

El extracto dializable de leucocitos protege a las células de la infección por el VIH antes de la duplicación del cultivo celular

✉ Celia Fernández-Ortega¹, Marta Dubed², Giselle Álvarez², Leonor Navea², Dionne Casillas¹, Anna Ramírez¹, Leonor Lobaina², Taimí Paneque¹, Enrique Noa²

¹Departamento de Biología Celular, Investigaciones Biomédicas
Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB
Ave. 31 e/ 158 y 190, Cubanacán, Playa, CP 10600, Ciudad de La Habana, Cuba

²Laboratorio de Investigaciones sobre el SIDA, San José, La Habana, Cuba
E-mail: celia.fernandez@cigb.edu.cu

RESUMEN

La combinación de retrovirales como estrategia terapéutica para tratar a los enfermos con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), no erradica la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), de ahí que continúe la búsqueda de otros agentes terapéuticos para el tratamiento de esta enfermedad. Utilizando un sistema de estudio *in vitro* de la línea celular humana MT4, nuestro grupo demostró el efecto inhibitorio del extracto dializable de leucocitos (EDL) en la replicación del VIH. En publicaciones previas reportamos que la replicación del virus se inhibía cuando se trataban las células con este derivado leucocitario por tiempo prolongado antes del reto viral. Los resultados del presente ensayo demostraron que los cultivos de células MT4 no necesitan duplicarse para que ocurra la inhibición del VIH mediada por el EDL, y el efecto inhibitorio de la replicación viral se puede constatar siempre que se pretraten las células por un período igual o mayor que 24 horas. Esta inhibición no puede observarse cuando el tiempo de pretratamiento es corto, lo que sugiere que el mecanismo de inhibición desencadenado por el EDL parece estar más relacionado con la modificación de factores celulares, que con la acción directa sobre la partícula viral, sin descartar la posibilidad de modificación de factores virales durante el desarrollo del ciclo viral.

Palabras clave: extracto dializable de leucocitos, factor de transferencia, VIH, MT4, actividad anti-VIH, virus Sendai, SIDA

Biotecnología Aplicada 2008;25:141-144

ABSTRACT

Protection of cells against HIV infection by the Dialyzable Leukocyte Extract prior to cell culture duplication.

The search for new therapeutic agents to treat the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) continues, since therapeutic anti-retroviral combinations already employed to treat AIDS patients do not eradicate the human immunodeficiency virus (HIV) infection. Our group recently demonstrated the inhibitory effect of the Dialyzable Leukocyte Extract (DLE) on HIV replication in cells, by using an *in vitro* assay system in the human MT4 cell line. We have also reported a long-term inhibition of viral replication when cells were treated with this leukocyte derivative, prior to viral challenge. In the present trial, our results showed that the DLE-mediated inhibition of HIV in cultured MT4 cells did not depend on cellular duplication, and its inhibitory effect on viral replication is achieved by cellular exposure to DLE for at least 24 h. Inhibition is absent when cells are incubated for shorter periods of time, suggesting that the inhibitory mechanism triggered by DLE is more strongly related to the modification of cellular factors than to its direct action on the viral particle. Modification of viral factors during the virus replication cycle is also considered.

Keywords: Dialyzable Leukocyte Extract, Transfer factor, HIV, MT4, anti-HIV activity, Sendai virus, AIDS

Introducción

Las drogas inmunomoduladoras pueden restaurar o aumentar la capacidad de respuesta de citocinas u otros factores endógenos, mediante la maduración, diferenciación o proliferación de las células claves para los mecanismos de defensa del organismo, con lo que se incrementa la resistencia del hospedero a las infecciones por bacterias, parásitos y virus [1, 2].

