultado se divide entre 4 y se multiplica por la dilución y por el factor de la cámara; el resultado es igual a la cantidad de células por mililitro. La viabilidad se midió con azul tripano de la siguiente manera se toma 10  $\mu$ l del tubo con la dilución 9:1 de células, se colocan sobre un portaobjetos y se mezcla con 10  $\mu$ l de azul tripano, esperamos 1 min. se pone el cubreobjetos, se cuentan 100 células en total en un microscopio óptico, las células que se pongan azules son células muertas, se expresan en porcentaje. Para los cultivos se requiere 95% de viabilidad.

## SEPARACION DE CELULAS

Se colocan 5ml de sangre total con 5 ml de PBS  
sobre 3ml de Ficoll/hypaque.



Centrifugar a 1500 rpm 30 min. t° ambiente



Extraer células



Lavado con RPMI, 1500 rpm 10 min. 4°C



Añadir 1ml de RPMI y dejar en hielo



100 µl se colocan en 900 µl de RPMI



Conteo Celular



contar en cámara de  
Newbauer



Conversiones para cantidad  
de células



Viabilidad



Dilucion 1:1 con azul  
tripano



Contar 100 células y  
sacar porcentaje.

## CULTIVO DE CELULAS.

Después de haber contado las células se hacen los cálculos para saber la cantidad de microlitros en los cuales tenga 2 millones de células, cantidad ideal para poner en cada tubo de cultivo.

Los cultivos se hicieron en tubos cónicos de 15 ml. La mezcla de los cultivos contenía 5ml de RPMI 1640 (sigma No. de catálogo R-6504) filtrado, 500 µl de suero fetal bovino (sigma No. de catálogo F-4135) y 200 µl de fitohemaglutinina (GIBCO No. de catálogo 10576 - 015) (68-69), se le agrega 2 millones de células y el medicamento correspondiente. El cálculo para la cantidad de medicamento, se hizo en base a la cantidad en miligramos por día que se administra a los pacientes, considerando el volumen sanguíneo de una persona de 70 Kg y haciendo un cálculo equivalente con el volumen a manejar *in vitro*.

Teniendo lista la mezcla, se homogeneiza por inversión cuidadosamente. Las células se cultivaron por 72 hrs a 37°C, con una humedad del 95% en una estufa marca VIP CO2 INCUBATOR 417 Lab-line Instruments, Inc.

## CULTIVO DE CELULAS

RPMI 1640  
500  $\mu$ l de suero bovino fetal  
200  $\mu$ l de fitohemaglutinina  
2 millones de células  
medicamento



72 hrs, 37°C, 95% humedad

MEDICAMENTOS	MILIGRAMOS
1 AZT	0.34 mg
2 AZT,DDI	
3 AZT,DDI,S.IND	
4 AZT,DDI,SAQ.	
5 AZT,DDI,BEL 222142	
6 AZT,DDI,S.IND,BEL222142	
7 AZT,DDI,SAQ,BEL222142	
8 DDI	0.17 mg
9 RPMI	
10 SAQ	1.03 mg
11 S.IND	1.37 mg
12 BEL 222142	1 unidad
13 RPMI Y CÉLULAS	
14 COMPLETO SIN MEDICAMENTO	

## PROLIFERACION.

La sal de tetrazolium (MTT) se ha desarrollado para el ensayo cuantitativo colorimétrico para las células de los mamíferos. La prueba detecta células vivas pero no muertas, la señal generada depende del grado de activación de las células.

Esta prueba se basa en un procedimiento colorimétrico donde se utiliza un substrato incoloro, para este efecto las sales de Tetrazolium son un candidato atractivo, dado que el anillo de tetrazolium se une a la mitocondria activa y la reacción ocurre únicamente en las células vivas.

### Ensayo colorimétrico MTT

El ensayo colorimétrico con MTT (3 – (4,5 – dimethylthiazol – 2 – y1) 2.5 – diphenyl tetrazolium bromide), (SIGMA No. de catálogo M 2128) consiste en disolver 5 mg de éste por cada mililitro de PBS y después filtrarlo para remover residuos insolubles de MTT. Se añadió 500 µl a cada tubo después del tiempo de cultivo y fueron incubados a 37°C por 4 horas. Se centrifugaron 10 min. Se tiró el sobrenadante y se le añadió 1 ml de ácido isopropanol (0.04 N HCl), se agita hasta que los cristales se disuelvan, y después se lee a 570 nm, en un espectrofotómetro marca Metrolab 330. Las lecturas se hicieron dentro de la primera hora después de haberle añadido el ácido isopropanol. (70-71).

## PROLIFERACION

Se le agrega 500  $\mu$ l de MTT



Incubar por 4 hrs a 37°C



Centrifugar 1500 rpm por 10min.



leer en espectrofotómetro en luz  
visible a 570 nm.

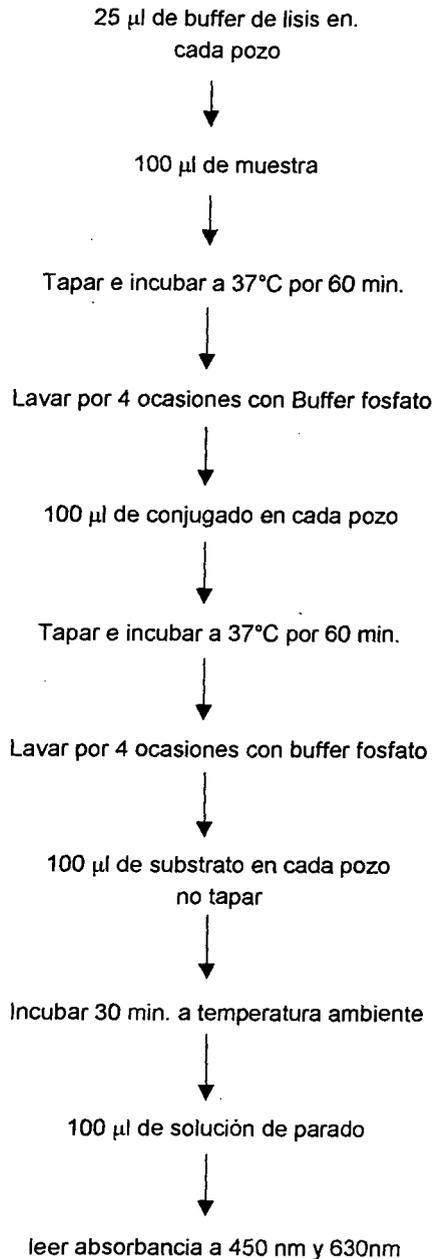
## ANTIGENO p24

Se tomó 500  $\mu\text{l}$  de cada cultivo y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

Se descongelan y se centrifugan para eliminar cualquier célula remanente. Se utilizó un equipo de Organon Teknika (Vironostika HIV-1 Antigen Microelisa System No. de catálogo 59518). Cada pozo de microelisa tiene anticuerpos (monoclonales de ratón) contra antígenos p24 del core del VIH. Se colocaron 25  $\mu\text{l}$  de buffer de lisis en cada pozo, que rompe cualquier virion presente en las muestras. Se prepararon una serie de diluciones del control positivo diluido con control negativo de sobrenadante de cultivo. Cada una de estas diluciones corresponde a la mitad de concentrado de la anterior. Se colocaron 100  $\mu\text{l}$  de cada muestra bajo el siguiente orden: 3 controles negativos en seguida 1 control positivo y 2 controles negativos de sobrenadante de cultivo, la serie de diluciones del control positivo, las muestras de sobrenadante de los cultivos y por último los sueros. Se incuban a  $37^{\circ}\text{C}$  por 60 min. para la unión antígeno-anticuerpo. Se lavan por 4 ocasiones con buffer fosfato en un lavador de microelisa (Organon Teknika microwell system Washer 200), para eliminar el material no fijado; se pipetea en cada pozo 100  $\mu\text{l}$  de conjugado con peroxidasa de rabano, se tapan e incuban a  $37^{\circ}\text{C}$  por 60 min., se lavan por 4 ocasiones con buffer fosfato, pipeterar 100  $\mu\text{l}$  de substrato con tetrametilbenzidine en cada pozo, incubar sin tapar 30 min. a temperatura

ambiente. Finalmente se para la reacción inmunoenzimática agregando 100  $\mu$ l de ácido sulfúrico 1N a cada pozo y se lee la absorbancia a 450 nm y 630 nm en el lector de ELISA (Organon Teknika microelisa system reader 100).

