

Research

Open Access

## Interaction of silver nanoparticles with HIV-1

Jose Luis Elechiguerra<sup>1</sup>, Justin L Burt<sup>1</sup>, Jose R Morones<sup>1</sup>, Alejandra Camacho-Bragado<sup>2</sup>, Xiaoxia Gao<sup>2</sup>, Humberto H Lara<sup>3</sup> and Miguel Jose Yacaman<sup>\*1,2</sup>

Address: <sup>1</sup>Department of Chemical Engineering, The University of Texas at Austin, Austin, Texas 78712, USA, <sup>2</sup>Texas Materials Institute, The University of Texas at Austin, Austin, Texas 78712, USA and <sup>3</sup>Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, Mexico

Email: Jose Luis Elechiguerra - josee@che.utexas.edu; Justin L Burt - burt@che.utexas.edu; Jose R Morones - morones@che.utexas.edu; Alejandra Camacho-Bragado - camacho-bragado@mail.utexas.edu; Xiaoxia Gao - kathygao@mail.utexas.edu; Humberto H Lara - dr\_lara@lycos.com; Miguel Jose Yacaman\* - yacaman@che.utexas.edu

\* Corresponding author

Published: 29 June 2005

Received: 28 March 2005

*Journal of Nanobiotechnology* 2005, 3:6 doi:10.1186/1477-3155-3-6

Accepted: 29 June 2005

This article is available from: <http://www.jnanobiotechnology.com/content/3/1/6>

© 2005 Elechiguerra et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Notă:** Titlul original a fost reprodus pentru a respecta dreptul autorilor la recunoașterea activității lor. Traducătorul nu își aroga nici un merit sau vreo responsabilitate cu privire la aceasta cercetare precum și la rezultatele ei prezente sau viitoare.

### Rezumat

Interacțiunea nanoparticulelor cu biomoleculele și microorganismele este un domeniu în expansiune a cercetării științifice. În acest domeniu, o temă puțin explorată este interacțiunea nanoparticulelor metalice cu virusurile. În această lucrare, vom demonstra ca nanoparticulele de argint interacționează cu HIV-1, această interacțiune fiind dependentă de mărimea nanoparticulei, atașarea nanoparticulelor de virus fiind posibil doar pentru nanoparticule cu dimensiunea de 1...10nm. Aranjamentul spațial regulat al nanoparticulelor pe suprafața virusului, distanța între centrele nanoparticulelor atașate, și faptul că fracțiile sulfuroase din nodurile glicoproteinelor ar fi locuri privilegiate pentru interacțiunea cu nanoparticulele, sugerează faptul că nanoparticulele de argint interacționează cu virusul HIV-1 prin alipirea preferențială în nodurile glicoproteinei GP120.

Datorită acestei interacțiuni, nanoparticulele de argint inhibă legarea virusului de celulele gazdă, așa cum s-a demonstrat in vitro.

### Generalități

Nanotehnologia ne dă capacitatea de a controla proprietățile materialelor prin controlul asupra dimensiunilor acestora, fapt care ea condus cercetările către o multitudine de utilizări potențiale ale nanomaterialelor [1]. În științele biologice, sunt de asemenea studiate multe aplicații ale nanoparticulelor metalice, cum ar fi biosenzorii [2], etichete pentru celule și biomolecule [3], precum și terapii pentru cancer [4].

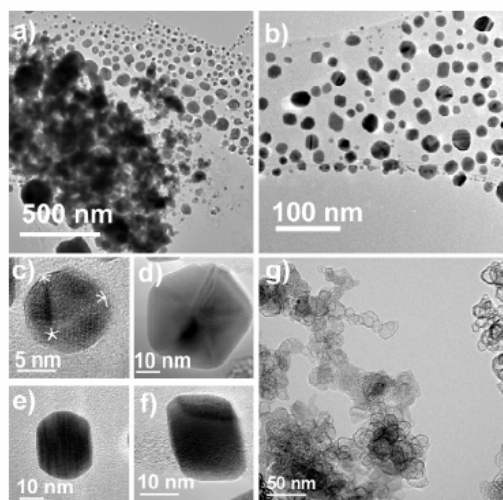
S-a demonstrat că în cazul nanocristalelor metalelor nobile, proprietățile electromagnetice, optice și catalitice sunt influențate în mod determinant de forma și dimensiunile acestora [5-7], ceea ce a dus la dezvoltarea unor modalități de sinteză care să permită un control mai bun al acestor proprietăți [8-13]. S-au sintetizat astfel nanomateriale ale metalelor nobile prin diverse metode, cum ar fi metode speciale de arc electric [14], bioreducție [9], precum și sinteze fazice din soluții [8, 10-13].