El extracto dializable de leucocitos (EDL) es una preparación que se obtiene de leucocitos humanos sanos, y tiene diferentes efectos sobre el sistema inmune. Se utiliza en el tratamiento de enfermedades causadas por virus, parásitos, hongos, micobacterias y en el cáncer, entre otras [3]. Lawrence [4] reportó que la administración de extractos leucocitarios a individuos que no desarrollan hipersensibilidad retardada frente a un antígeno, permite que reaccionen con este tipo de inmunidad celular. Esa actividad de los

extractos leucocitarios se denominó factor de transferencia (FT), bajo el supuesto de que en ellos existen moléculas que transfieren inmunidad mediada por células de un individuo a otro. La literatura recoge el empleo de los términos EDL y FT indistintamente, a pesar de que algunos autores plantean que se debe utilizar FT para definir los componentes del EDL que median respuestas T específicas de antígeno [5].

Además de transferir inmunidad mediada por células, el EDL ejerce otros efectos sobre las funciones del sistema inmune, en particular sobre la inmunidad mediada por células, tales como la liberación de citocinas, la velocidad de regeneración del receptor CD2 en células T, la activación de monocitos-macrófagos y la quimiotaxis [6-8].

En la década de 1970, a pesar de contar con poca información acerca de la composición y el modo de ac-

1. McGaha T, Murphy JW. CTLA-4 down-regulates the protective anticytotoxic cell-mediated immune response. *Infect Immun* 2000;68(8):4624-30.

2. Guarna M, Yang H, Glavas N, Deng Y, Dullaghan E, Mookherjee N, et al. IDRs as Novel Immunomodulators. *J Immunol* 2007;178:B208.

3. Cabezas R, Estrada S, Abdo A, Selman M, Chávez R, Estrada I, Berrón R, Fernández-Ortega C, Vidal V. *Inmunoterapia con Factor de Transferencia II*. CIMEQ-IPN Press, 1997.

4. Lawrence HS. Transfer Factor in cellular immunity. In: *The Harvey Lectures*. Academic Press; 1974;239-350.

5. Fudenberg HH, Piza G. Transfer Factor: New frontiers. In: Jucker E, editor. *Progress in Drug Research*. Verlag Press; 1994;42:309-400.

ción del EDL, se comenzó a utilizar en pacientes con el síndrome de Wiskott-Aldrich de manera satisfactoria en aproximadamente la mitad de ellos. A partir de entonces, este producto se empleó para tratar numerosas enfermedades de diferente causa [9], con resultados beneficiosos; entre ellas, la candidiasis mucocutánea, el herpes simple, el herpes zóster, las infecciones crónicas, la sepsis y la hepatitis B. Varios investigadores han utilizado el EDL o sus derivados para tratar individuos infectados por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) en la etapa asintomática y en la de síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), y han logrado la reconstitución inmune parcial [10], la disminución de enfermedades oportunistas [11], y una mejoría en la condición clínica de los pacientes [12]. En Cuba se hizo un estudio clínico de seis años de seguimiento con una preparación cubana de EDL para tratar individuos asintomáticos infectados por el VIH [13]. En el 28% de los individuos no tratados se observó la progresión de la enfermedad, mientras que solo hubo progresión en el 7% de los tratados con EDL [14].

Estos resultados indicaron que la preparación retarda la progresión de la enfermedad; sin embargo, las bases moleculares que sustentan el efecto no están del todo esclarecidas. Utilizando un modelo de infección *in vitro* en la línea celular MT4, nuestro grupo demostró el efecto inhibidor del VIH en células tratadas con EDL antes del reto viral [15, 16]. No se conoce el mecanismo por el cual el EDL inhibe la replicación *in vitro* del VIH. En esta investigación se estudió el tiempo de pretratamiento que requieren los cultivos de células MT4 tratadas con EDL, para que ocurra la disminución de los niveles de producción del VIH. Como no se pudo demostrar tal efecto en períodos cortos de pretratamiento, se investigó si se requería la duplicación de la población de células en el cultivo.