Ag p24  
(VIRONOSTIKA HIV-1 ANTIGEN MICROELISA SYSTEM)



## VIII. RESULTADOS

La figura 1, muestra que el BEL222142, es un fármaco que producto de su composición, tiene un efecto *in vitro* linfoproliferativo que se manifiesta en un incremento de 44% más de proliferación en relación con el control con fitohemaglutinina y en un 220.6% más, al compararse con el control sin mitógeno. También se observa que el efecto linfoproliferativo aumenta gradualmente en el caso de la combinación ddl más AZT, Sulfato de Indinavir, y BEL222142, aunque no existan diferencias significativas. Obsérvese también, que los mejores estimulantes del crecimiento linfocítico resultaron ser el ddl y el BEL222142, a diferencia del resto de los análogos de nucleósidos y del Sulfato de Indinavir, donde es notoria la disminución de la proliferación, en comparación al control con fitohemaglutinina.

En la figura 2, se observa que el Saquinavir induce una proliferación menor en 119% y 75% con respecto al BEL222142 y al control con fitohemaglutinina respectivamente, sin embargo, cuando lo comparamos con la combinación de AZT, ddl o estos análogos más un inhibidor de las proteasas, no se aprecia ninguna diferencia significativa.

En la figura 3, se puede observar que el porcentaje de proliferación para los dos inhibidores de proteasas es relativamente parecido y menor al del control con fitohemaglutinina, no siendo así, cuando se comparan dichos inhibidores

de las proteasas con el inmunoestimulante experimental, el cual muestra hasta un 100% de incremento en la proliferación linfocítica  $p < 0.005$ .

La figura 4, muestra que únicamente el ddl solo, superó en un 10% al control adicionado con mitógeno. El AZT solo o combinado, no fue capaz de hacer proliferar a los linfocitos más que el control o el inmunoestimulante experimental.

En la figura 5, podemos observar que no se encuentran diferencias significativas entre las diversas combinaciones de análogos de los nucleósidos con o sin inhibidores de las proteasas y el BEL222142.

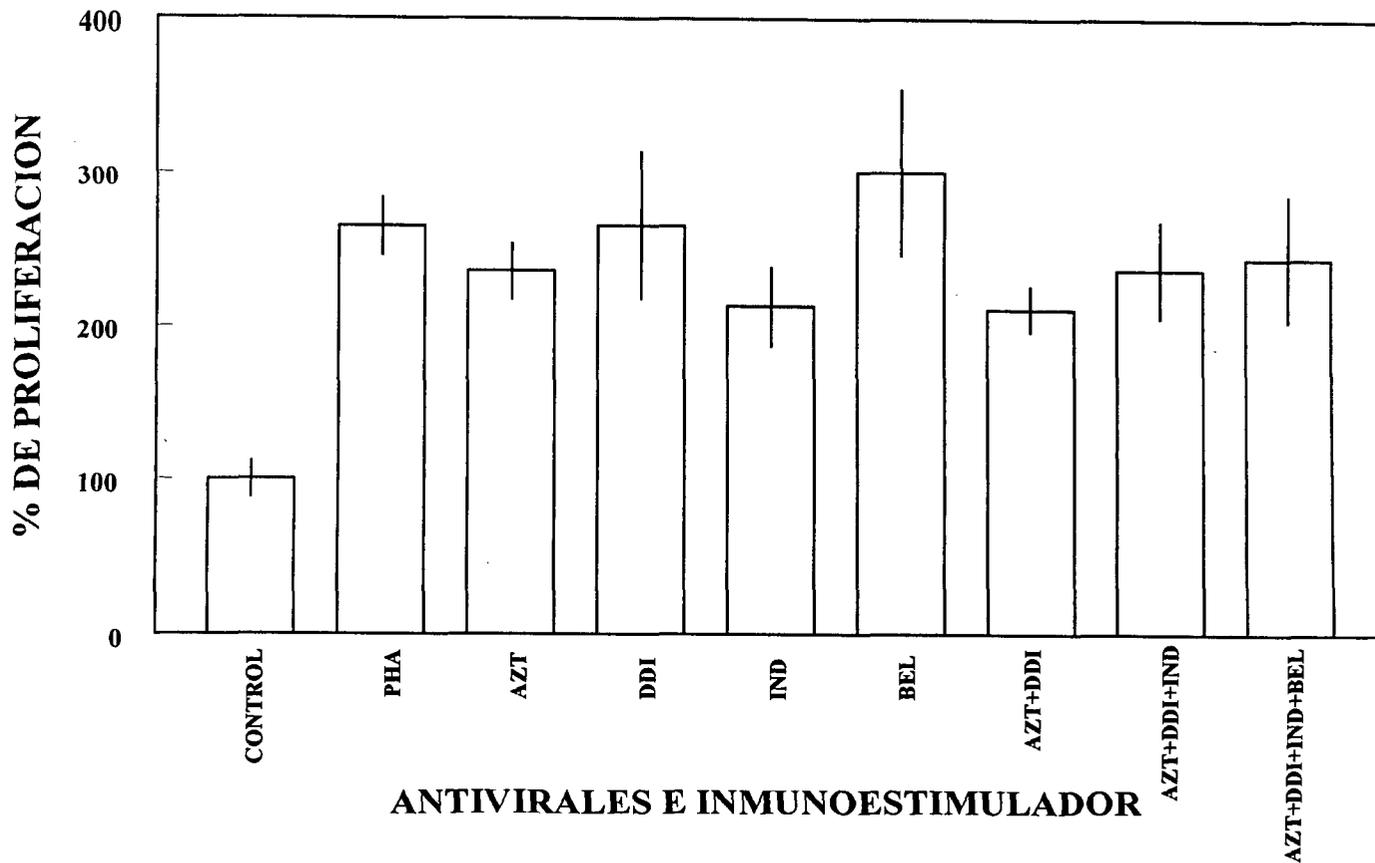
La figura 6 muestra que en los controles si existe una replicación mayor del virus, en especial, cuando los cultivos se encuentran en ausencia de fitohemaglutinina, estas tendencias nos permiten definir el punto de partida de los niveles de Ag p24 para evaluar los diversos efectos de los fármacos experimentales, llama la atención que en el caso del BEL222142, la replicación viral es aún menor que la de los controles.

En la figura 7 se aprecia como el AZT asociado al ddl tienen un potente efecto inhibidor de la actividad viral, mayor que la lograda con el sulfato de Indinavir o el AZT.