Printre nanomaterialele metalelor nobile, nanoparticulele de argint au beneficiat de o atenție largită, datorită proprietăților

lor fizico-chimice deosebite. Rezonanța plasmonică de suprafață, secțiunea efectivă de împrăștiere mare a nanoparticulelor individuale de argint, fac din ele candidați ideali pentru bioetichetare [15], unde pot fi exploatate fenomene precum amplificarea superficială a împrăștierii Raman (SERS). În plus, toxicitatea prezentată de către argint, aflat în diverse combinații chimice, asupra microorganismelor, este binecunoscută [16-18], iar nanoparticulele de argint sunt cunoscute ca un material antimicrobian promițător [19].

Din aceste motive, precum și pe baza cercetărilor noastre anterioare privitoare la interacțiunea nanoparticulelor metalelor nobile cu biomoleculele, am decis să studiem interacțiunea nanoparticulelor de argint cu virusurile. În continuare, prezentăm primele rezultate ale cercetărilor noastre, și anume faptul că nanoparticulele de argint interacționează dimensional dependent cu HIV-1.

## Rezultate



**Fig.1** Fotografia prin microscopie electronică (TEM) de transmisie a nanoparticulelor acoperite cu o peliculară de carbon: a) Imagine TEM a mostrei preparate prin dispersarea în apă deionizată a pulberii primite de la producător, prin ultrasonizare. Se observă aglomerarea nanoparticulelor în interiorul matricei peliculare din carbon. b) imaginea TEM a nanoparticulelor în afara matricei peliculare. Se poate observa o dispersie mare a formei acestora. c-f): Nanoparticule de argint cu diverse morfologii: c-dodecaedral, d-icosaedral, e-elongată, f-octaedral. g) Imagine TEM de înaltă rezoluție a matricei peliculare de carbon, după eliberarea nanoparticulelor (n.t.)

### Caracterizarea preparatelor de nanoparticule de argint

Proprietățile fizico-chimice ale nanoparticulelor sunt foarte dependente de interacțiunea lor cu moleculele agentului de acoperire[21] (n.t.: deși acest fapt este adevărat, există studii în care s-a arătat că în anumite cazuri, acoperirea nanoparticulelor cu agenți de protecție sau modificatori funcționali poate determina o anumită toxicitate și apariția de efecte secundare la folosirea acestora in vivo). Într-adevăr, chimia de suprafață a nanoparticulelor poate modifica interacțiunea lor cu sistemele. Pentru acest motiv, am testat nanoparticule de argint cu trei chimii de suprafață foarte diferite (n.t.: datorită agentului de acoperire): peliculară de carbon, poli(N-vinil-2-pirolidonă) (PVP) și albumină serică bovină (BSA).

Nanoparticulele acoperite cu peliculară de carbon au fost obținute de la Nanotechnologies Inc., și utilizate fără tratamente suplimentare. Aceste nanoparticule sunt integrate într-o matrice peliculară de carbon care le previne aglomerarea pe timpul sintezei. Eșantionul de nanoparticule astfel primit constă într-o pulbere neagră fină. Pentru obiectivul prezent, pulberea primită a fost dispersată în apă deionizată prin ultrasonizare. Analiza TEM arată ca nanoparticulele tind să se aglomereze în interiorul matricei peliculare din carbon, deși un procentaj mare sunt eliberate de către acesta în baia ultrasonică (fig. 1a-f). Nanoparticulele eliberate din matrice sunt în principal nanoparticule cu suprafața liberă, și s-a observat că doar nanoparticulele care au ieșit din această matrice interacționează cu HIV-1.