Materiales y métodos

Extracto dializable de leucocitos

Se utilizó sangre total certificada de donantes sanos para obtener los concentrados leucocitarios por centrifugación, y se almacenaron a 4 °C por menos de 24 h. Los concentrados leucocitarios se añadieron a una solución estéril y fría de NH₄Cl (concentración final: 0.83%), en la que se realizó la hemólisis. Luego se centrifugaron de manera continua a 3000 rpm a una velocidad de flujo de 1 L/3.5 min. El sedimento del rotor se resuspendió en PBS (tampón fosfato salino, del inglés, *Phosphate-Buffered Saline*) frío con 17% v/v de suero humano libre de gamma globulinas (agamma) y neomicina a 50 µg/mL. Se añadió una solución de NH₄Cl al 0.83%, se incubó durante 10 min a 4 °C y se centrifugó a 4 °C. Las células se resuspendieron en medio de cultivo MEM (del inglés, *Minimum Essential Medium*) con suero agamma a 1.8 mg de proteínas/mL y neomicina a 50 µg/mL, a 4 °C, y se agitaron en una zaranda orbital a 15 rpm, a 4 °C, de 15 a 20 min. La suspensión celular se ajustó a 1.2 x 10⁷ células/mL y se incubó a 37 °C en agitación durante una hora. Se añadieron 200 U/mL de IFN α como estimulante y se incubaron en agitación. A las dos horas de incubación, se añadió virus Sendai a una concentración final de 150 UHA/mL, y se incubó durante 18 horas. Posteriormente, el cultivo se centrifugó, y las células pro-

venientes de la centrifugación se lavaron con PBS y se almacenaron a -20 °C. Las células se sometieron a diez procesos consecutivos de congelación y descongelación, y a continuación a ruptura ultrasónica en tres ciclos de 15 segundos cada uno, con intervalos de 60 segundos a una potencia de salida de 100 W/min y regularidad continua. Seguidamente, las células se dializaron a vacío, a una temperatura de 4 °C durante 24 horas, utilizando PBS; luego se esterilizó el líquido externo por filtración, con el empleo de una membrana de 0.2 µm a una presión menor de 2 atm. Se consideró que 1 U de EDL equivale al dializado obtenido a partir de 5 x 10⁸ leucocitos.

Ensayo de actividad antiviral contra el VIH

La línea celular MT4 se cultivó en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂. Durante 24; 72 horas o 7 días se trataron las células con diferentes dosis de EDL (0.15 y 0.3 U/mL). Al tercer día se realizó el cambio del medio de cultivo, y se garantizó la presencia de EDL. Posteriormente, se procedió a la infección con la cepa viral VIH-1Bru a diferentes multiplicidades de infección (m.o.i., del inglés, *multiplicity of infection*; 0.05 y 0.1) de las células tratadas con EDL y de las que no se trataron. Durante una hora se realizó el reto viral, y después las células MT4 se mantuvieron en cultivo durante 7 días, en presencia de la preparación de EDL o sin ella. Se incluyó un control de células (células sin tratamiento) y un control viral (células sin tratamiento y retadas con el virus). Para determinar la presencia del antígeno p24, se colectaron los sobrenadantes de cultivo.

Determinación del antígeno p24

La presencia del antígeno viral p24 en los sobrenadantes de cultivo se evaluó con un método de ELISA (DAVIHAgp24, Cuba), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Todas las determinaciones se hicieron en tres réplicas. Los resultados se expresaron en por ciento de inhibición:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \frac{\text{Agp24 del cultivo control de virus} - \text{Agp24 del cultivo tratado con EDL}}{\text{Agp24 del cultivo control del virus}} \times 100$$

Curva de crecimiento

Las células MT4 se sembraron a 1.4 x 10⁵ o 2.5 x 10⁵ células/mL en medio RPMI-1640 con 10% de SFB en placas de cultivo y se incubaron a 37 °C en atmósfera de 5% de CO₂. Los cultivos se sembraron por triplicado. La cantidad de células totales se determinó por recuento en cámara de Neubauer a las 7, 12 y 24 horas, y posteriormente cada 24 horas durante 7 días. Su viabilidad se determinó por el método de exclusión en azul de Tripán. El tiempo de doblaje se definió como el tiempo en que se duplica el número de células en cultivo durante la fase exponencial de crecimiento.