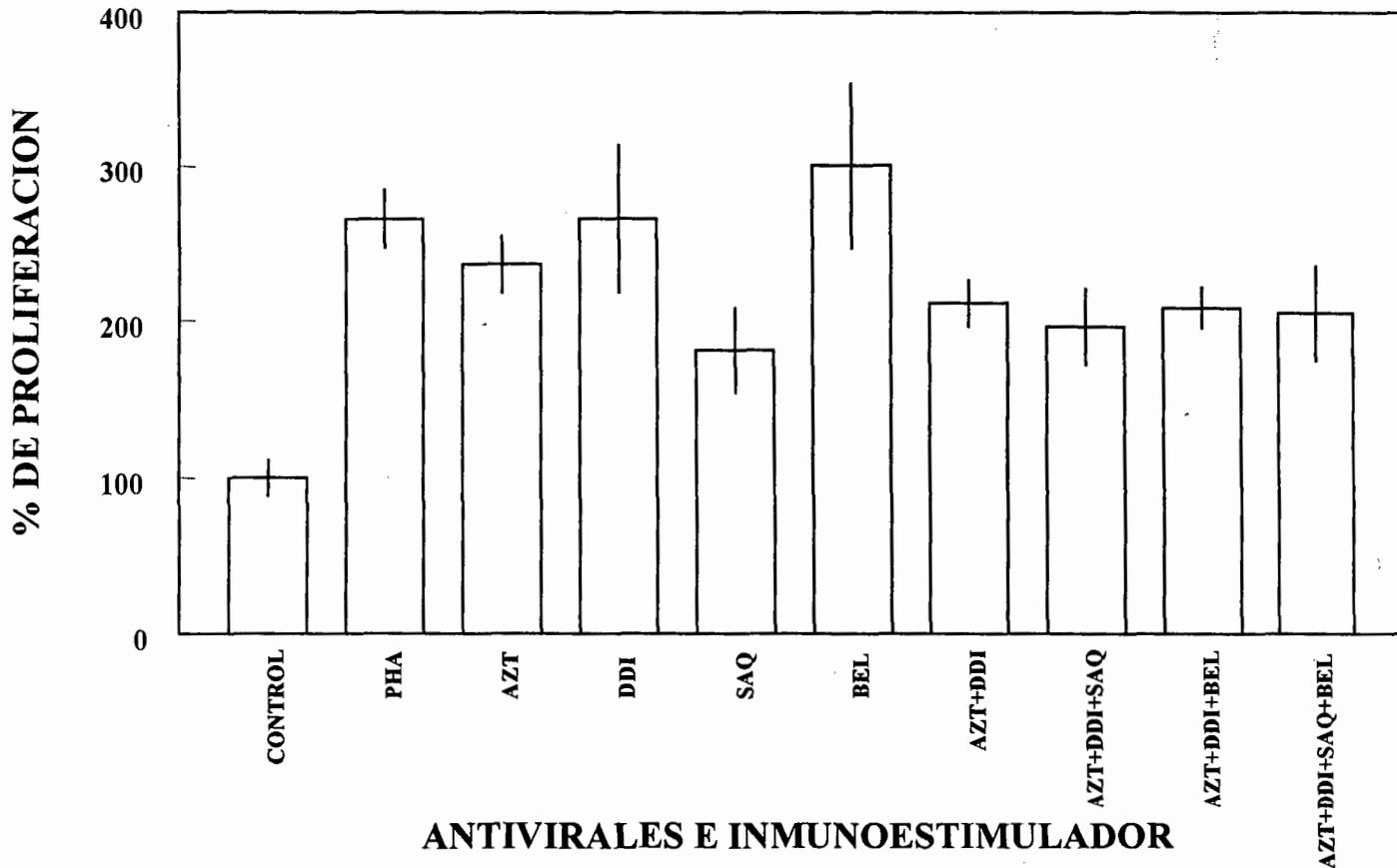
Llama la atención en la figura 8, que al combinar 2 análogos de los nucleósidos con un inhibidor de las proteasas y/o el BEL222142, la tendencia a la disminución del Ag p24 es muy marcada en el caso de la combinación de AZT, ddl y Sulfato de Indinavir, en contraposición con la tendencia mostrada por la combinación AZT, ddl más Saquinavir.

En la figura 9, se observa el efecto que el BEL222142 produce, cuando se utiliza combinado con 2 análogos de los nucleósidos o solo, en ambos casos pero más acentuado en la segunda opción, se logra una tendencia constante en la proliferación y en la inhibición de la replicación viral.

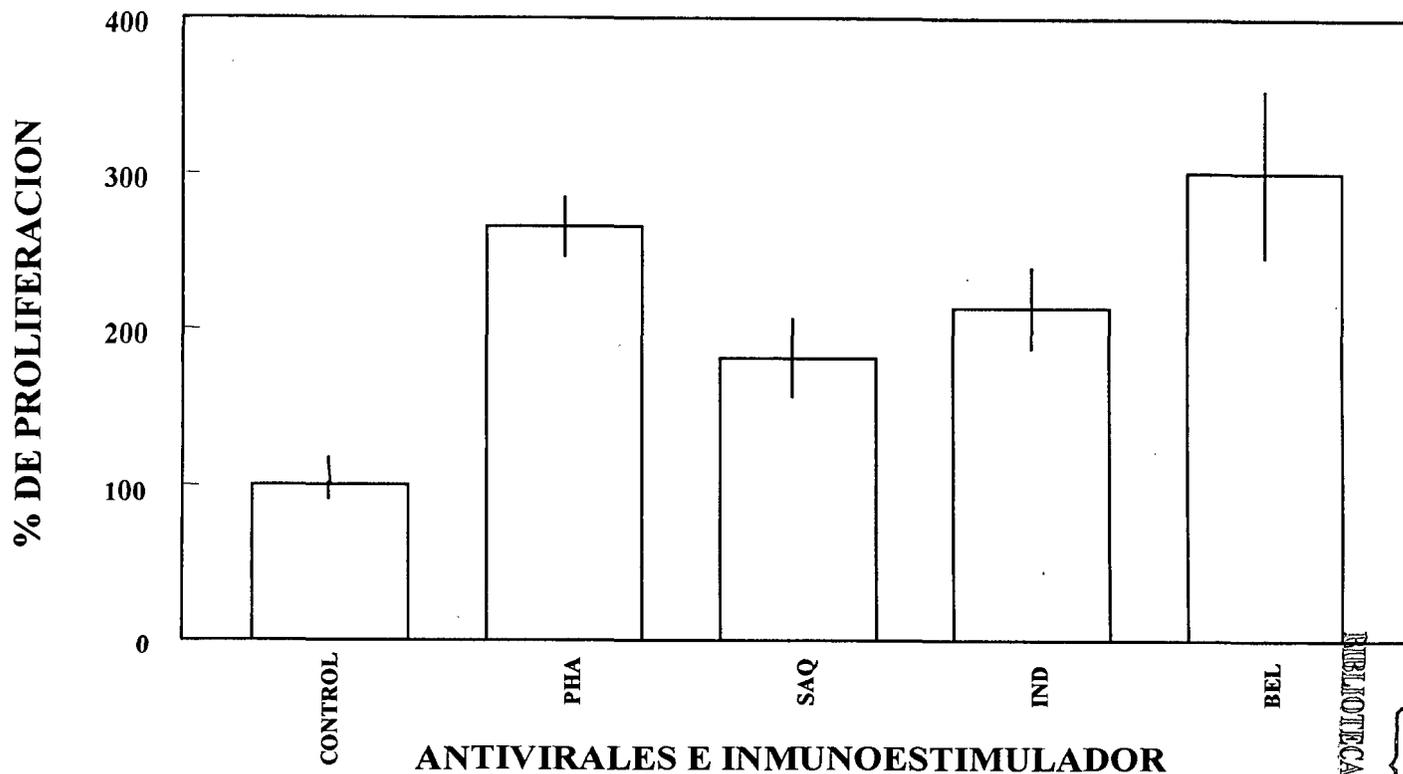
**FIGURA 1**  
**LINFOCITOS EXPUESTOS A ANALOGOS DE NUCLEOSIDOS SULFATO**  
**DE INDINAVIR Y BEL222142**