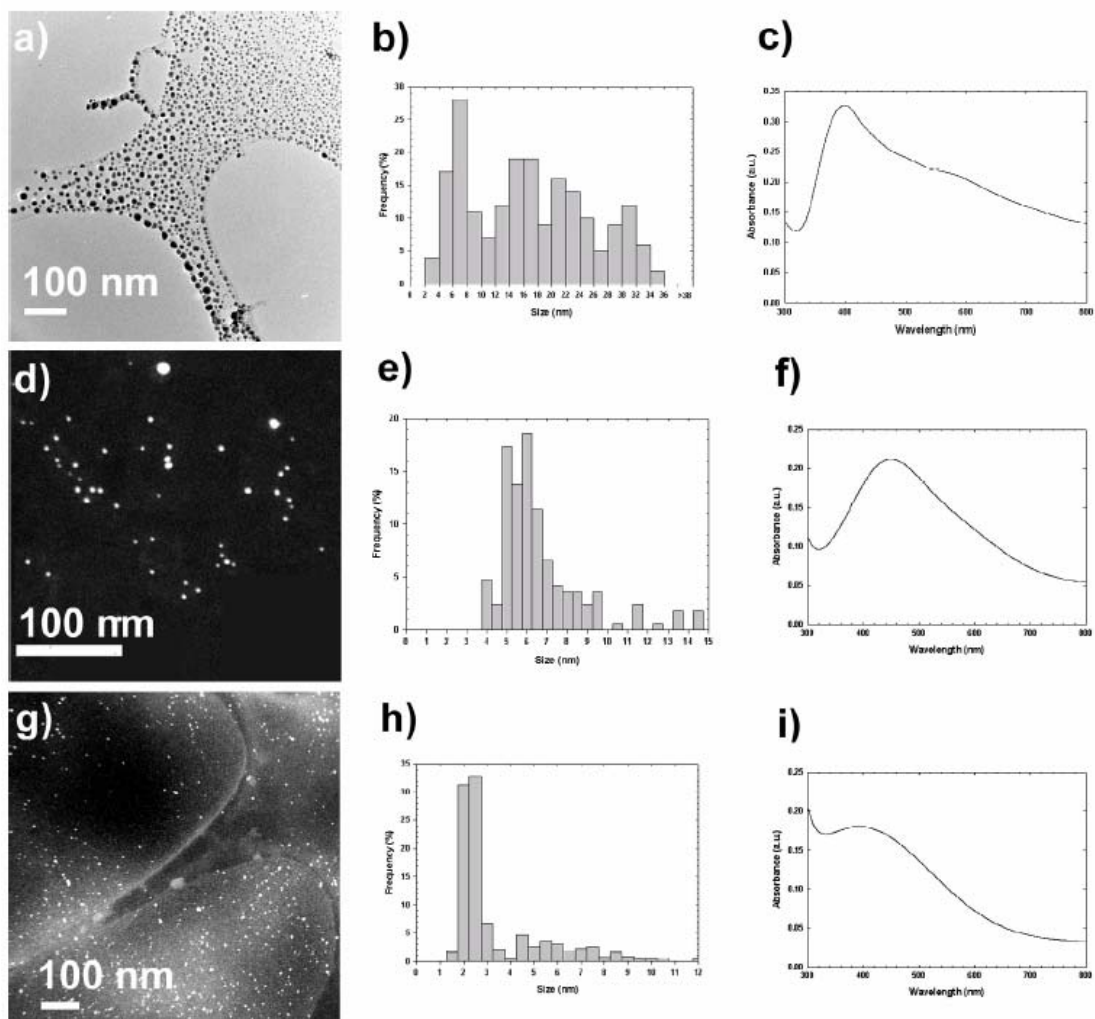
Interacțiunea nanoparticulelor cu matricea peliculară de carbon este suficient de slabă, astfel încât chiar și simpla focalizare a fluxului electronilor ejectează în afara matricei acele nanoparticule care nu au fost eliberate prin ultrasonizare. În fapt, după acest experiment se observă întreaga distribuție a marimii acestor nanoparticule, pentru referință putându-se consulta Fisierul Adicional 1. Analiza prin microscopie electronică prin transmisie de înaltă

rezoluție eliberate din matricea peliculară de carbon prin ultrasonizare au o distribuție de mărime de 16,19 +/-8,68nm (fig. 2a-b). Prin eliberarea restului de nanoparticule din matrice prin focalizarea fasciculului de electroni a TEM, mărimea medie obținută a fost de 21 +/-18nm. Adicional, analiza TEM a arătat că proba este compusă din diverse morfologii (fig. 1c-f) (n.t. aceste observații se referă strict la eșantioanele de nanoparticule primite de la producătorul respectiv, ele fiind dependente de tehnologia de fabricație).