Resultados

Efecto del EDL sobre la infección por VIH en células MT4

Para los estudios *in vitro* se utilizó la línea celular MT4, por su elevada susceptibilidad a la infección

6. Borkowsky W, Lawrence HS. Effects of human Dialyzable Leukocyte Extract on the leukocyte migration inhibition assay. In: Khan A, Kirkpatrick CH, Hill NO, editors. Immune regulators in Transfer Factor. Academic Press; 1989, p. 181-90.

7. Zelck U, Karnstedt U, Cech K, Barnet K, Pekarek J. On the mode of action of transfer factor on the cellular level: modulation of the Ca²⁺ transport at the macrophage and the thymocyte membrane. In: Mayer V, Borvak J, editors. Leukocyte Dialysates and Transfer Factor. SAS Press; 1987, p. 146-52.

8. Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Miranda-Hernández D, Zapata-Benavides P, Castillo-León L, Izama-Brando C, et al. *In vitro* effects of bovine dialyzable leukocyte extract (bDLE) in cancer cells. *Cytotherapy* 2006;8(4):408-14.

9. Pineda B, Estrada-Parra S, Pedraza-Medina B, Rodríguez-Ropon A, Pérez R, Arrieta O. Interstitial transfer factor as adjuvant immunotherapy for experimental glioma. *J Exp Clin Cancer Res* 2005; 24(4):575-83.

10. Gottlieb AA, Gottlieb MS. Clinical and biological effects of IMREG-1 and IMREG-2, two immunologically active components of leukocyte dialysates. In: Fujisawa T, Sasakawa S, Likura Y, Komatsu F, Yamaguchi Y, editors. Recent Advances in Transfer Factor and Dialyzable Leukocyte Extracts. Maruzen Press; 1991, p. 3-10.

11. McMeeking A, Borkowsky W, Klesius PH, Bonk S, Holzman RS, Lawrence HS. A controlled trial of Bovine Dialyzable Leukocyte Extract for Cryptosporidiosis in patients with AIDS. *J Infect Dis* 1989; 161: 108-12.

12. Pizza G, Chiodo F, Colangeli V, Griffl F, Raise E, Fudenberg HH, et al. Preliminary observations using HIV-specific transfer factor in AIDS. *Biotherapy* 1996;9:41-7.

13. Fernández-Ortega C, López Saura P. Obtención y caracterización del Factor de Transferencia de leucocitos que produjeron Interferón. In: Memorias del II Seminario Internacional de Interferón y I Seminario de Biotecnología. Navagraf Press; 1986, p.10-15.

14. Rivero J, Miró A, Rosario M, López-Saura P. Efecto del IFN α o del Factor de Transferencia en la supervivencia de individuos asintomáticos infectados por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana. *Biotecnología Aplicada* 1995;12(3):161-2.

15. Fernández-Ortega C, Dubed M, Ruibal I, Vilarrubia OL, Menéndez JC, Navea L, et al. Inhibition of *in vitro* HIV infection by Dialyzable Leukocyte Extract. *Biotherapy* 1996;9:33-40.

16. Fernández-Ortega C, Dubed M, Ramos Y, Navea L, Álvarez G, Lovaina L, et al. Non-induced leukocyte extract reduces HIV replication and TNF secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;325: 1075-81.