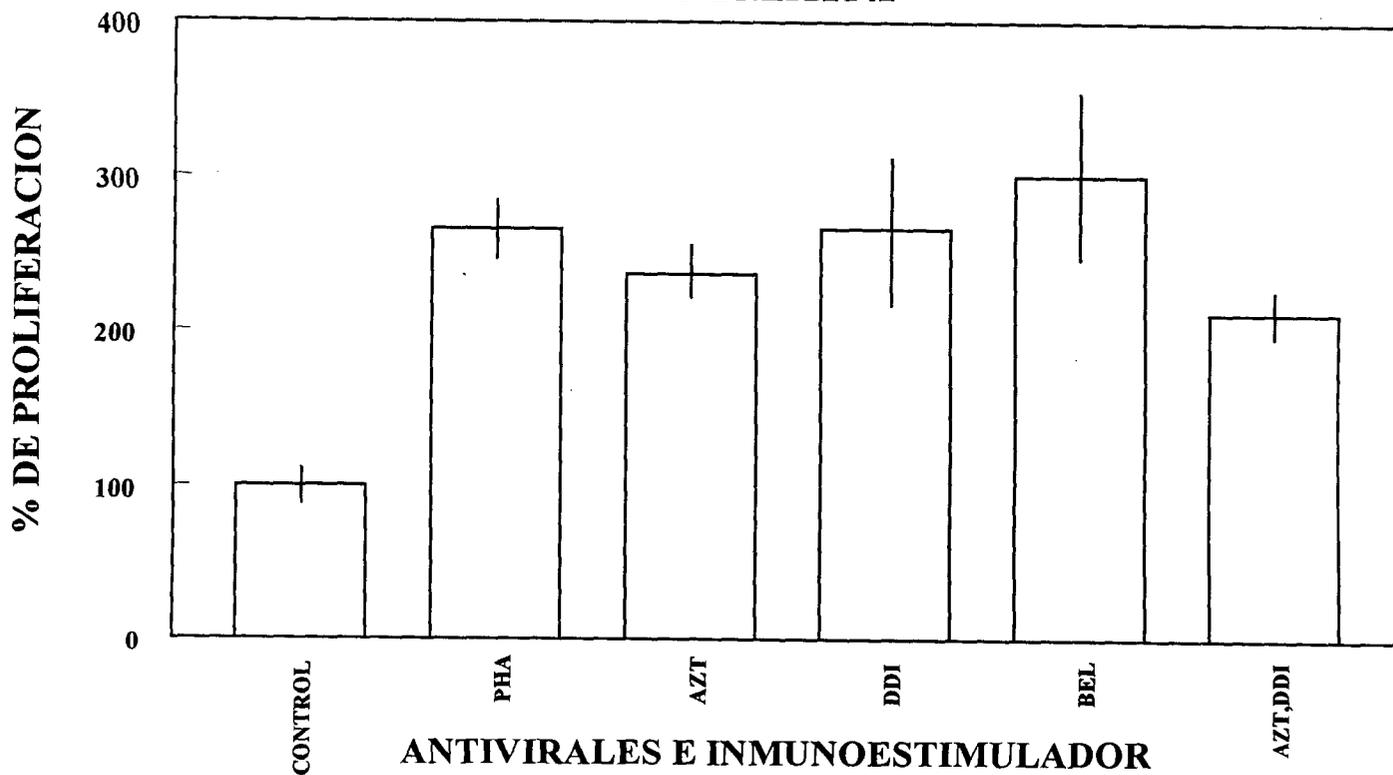
**FIGURA 2**  
**LINFOCITOS EXPUESTOS A ANALOGOS DE NUCLEOSIDOS, SAQUINAVIR**  
**Y BEL222142**