Nanoparticulele acoperite cu PVP au fost realizate prin metoda poliolică, utilizând glicerina atât ca agent de reducere cât și ca solvent. În această etodă, un precursor metalic este dizolvat într-un poliol lichid, în prezența unui agent de acoperire precum PVP [22]. PVP este un polimer liniar și stabilizează suprafața nanoparticulei prin aderarea cu inelul pirolidonic. Studiile realizate în infraroșu (IR) precum și cele de spectroscopie fotoelectronică cu raze X (XPS) au arătat că atât atomii de azot cât și cei de oxigen ai inelului pirolidonic pot promova adsorbția lanțului PVP la suprafața argintului [23]. Distribuția de marime a particulelor din eșantion a fost obținută prin imagini de microscopie în câmp întunecat de unghi larg (HAADF). Nanoparticulele au prezentat o mărime medie de 6,53 +/-2,41nm (fig. 2d-e).

Nanoparticulele de argint conjugate direct cu moleculele proteinei BSA au fost sintetizate în soluție apoasă. Albumina serică este o proteină globulară și este cea mai abundentă proteină din plasma sanguină. Albumina serică bovină (BSA) este un singur lanț polipeptidic compus din 583 fracții aminoacide[24]. Mai multe astfel de fracții aminoacide au grupări sulfuroase, azotate sau oxigenate, care pot stabiliza suprafața nanoparticulei, cele mai puternice interacțiuni cu argintul fiind date de către grupările 3-5 tiol ale fracțiilor cisteinice, mecanism care este mediat de utilizarea borohidratului de sodiu, un puternic agent reducător, BSA protejând astfel steric nanoparticula prin dimensiunea ei mare. Distribuția de marime a particulelor din eșantion a fost obținută prin imagini de microscopie în câmp întunecat de unghi larg (HAADF). Aproape 75% din nanoparticulele de argint conjugate cu BSA au prezentat o mărime medie de 2,08 +/-0,42nm, existând însă și un procent ridicat de particule cu dimensiune mai mare, aducând media totală la 3,12 +/-2nm (fig. 2g-h).

Spectroscopia UV-VIS este un instrument valoros pentru caracterizarea structurală a nanoparticulelor de argint. Este binecunoscut faptul că spectrul de absorbție optică a nanoparticulelor este dominat de rezonanța plasmonică de suprafață (SPR), a cărei maxim se deplasează către lungimi de undă mari odată cu creșterea dimensiunii particulei [25]. Este de asemenea cunoscut că absorbanta nanoparticulelor de argint depinde în primul rând de forma și mărimea acestora [26, 27]. În general, numărul vârfurilor SPR scade odată cu creșterea simetriei particulei [27]. Recent, Schulz și colaboratorii [28] au corelat spectrul de absorbție al nanoparticulelor de argint individuale cu mărimea (în domeniul 40-120nm) și forma lor determinată de TEM (sfere, discuri, piramide trunchiate, decaedre). Ei au sesizat că nanoparticulele de argint sferice sau aproximativ sferice, decaedrele și cele pentagonale absorb în spectrul albastru (n.t. apărând astfel galbene în lumina transmisă), piramidele trunchiate absorb în domeniul verde de spectrul (n.t. apărând roșii), iar discurile absorb în domeniul lungimilor de undă roșii (n.t. apărând verzi). În toate cazurile, lungimea de undă a vârfului SPR crește cu dimensiunea nanoparticulei, așa cum era de așteptat.