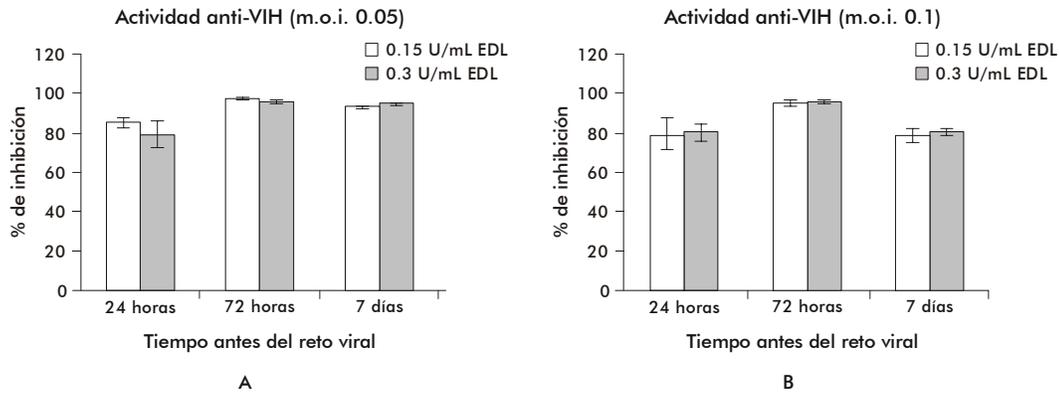


Figura 1. Efecto del tratamiento con EDL sobre la replicación del VIH. La concentración de las células MT4 se ajustó a 2.5×10^5 cel/mL y se trataron durante 24, 72 horas o 7 días con 0.15 o 0.3 U/mL de EDL. Posteriormente se lavaron e infectaron con 0.05 m.o.i (A) y con 0.1 m.o.i (B) de virus VIH-1 Bru. Después del reto viral, se eliminó el virus, se añadió medio fresco al cultivo con EDL o sin este, y se colectaron los sobrenadantes a los 7 días, para determinar los niveles de Ag p24. Los resultados se expresaron como por ciento de inhibición con relación al control de células no tratadas con EDL, y son representativos de tres experimentos por separado. Las barras de error significan la desviación estándar.

por el VIH [17]. Mediante la prueba de viabilidad celular con azul de Tripán, se determinaron las concentraciones de EDL no tóxicas para esta línea celular. Los cultivos de células MT4 se iniciaron con una viabilidad mayor del 95%.

El pretratamiento de las células MT4 con EDL se realizó durante 24, 72 horas o 7 días antes de efectuar el reto viral, y se mantuvo durante la incubación después del reto. Luego de pretratar las células durante 7 días antes del reto viral, las dosis de EDL provocaron una inhibición mayor que 90% de la replicación viral en presencia de una concentración viral de 0.05 m.o.i. (Figura 1A). Este efecto se observó también cuando los cultivos se sometieron a la acción de dosis virales mayores (m.o.i. 0.1), en que hubo una inhibición viral igual o mayor que 80% (Figura 1B). En cada variante experimental se evaluaron dos concentraciones de EDL, y el efecto inhibitorio sobre la replicación viral se pudo demostrar aun cuando se utilizó la menor concentración de EDL.

Luego de este resultado se estudiaron tiempos menores de preincubación. Al tratar las células durante 72 horas, se obtuvieron valores de inhibición de la replicación viral mayores que 90% con la menor dosis de virus empleada (Figura 1A) y con la dosis más alta (Figura 1B). Ambas concentraciones de EDL mostraron actividad anti-VIH.

Cuando las células se sometieron a 24 horas de preincubación con el EDL, se observó una reducción de la replicación viral igual o mayor que 80%, mediante la medición del antígeno p24 presente en los sobrenadantes del cultivo a la dosis viral de 0.05 m.o.i. (Figura 1A). Este efecto se repitió al evaluar la dosis de 0.1 m.o.i. (Figura 1B). Igual que en las variantes experimentales anteriores, se evidenció el efecto sobre la replicación viral, aun a concentraciones bajas de EDL.