**FIGURA 3**  
**LINOCITOS EXPUESTOS A DOS INHIBIDORES DE PROTEASAS**  
**Y EL BEL222142**



**FIGURA 4**  
**LINFOCITOS EXPUESTOS A ANALOGOS DE NUCLEOSIDOS**  
**Y BEL222142**



**FIGURA 5**  
**LINFOCITOS EXPUESTOS ANALOGOS DE NUCLEOSIDOS, INHIBIDORES**  
**DE LA PROTEASA Y EL BEL222142**

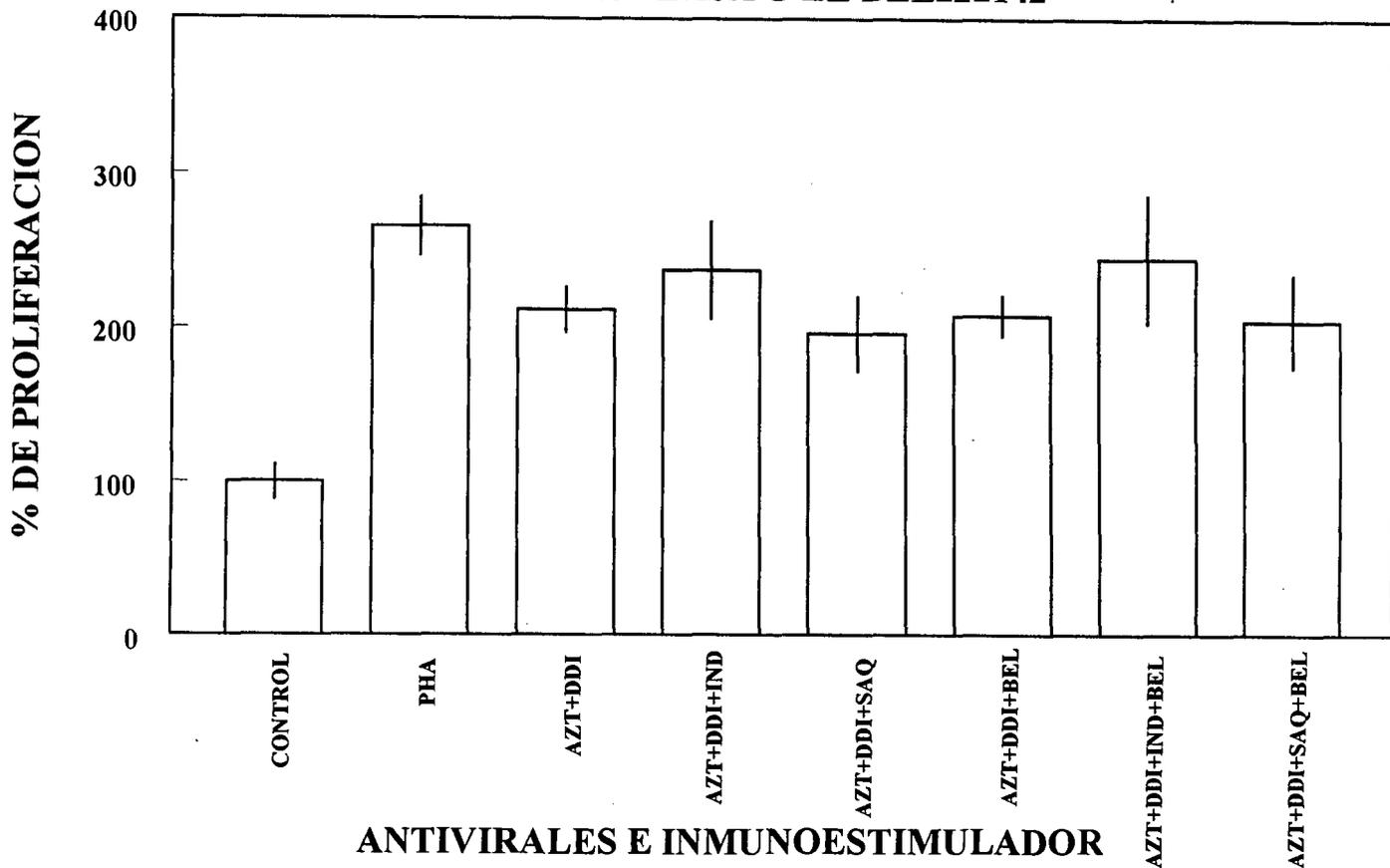


FIGURA 6  
REPLICACION VIRAL

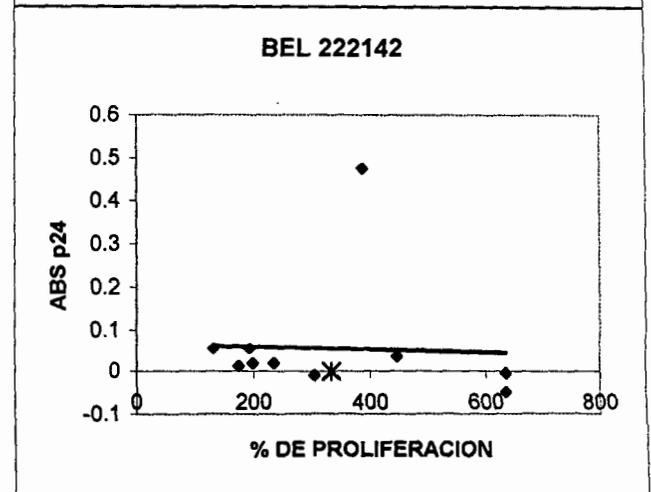
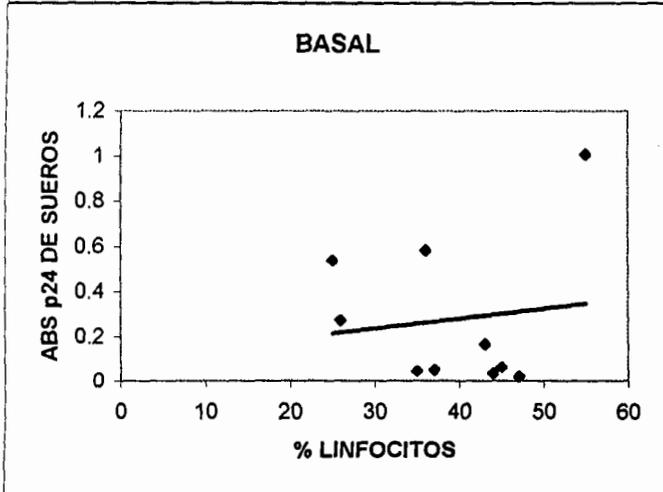
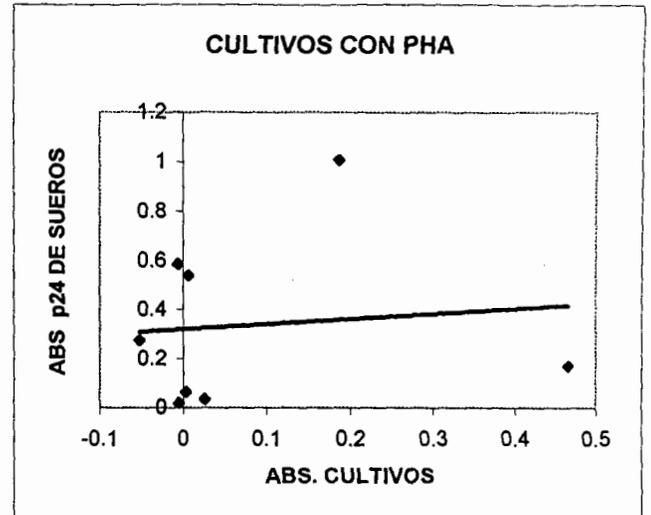
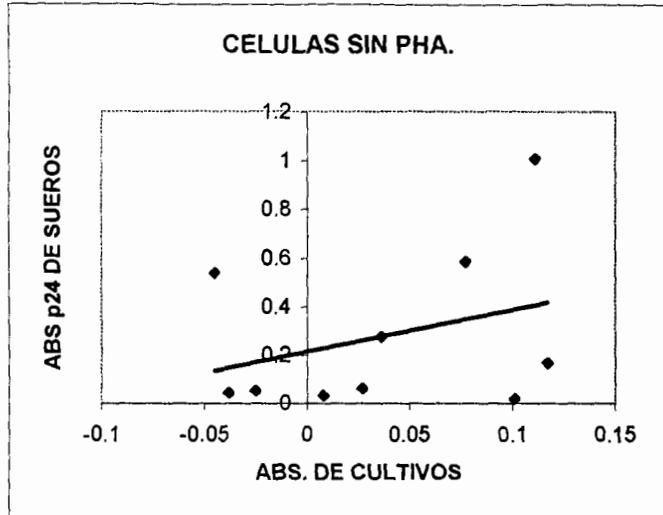


FIGURA 7  
REPLICACION VIRAL

57

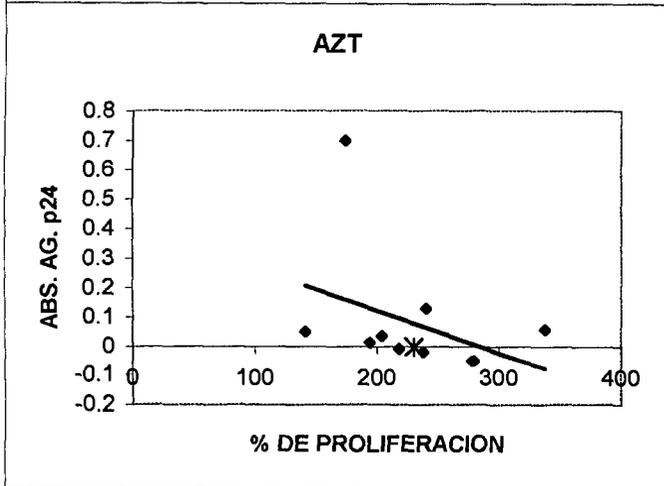
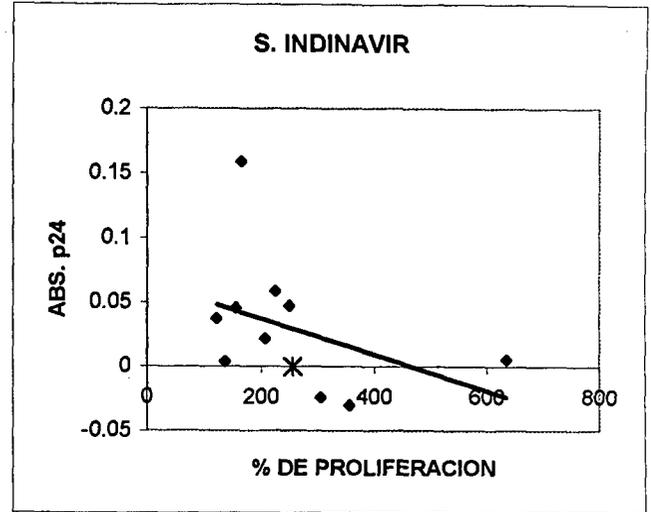
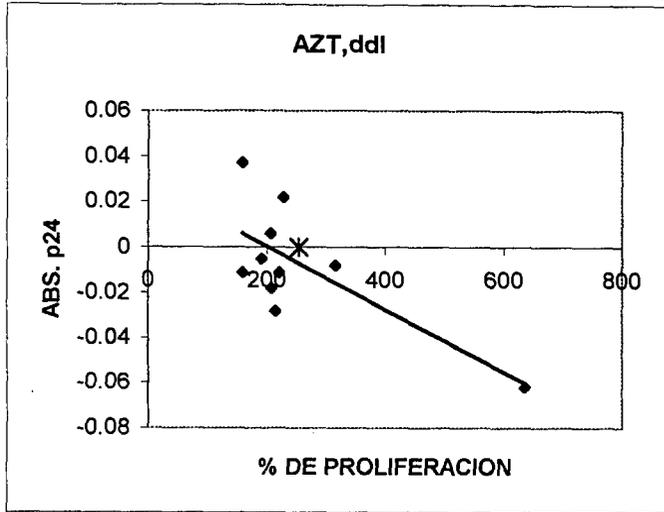