Determinación del tiempo de doblaje de la población de células MT4

Para conocer el tiempo de doblaje de la línea celular MT4 sobre la cual se evaluó la actividad anti-VIH del EDL, se realizó una curva de crecimiento, partiendo de una densidad celular de 140 000 o 250 000 célu-

las/mL. Se obtuvo una curva de crecimiento exponencial típica de una línea celular continua. El tiempo promedio de doblaje fue 35 horas y se determinó durante la fase exponencial de crecimiento de la línea (Figura 2).

Discusión

La incidencia mundial de la infección por VIH continúa elevada, a pesar de la intensa investigación y búsqueda de estrategias de intervención terapéutica por más de un cuarto de siglo. El desarrollo de más de dos docenas de terapias antirretrovirales para combatir la infección por el VIH, provocó una eficaz disminución de la morbilidad y la mortalidad asociada con el SIDA en países desarrollados [18]. Pese al desarrollo de estas exitosas estrategias terapéuticas, no se ha podido erradicar la infección por el VIH [19, 20] ni su expansión: se estiman 14 000 nuevos casos diarios [18]. La naturaleza de la interacción entre el VIH y el sistema inmune es compleja, y la relevancia de las diferentes respuestas

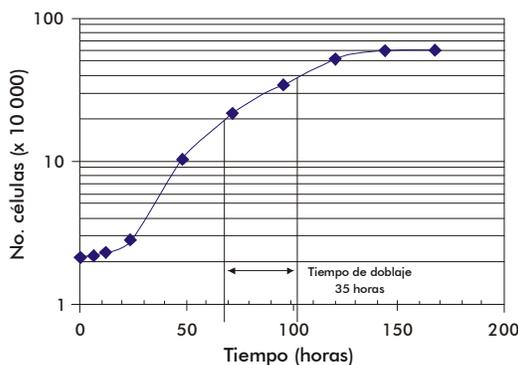


Figura 2. Curva de crecimiento de la línea celular MT4. La línea celular MT4 se sembró en placas de cultivo a 2.5×10^5 células/mL, en medio RPMI-1640 con 10% de SFB, y se incubaron a 37 °C en atmósfera de 5% de CO₂. Los cultivos se realizaron por triplicado. La concentración de células totales se determinó por recuento en cámara de Neubauer a las 7, 12 y 24 horas, y posteriormente cada 24 horas. Los conteos se hicieron además, a las 7 y 12 horas de iniciado el cultivo. El tiempo de doblaje por ploteo se determinó en una escala log-lineal. Los resultados son representativos de cinco experimentos.

17. Boxus M, Twizere JC, Legros S, Dewulf JF, Kettmann R, Willems L. The HTLV-1 Tax interactome. *Retrovirology* 2008;5:76.

18. Johnston MI, Fauci AS. An HIV Vaccine-Evolving Concepts. *N Engl J Med* 2007; 356:2073-81.

inmunes para el control de la infección se comprende solo parcialmente. Parece improbable la normalización completa del sistema inmune y la eliminación del virus: se requiere un incremento de la respuesta inmune específica e inespecífica del hospedero, por lo que debe haber un mayor énfasis en las investigaciones con inmunoterapias dirigidas a la preservación y al incremento de la inmunidad contra el VIH. Además, aunque los costos de la terapia antirretroviral han bajado de manera considerable, en el escenario mundial, 5 millones de pacientes con VIH/SIDA que necesitan tratamiento, no tienen acceso a la terapia [21].

Ello ha llevado a la constante búsqueda de nuevas drogas que inhiban su replicación o restablezcan el sistema inmune. La evaluación de la actividad antiviral de sustancias químicas o naturales candidatas a drogas terapéuticas, se realiza mediante sistemas *in vitro* con líneas celulares susceptibles a la infección por el VIH. Con frecuencia se utilizan las líneas CEM, U1 y MT4 [22-24]. Numerosas investigaciones indican el uso de las células MT4 en estudios *in vitro* relacionados con la infección por VIH-1. Ross y colaboradores demostraron que las células MT4 son una de las líneas linfoblastoides CD4⁺ más susceptibles a la infección por este virus [25].

Los resultados de esta investigación confirman la actividad anti-VIH del EDL. Los valores de inhibición de la replicación del VIH en células MT4 alcanzaron entre 80 y 90%, aun cuando las células se trataron con el doble de la dosis de virus y se trataron con la menor dosis del extracto. Este inhibió la replicación del VIH a los 7 días de pretratamiento y en tiempos de pretratamiento más cortos: a las 72 horas, incluso, a las 24 horas. En 1987 se reportó el efecto inhibitorio de un extracto similar sobre la replicación *in vitro* del VIH en cultivo de linfocitos [26]. Este efecto se obtuvo por tratamiento de los linfocitos una hora después de la infección, y se describió la inhibición de la reverso transcriptasa (RT). Las condiciones anteriores no se han evaluado en este sistema, pero es poco probable un resultado similar si se considera que el EDL de este estudio no influye en la expresión del VIH a corto tiempo, según el sistema de evaluación de referencia de drogas anti-VIH establecido en MT4 [15]. Hasta hoy, ningún otro reporte ha confirmado esos resultados. El empleo de diferentes preparaciones de EDL y modelos *in vitro* de replicación del VIH, hace difícil cualquier otra comparación.

Estos resultados demuestran que la actividad anti-VIH lograda por el tratamiento con EDL es un efecto sostenido que se observa cuando los cultivos se tratan durante 24 horas o más antes del reto viral. El hecho de que el tiempo de contacto de las células con el EDL antes del reto viral no requiera de varios días, potencia sus posibilidades como agente anti-VIH. Hoy, la progresión del VIH a SIDA puede controlarse significativamente con drogas antirretrovirales, por lo que la

concepción terapéutica actual es mejorar la respuesta inmune para actuar de manera sinérgica con la terapia antirretroviral [27]. El EDL, a la vez que presenta actividad anti-VIH, modula diferentes efectores del sistema inmune, como citocinas y factores de transcripción, además de que restablece las poblaciones leucocitarias en individuos con tratamiento, lo que lo convierte en una droga terapéutica potencial que se podría combinar con antirretrovirales. Otros biomoduladores con elevada capacidad de inhibición viral serán difíciles de utilizar, como las quimiocinas, debido al alto riesgo de causar inflamación y de activar células del sistema inmune [28].

La proliferación celular transcurre de un modo controlado, según las necesidades del organismo. La regulación del ciclo celular ocurre de diferentes formas, de acuerdo con el tipo celular: algunas células se dividen rápidamente mientras otras incluso pierden la capacidad de dividirse. En esta investigación se realizó la curva de crecimiento de la línea celular MT4 y se determinó el tiempo de doblaje de las células mediante el ploteo semilog [29, 30]. Ello permitió conocer que no se requieren varios ciclos de división celular para lograr la inhibición de la replicación del virus por el EDL.

Se pudo constatar, además, que la densidad del cultivo de células MT4 es mayor después de 24 horas de cultivo que a las 3 horas. La inhibición de la replicación viral no se detecta cuando los cultivos celulares se tratan con EDL durante 3 horas. Ello demuestra que para que ocurra la actividad anti-VIH, es necesario que haya más células en el cultivo, que produzcan mayor cantidad de uno o varios factores que modifiquen algunos de los factores endógenos celulares que actúan directa o indirectamente sobre el ciclo viral. Sin embargo, los resultados de este estudio indican que dichos factores no se requieren en concentraciones demasiado elevadas, ya que los cultivos celulares no llegan a duplicarse a las 24 horas, tiempo en el cual, en presencia del EDL, se puede observar un efecto inhibitorio sobre la replicación viral. Estos resultados aportan datos que contribuyen a esclarecer la vía por la que el EDL actúa como anti-VIH. Entender el mecanismo de acción del EDL será, sin dudas, muy útil para el diseño de nuevas drogas antivirales.