FIGURA 8  
REPLICACION VIRAL

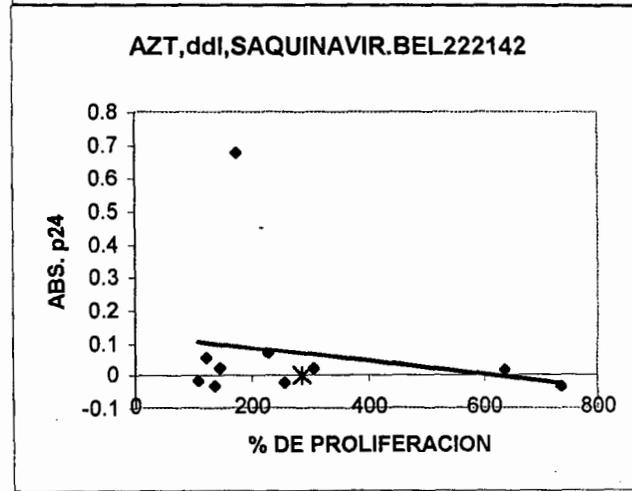
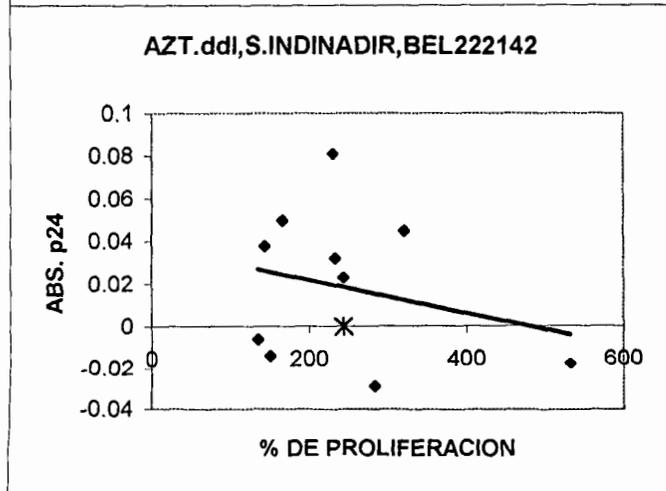
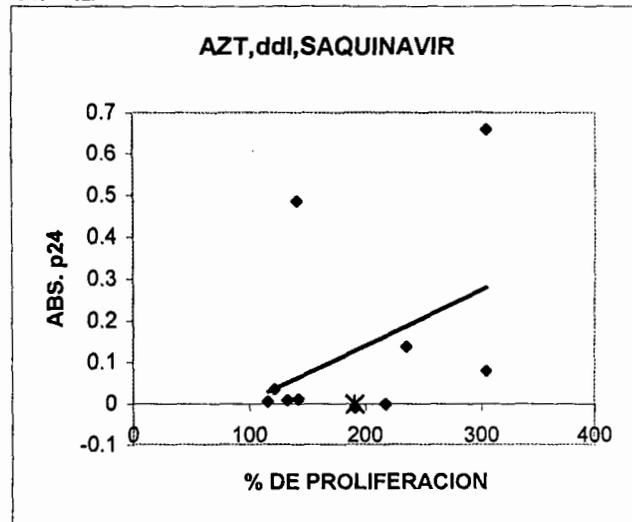
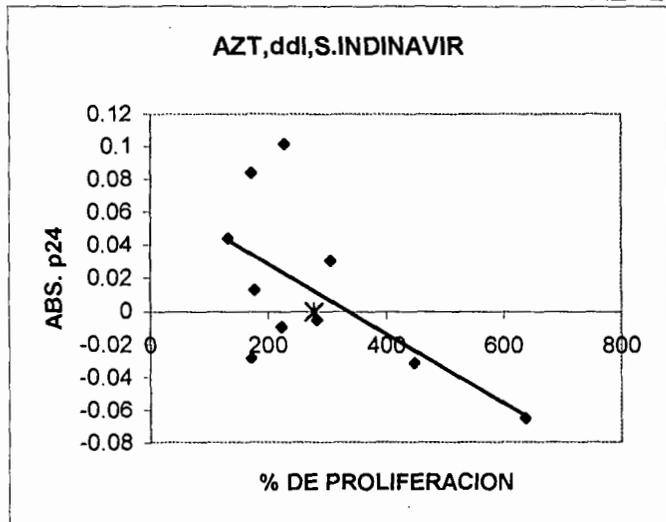
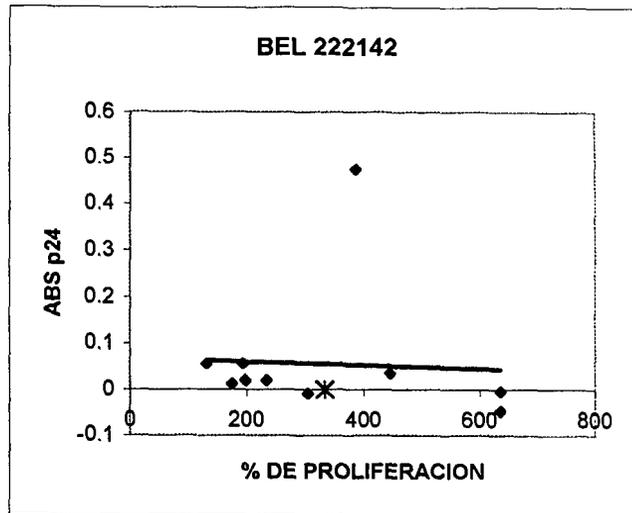
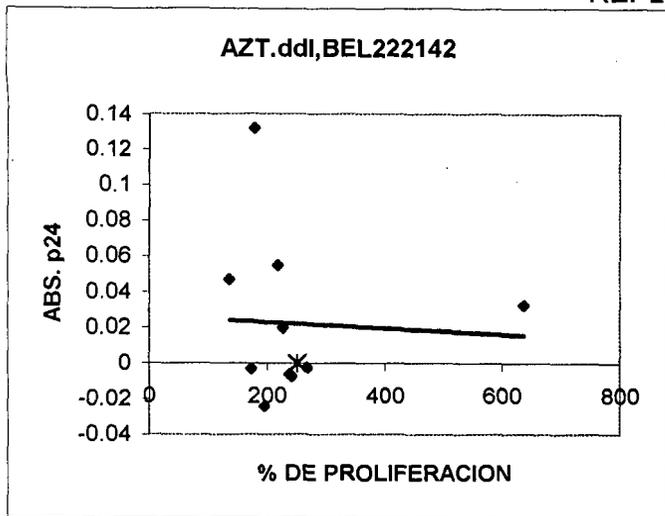


FIGURA 9  
REPLICACION VIRAL



## IX. DISCUSSION.

El BEL222142 solo, es más estimulante de la mitosis de los linfocitos que combinado, lo que comprueba que su composición basada en mediadores de la respuesta inmune sí tiene un efecto proliferativo, sobre todo si consideramos que contiene IL-1, que es un activador y mediador de la respuesta inmune en los linfocitos T y B; IL-3, que es un factor estimulante de colonias en hemocitoblastos; IL-6, que participa en la diferenciación, hematopoyesis, activación microbicida contra bacterias Gram (-) y también actúa sobre los linfocitos B como factor de crecimiento y producción de inmunoglobulinas policlonales, actúa como mitógeno para timocitos y células T;  $\text{INF } \alpha$ , que es un antiviral en células epiteliales y fibroblastos;  $\text{TNF } \alpha$  activa y aumenta la adhesividad celular, actúa en macrófagos y polimorfonucleares, coactiva el estado citocida también como quimiotáctico e incrementa la fagocitosis (72-73). Estos y otros componentes del BEL222142 tienen un efecto antiviral y activador de la respuesta inmune integrada. Las concentraciones de estos mediadores de la respuesta inmune son bajas comparadas con las que actualmente se administran halopáticamente a los pacientes y es posible que cualquiera de los componentes del BEL222142 en esta cantidad, no sature los receptores de la célula y ésta responda mejor al estímulo que recibe evitando que se propicie su inhibición.

Con respecto al cultivo, es probable que con ddl hubo un incremento en la proliferación debido a la inhibición de la replicación viral, ya que este medicamento inhibe la transcriptasa reversa al momento de la replicación (25-28), sin embargo falta saber si al haber menor cantidad de virus, hay mas cantidad de linfocitos o si el ddl por si solo, además estimula la proliferación.

Cuando se realizaron los cultivos se formaron grumos de proliferación, lo que no permitió realizar la cuantificación de la subpoblación de los linfocitos CD4+ / CD8+, por lo que no supimos con exactitud cuantas células tenían el marcador de superficie CD4+ o CD8+. El haber contado éstos marcadores expuestos nos hubiera permitido saber si los fármacos utilizados estimulan específicamente la proliferación de los linfocitos CD4+ o CD8+, que son los protagonistas de la respuesta inmune celular.

Las células se trataron de separar con el material que se tenía disponible; así entonces se hicieron cambios en el pH, diferentes concentraciones de tripsina, movimientos suaves a las células (subiendo y bajando en una pipeta Pasteur), diferentes concentraciones de sodio y calcio, y se substituyó el PBS por solución de salina balanceada de Hank's , y solución de Hank's modificada. En ningún caso se logró la separación esperada (74).

Para conocer mejor el efecto linfoproliferativo e inhibitorio de los fármacos estudiados, en un futuro se deberá prolongar el tiempo de cultivo y hacer un

seguimiento tanto de la proliferación como de la carga viral, estableciendo con anterioridad el tiempo total del cultivo, así mismo, el tiempo al que se van hacer los cortes transversales para la medición de la proliferación y carga viral, sin embargo esto será motivo de otro proyecto.

Los inhibidores de las proteasa tienen un efecto lifoproliferativo menor que cualquier otro medicamento utilizado, esto puede ser porque éstos fármacos siempre se administran a los pacientes que ya han recibido una terapia con un inhibidor de la transcriptas reversa, y la mayoría de las veces combinado (42-43).

Se observó que los controles existía una replicación viral mayor que cuando se le añadía algún medicamento, en especial en la combinación de AZT y ddl, que fue la mejor combinación para controlar la replicación viral. Esta disminución en la replicación viral está reportada ya en la literatura (75-77).