Si el período de pretratamiento se reduce a 3 horas, no es posible demostrar el efecto inhibitorio del EDL sobre la replicación del VIH, por lo que este parece estar más relacionado con la modificación de factores celulares, que con la partícula viral; aunque no se puede descartar la posibilidad de modificación de factores virales.

En estudios previos, nuestro grupo demostró que el EDL inhibe varios factores celulares involucrados en la fisiopatología del VIH como el TNF α [16] y los factores de transcripción NF κ B y Sp1 [31]. Actualmente investigamos otros factores que puedan mediar la actividad anti-VIH del EDL.

19. Chun TW, Justement JS, Moir S, Hallahan CW, Maenza J, Mullins JI, et al. Decay of the HIV Reservoir in Patients Receiving Antiretroviral Therapy for Extended Periods: Implications for Eradication of Virus. *J Infect Dis* 2007;195:1762-4.

20. Knoll B, Lassmann B, Temesgen Z. Current status of HIV infection: a review for non-HIV-treating physicians. *Int J Dermatol* 2007;46:1219-28.

21. Giuliano M, Vella S. Inequalities in health: access to treatment for HIV/AIDS. *Ann Ist Super Sanita* 2007;43(4):313-6.

22. Balzarini J, Schols D, Van Laethem K, De Clercq E, Hocková D, Masojdiková M, et al. Pronounced *in vitro* and *in vivo* antiretroviral activity of 5-substituted 2,4-diamino-6-[2-(phosphonomethoxy)ethoxy]pyrimidines. *J Antimicrob Chemother* 2007;59(1):80-6.

23. Guan Y, Whitney JB, Deterio M, Wainberg MA. Construction and *in vitro* properties of a series of attenuated Simian Immunodeficiency Viruses with all accessory genes deleted. *J Virology* 2001;75(9):4056-67.

24. Violot S, Hong SS, Rakotobe D, Petit C, Gay B, Moreau K, et al. The human polycomb group EED protein interacts with the Integrase of Human Immunodeficiency Virus type 1. *J Virology* 2003;77(3):12507-22.

25. Ross E, Buckler-White A, Rabson A, Englund G, Martin M. Contribution of NF κ B and Sp1 binding motifs to the replicative capacity of Human Immunodeficiency Virus type 1: distinct patterns of viral growth are determined by T-cell types. *J Virology* 1991;65:4350-8.

26. Schmidtmayerova H, Chermann JC, Rey F, Barre-Sinoussi F, Mayer V. The effect of the lysed leukocyte ultrafiltrate on the HIV: *in vitro* study. In: Mayer V, Borvak J (editors). *Leukocyte Dialysates and Transfer Factor*. SAC Press; 1987, p. 366-76.

27. Weiss RA. Twenty-five years of human immunodeficiency virus research: successes and challenges. *Clin Exper Immunol* 2008;152:201-10.

28. Liang X. CXCR4, Inhibitors and Mechanisms of Action. *Chem Biol Drug Des* 2008;72:97-110.

29. Machado C, Schenka A, Vassallo J, Tamashiro W, Gonçalves E, Genaro S, et al. Morphological characterization of a human glioma cell line. *Cancer Cell Int* 2005;5:13-8.

30. Cabané P, Díaz JC, Rojas J, Maluenda F, Rencoret G, Saud K, et al. Optimización de cultivos de hepatocitos humanos para estudios de citotoxicidad. *Rev Chilena Cirugia* 2007; 59:116-21.

31. Ojeda M, Fernández-Ortega C, Araña M. Dialyzable leukocyte extract (DLE) suppress in unstimulated MT4 cells the activity of essential transcription factors for HIV-1 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 273:1099-103.

Recibido en enero de 2008. Aprobado en junio de 2008.