## X. CONCLUSIONES

- 1° El BEL222142 tiene un efecto proliferativo de los linfocitos y mantiene constante la replicación viral.
- 2° El AZT combinado con el ddl reduce más la replicación viral que cualquier otra combinación.
- 3° Los inhibidores de las proteasas fueron los que menos estimularon la proliferación de los linfocitos, pero cuando se les combinó con los análogos de los nucleósidos o el BEL222142, aumentaron la proliferación.
- 4° El sulfato de Indinavir reduce la replicación viral, pero ésta es más notoria cuando se combina con los análogos de los nucleósidos.
- 5° Los análogos de los nucleósidos y el BEL222142 al ser combinados reducen su proliferación linfocítica.
- 6° Se requiere hacer nuevos grupos experimentales, donde se pruebe el efecto de la combinación de AZT o ddl con el BEL222142.

- 7° En cada evento experimental, falta por discernir si el aumento de la proliferación es por la disminución de la replicación viral o si ésta es por el aumento de la proliferación linfocítica.
- 8° El Saquinavir tiene mejor control de la replicación viral solo, que combinado con AZT y ddl.
- 9° El modelo experimental utilizado aquí, si permitió parcialmente cumplir con el objetivo de medir la disminución de la carga viral *in vitro* en presencia del BEL222142.
- 10° Motivo de otros trabajos será: hacer la identificación molecular de los receptores que expresan las células en presencia del BEL222142, incrementan, saturan o modifican; comprobar los niveles y la actividad de los mediadores de la respuesta inmune.

## XI. BIBLIOGRAFIA.

- 1° Antoni B.A., Stein S.B., Rabson A.B. Regulation of Human Immunodeficiency Virus infection: implications for pathogenesis. *Advances in virus Research* 1994; 43 : 53.
- 2° Arts E.J., Wainberg M.A. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase and early events in reverse transcriptase. *Advances in Virus Research* 1996; 46 : 97.
- 3° Crowe S., Mills J. Infecciones del sistema inmunitario en Daniel P. Stites. *Inmunología Básica y Clínica, Manual Moderno 7° Edición* 1993: 825.
- 4° Kathleen J.S., Henry G.S. Henry G.S., Kenneth F.W. Pathogenesis of HIV-1 disease. *Int. J. Dermatol.* 1995; 34 .
- 5° Pantaleo G., Fauci A.S.; Immunopathogenesis of HIV infection. *Ann-Rev. – Microbiol.* 1996; 50 : 825.
- 6° Fauci A.S., Pantaleo G., Stanley S., Weissman D. Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. *Ann- Intern- Med.* 1996; 124 : 654.
- 7° Gomez de la Concha E., Gil J., Garcia J.M. Sistema Inmune y enfermedad por VIH. 3087.

- 8° Robison H.L., Rein A., Speack N.A. Avian and Murine Retroviruses en Nathanson. Viral Pathogenesis. Philadelphia, Editorial Lippincott-Raven, 1997: 631.
- 9° O'Brien William A., Pomerantz R.J.; HIV Infection and Associated Diseases en Nathanson. Viral Pathogenesis. Philadelphia, Editorial Lippincott-Raven, 1997: 815-828
- 10° Rafi A., Marrison L., Knipe D.K.; Viral Persistense en Nathanson. Viral Pathogenesis. Philadelphia, Editorial Lippincott-Raven, 1997 : 196-197
- 11° Centers for Disease Control and Prevention. Revision of the CDC surveillance case definition for acquired immunodeficiency syndrome. MMWR. 1987; 36:1s-15s.
- 12° Revets H., Mariessens D., De Wit S., Lacor P., Clumerck N., y col. Comparative Evaluation of Nasba HIV-1 RNA QT, AMPLICOR HIV Monitor, and QUANTIPLEX HIV RNA Assay, Three Methods for Quantification of Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA in Plasma. J Clin Microbiol 1996; 34 : 1058.

- 13° Baker R., Gorther Ch. La Carga viral supera el número de CD4 como índice superior para pronosticar el riesgo de la progresion al SIDA y la mortalidad. BETA, Agosto 1996 : 5.
- 14° Rinaldo Ch., Kingsley L., Neumann J., Reed D., Gupta P., y col. Association of Human Immunodeficiency Virus (HIV) p24 Antigenemia with Decrease in CD4 Lymphocytes and Onset of Acquired Immunodeficiency Syndrome during the early phase of HIV infection. J Clin Microbiol 1989; 27 : 880.
- 15° Wilde MI, Langtry MD. Zidovudine an update of its pharmacodyhamic and pharmacokinetic, and therapeutic efficacy. Drug 1993; 46 : 515.
- 16° HoDD. Neumann Av, Perelson AS, y col. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. Nature 1995; 373 : 123.
- 17° Wei X, Ghosh SK, Taylor ME. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type I infection. Nature 1995; 373 : 117.
- 18° Richman DD. Recistance drug failure and disease progresion. AIDS Res Hum Retroviruses 1994; 10 : 901.

- 19° Boucher C, Lander B. HIV variation. Consequences for antiviral therapy and disease progression. *Rev Med Virol* 1995; 5 : 7.
- 20° Mellors J.W., Rinaldo Jr Ch.R., Gupta P., White R.M., Tood J.A. y col. Prognosis in HIV-1 Infection Predicted by the Quantity of Virus in Plasma. *Science* 1996; 272 : 1167.
- 21° Urdea M.S. Branched DNA Signal Amplification. *Bio/Technology* 1994; 12:926.
- 22° Davey R.T., Lane H.C. Laboratory Methods in the Diagnosis and Prognosis Staging of Infection with Human Immunodeficiency Virus type 1. *Rev Inf Dis* 1990; 12 : 5.
- 23° Groopman J.E. Current Advances in the Diagnosis and Treatment of AIDS: An Introduction. *Rev Inf Dis* 1990; 12 : 1.
- 24° Letter to the Editor; High Quantifiable Levels of p24 Antigenemia are Detectable in HIV Type 1 Infected Patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1996; 12 : 565.
- 25° HIV / AIDS Handbook. Total learning Concepts, Inc., Boston, 1996.

- 26° Godofsky EW, Bach MC. A partial guide to antiretroviral drug use. Contemp Intern Med 1995; 7 : 43.
- 27° West ML, Fairle DP. Targeting HIV-1 protease: a test of drug-design methodologies. Tips 1995; 16 : 6775.
- 28° DeClerq E. Basic approaches to anti-retroviral treatment. J. AIDS 1991; 4 : 207
- 29° Hirsch M.S., Kaplan J.C., D'Aguiila R.T. Antiviral Agents. Viral Pathogenesis. Philadelphia, Editorial Lippincott-Raven, 1997: 412-4
- 30° Furman R.A. y col. Selective inhibition of HTLV-3 by BWA509U. Abstrac 440. 25<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and chemotherapy, Minnesota, October 1985.
- 31° Mitsuya H. Y col. 3'- azido- 3' deoxythymidine (BWA509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III / lymphadenopathy associated virus *in vitro*. Proc Natl Acad Sci. 1985; 82 : 7096.

- 32° Furman P.A. y col. Phosphorylation of azidothymidine and selective inhibition of the HTLV III reverse transcriptase by its triphosphate. Poster 557, International Conference on AIDS Paris, June 1986.
- 33° Katzentein D.A., Winters M., Bupp J., Israelski P., Winger E. y col. Quantitation of Human Immunodeficiency Virus by culture and Long-Term Therapy with Zidovudine. *J Inf Dis* 1994; 169 : 416.
- 34° Kohlstaet LA, Wrang J, Friedman JM, Rice PA, Sieitz T. Crystal structure at 3.5 resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* 1992; 256 :1783.
- 35° Wachsman M, Petty BG, Cundy KC, Jaffe HS, Fisher PE y col. Pharmacokinetics, safety and bioavailability of HPMPC (cidofovir) in human immunodeficiency virus-infected subjects. *Antiviral Res* 1996; 29 : 153.
- 36° Pakker NG; Roos MT, van Leeuwen R, de Jong MD, Koot M, y col. Patterns of T-Cell repopulation, virus load reduction, and restoration of T-Cell function in HIV-infection persons during therapy with different antiretroviral agents. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997; 16 : 318

- 37° Merril D.P., Manion D.J., Ting- Chao Chou, Hirseh M.S. Antagonism between Human Immunodeficiency Virus Type 1 Proteasa Inhibitors Indinavir and Saquinavir *In vitro*. J Inf Dis 1997; 176 : 265.
- 38° McPhee F., Good A.C., Kuntz D.I., Craik Ch. S. Engineering Human Immunodeficiency Virus Type 1 protease heterodimers as macromolecular inhibitors of viral maturation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996; 93 : 11477.
- 39° McQuade T.J., Tomasselli A.G., Liu L., Karacostas U., Moss B. Y col. A Syntetic HIV-1 Protease Inhibitor With Antiviral Activity Arrests HIV-Like Particle Maturation. Science 1990; 247 : 454.
- 40° Kohl N.E., Emini E.A., Schleif W.A., Davis L.J., Heimbach J.C. y col. Active Human Immunodeficiency Virus protease is required for viral infectivity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998; 85 : 4686.
- 41° Nagary K., Young M., Baboonian Ch., Merson J., Whittle P. y col. Antiviral Activity of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease Inhibitors in a single Cycle of Infection: Evidence for a role of Protease in the Early Phase. J Virol 1994; 68 : 757.

- 42° Misson J, Clark W, Kendall MJ. Therapeutic advances: proteas inhibitors for the treatment of HIV-1 infection. *J Clin Pharm Ther* 1997; 22 : 109.
- 43° Introducing new Invirase, a major advances in HIV treatment. Roche 1996; 1 – 14.
- 44° Alonso K, Pontiggia P, Mendenica R, Rizzo S. Cytokine patterns in adults with AIDS. *Immunol Invest* 1997; 26 : 341.
- 45° Poli G, Fauci A. Role of cytokines in the pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. En: Aggarwal B, Puri, ed *Human cytokines: their role in disease and therapy*. Cambridge, MA: Blackwell Science; 1995 421.
- 46° Boyle MJ, y col. Incresed expression of interferon-gamma in hyperplastic lymph nodes from HIV-infected patientes. *Clin Exp Immunol* 1993; 92 : 100.
- 47° Graziosi C, y col. Lack of evidence for the dichotomy of TH1 and TH2 predominance in HIV- infected individuals. *Science* 1994; 265 : 248.

- 48° Graziosi C, y col. Kinetics of Citokine expression during primary human immunodeficiency virus type 1 infection. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93 : 4386.
- 49° Clerici M, y col. Restoration of HIV-specific cell- mediated immune responses by interleukin 12 *in vitro*. Science 1993; 262 : 1721.
- 50° Maggi E, y col. Ability of HIV to promote a TH1 to TH0 shift and to replicate preferentially in TH2 and TH0 cells. Science 1994; 265 : 244.
- 51° Meyaard L, Otto S, Keet I, vanLier R, Miedema F. Changes in cytokine secretion patterns of CD4 + T-cell clones in human immunodeficiency virus infection. Blood 1994; 84 : 4262.
- 52° Poli G, Fauci AS. Cytokines modulation of HIV expresion. Semin Immunol. 1993; 5 : 165.
- 53° Zhou P, Goldstein S, Devada K, Tewari D, Notkins A. Human CD4+ cells transfected with IL-16 cDNA are resistant to HIV infection: inhibition of mRNA expresion. Nat Med 1997; 3 : 659.

- 54° Naif H, Li S, Ho-Shon M, Mathijs J, Williamson P, Cunningham A. The state of maturation of monocytes into macrophages determines the effects of IL-14 and IL-13 on HIV replication. *J Immunol* 1997; 158 : 501.
- 55° Poli G, et al. Interleukin 6 induces human immunodeficiency virus expression in infected monocytic cells alone and in synergy with tumor necrosis factor alpha by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J Exp Med* 1990; 172 : 151.
- 56° Schuitemaker H, et al. Proliferation dependent HIV-1 infection of monocytes occurs during differentiation into macrophages. *J Clin Invest* 1992; 89 : 1154.
- 57° Poli G, Kinter AL, Justement JS, Bressler P, Kehrl JH, Fauci AS. Transforming growth factor beta suppresses human immunodeficiency virus expression and replication in infected cells of the monocyte/macrophage lineage. *J Exp Med* 1991; 173 : 589.
- 58° Goletti D, Kinter AL, Hardy EC, Poli G, Fauci AS. Modulation of endogenous IL-1beta and IL-1 receptor antagonist results in opposing effects on HIV expression in chronically infected monocytic cells. *J Immunol* 1996; 156 : 3501.

- 59° Clerici M y col. Pentoxifyline improves cell- mediated immunity and reduces human immunodeficiency virus (HIV) plasma viremia in asymptomatic HIV- seropositive persons. *J Infect Dis* 1997; 175: 1210.
- 60° Masood R y col. IL-10 inhibits HIV-1 replication and is induced by tat. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 202 :374.
- 61° Seder R, Grabstein K, Berzofsky J, McDyer J. Cytokine interactions in human immunodeficiency virus- infected individuals: roles of interleukin (IL)-2, IL- 12 and IL- 15. *J Exp Med* 1995; 182 : 1067.
- 62° Gately M, Mulqueen M. Interleukin- 12: potential clinical applications in the treatment and prevention of infectious diseases. *Grugs* 1996; 52 : 18.
- 63° Theodore A, Center D, Nicoll J, Fine G, Kornfeld H, Cruikshank W: CD4 ligand IL-16 inhibits the mixed lymphocyte reaction. *J Immunol* 1996; 157: 1958.
- 64° Walker CM, Moody DI, Stites DP, Levy JA. CD8+ lymphocytes can control HIV infection in vitro by cuppressing virus replication. *Science* 1986; 234 : 1563.

- 65° Walker CM, Erickson AL, Hsueh FC, Levy JA. Inhibition of human immunodeficiency virus replication in acutely infected CD4+ cells by CD8+ cells involves a noncytotoxic mechanism. *J Virol* 1991; 65 : 5921.
- 66° Mackewicz CE, Oretaga H, Levy JA. Effect of cytokines on HIV replication in CD4+ lymphocytes: lack of identity with the CD8+ cell antiviral factor. *Cell Immunol* 1994; 153 : 329.
- 67° Cocchi F, DeVico A, Garzino-Demo A, Arya S, Gallo R, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 $\alpha$ , and MIP-1 $\beta$  as the major HIV suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 1995; 270 : 1811.
- 68° Bonhodi M.L., Su L., Auten J., McCune J.M., Kaneshima H. Development of a Human Thymic Organ Culture for the study of HIV Pathogenesis. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995; 11 : 1073.
- 69° Gervaix A., West D., Leoni L.M., Richman D.D., Wong-Staal F., Corbeil J. A new reporter cell line to monitor HIV Infection and drug susceptibility *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997; 94 : 4653.
- 70° Mosmann T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to proliferation and Cytotoxicity Assay. *J Immun Meth* 1983; 65 : 55.

- 71° Current Protocols in Immunology 1991 3.15.5 – 6, 6.3.6 – 7,7.10.3. .5.
- 72° Oppenheim JJ, Ruscetti FW, Faltynek C. Citocinas en Daniel P. Stites. Inmunología Básica y Clínica, Manual Moderno 7° Edición 1993: 85.
- 73° Janeway CA, Travers P, Hunt S, Walport. T-Cell Mediated Immunity. Immunology e Immunobiology Ed. Current Biology Limited 1997 : 7.1.
- 74° Pollard JW, Walker JM. Animal Cell Culture. Ed Human Press Clifton, New Jersey. 1990.
- 75° Uchida H, Maeda Y, Mitsuya H. HIV-1 Protease does not play a critical role in the early stages of HIV infection. Antiviral- Res. 1997; 36 : 107.
- 76° Zackin R, Wei L J. Analysis of repeated virological measurements based on cell dilution assays. Stat Med 1997; 15 : 571.
- 77° Solder B, Wintergerst U, Notheis G, Eberle J, Gluter L y col. Effect of antirretroviral combination therapy (AZT / ddI or AZT / 3TC) on quantitative plasma human immunodeficiency virus ribonucleic acid in children and adolescents infected with human immunodeficiency virus. J- Pediatric 1997; 130 : 293.