**Fig.2** **Preparate de nanoparticule de argint:** a) Imagine TEM a nanoparticulelor de argint cu suprafața liberă, după eliberarea din matricea peliculară de carbon, prin dispersarea pulberii primite de la producător în apă deionizată prin ultrasonificare. b) Distribuția mărimii nanoparticulelor cu suprafața liberă, obținută prin analiza TEM. c) Spectrul UV-VIS al nanoparticulelor de argint cu peliculă de carbon. d) Imagine HAADF a nanoparticulelor acoperite cu PVP. e) Distribuția mărimii nanoparticulelor acoperite cu PVP, obținută prin analiza TEM. f) Spectrul UV-VIS al nanoparticulelor de argint acoperite cu PVP. g) Imagine HAADF a nanoparticulelor acoperite cu BSA. h) Distribuția mărimii nanoparticulelor acoperite cu BSA, obținută prin analiza TEM. i) Spectrul UV-VIS al nanoparticulelor de argint acoperite cu BSA.

Spectrele UV-VIS pentru toate preparatele de nanoparticule sunt prezentate în figura 2. Toate eșantioanele prezintă un minim la aproximativ 320nm, care corespunde lungimii de undă la care părțile reale și imaginare ale funcțiilor dielectrice ale argintului sunt aproape nule [27]. În cazul nanoparticulelor din eșantionul celor acoperite cu carbon, se evidențiază patru vârfuri, la 400, 490, 560 și 680 nm, așa cum se vede în fig. 2c. Semnătura optică a acestui eșantion poate fi mai bine înțeleasă prin prisma distribuției de mărimi și forme observată la analiza TEM. Așa cum am menționat anterior, distribuția de forme și mărimi este largă, doar puține particule prezentând o simetrie sferică. Prezența nanoparticulelor cu secțiuni transversale triunghiulare sau pentagonale poate fi responsabilă pentru varfurile de absorbție la lungimi de undă mari.

Pe de altă parte, nanoparticulele de argint acoperite cu PVP sau BSA prezintă câte un singur vârf, la 450, respectiv 390nm. Aceasta arată că ambele preparate sunt compuse din nanoparticule de argint cu forme aproximativ sferice și

dimensiuni mici. Este totodată cunoscut că pentru nanoparticule lățimea vârfului de absorbție este de așteptat să crească, această lățime fiind invers proporțională cu diametrul particulei [29]. Rezultatele pentru nanoparticulele acoperite cu BSA sunt conforme cu așteptările, fiind prezent doar un vârf larg și simetric la circa 390nm. Pe de altă parte, spectrul pentru nanoparticulele de argint acoperite cu PVP, nu este simetric în jurul lungimii de undă a maximumului de absorbție. În fapt, curba acestui spectru poate fi descompusă în două curbe, una centrată la 430nm și alta centrată la 520nm. Vârful de 430nm poate fi atribuit rezonanței dipolare a argintului, indicând prezența particulelor sferice cu diametru mic. În plus însă, sinteza nanoparticulelor prin metoda poliolică favorizează formarea nanoparticulelor multifacetate, nanoparticulele decaedrice fiind cele mai stabile din punct de vedere termodinamic [23]. De aceea, deplasarea spre lungimi de undă roșii a maximumului este datorată atât prezenței nanoparticulelor cu dimensiuni mai mari, dar și prezenței particulelor decaedrale, cu secțiuni transversale pentagonale.

### **Interacțiunea cu HIV-1**

Pentru studiul interacțiunii nanoparticulelor de argint cu HIV-1 s-a folosit microscopia în câmp întunecat de unghi larg (HAADF) cu microscop electronic prin transmisie, aceasta dovedindu-se o tehnică puternică pentru analiza eşantioanelor biologice, cum ar fi bacteriile[30] sau proteinele[20] interfațate cu nanoparticule anorganice. Imaginile HAADF sunt obținute în principal prin datorită electronilor care au suferit împrăștiere Rutherford. Ca rezultat, contrastul imaginii este dat de diferențele între numărul atomic [31], cu o intensitate variind cu pătratul acestuia. Ca o bună aproximație, elementele ușoare apar întunecate, iar cele grele apar luminoase. Datorită diferenței mari între numerele atomice, nanoparticulele de argint pot fi distinse cu ușurință de virus.

În figura 3 sunt prezentate imaginile HAADF ale virusului HIV-1 cu (3a) și fără (3b) nanoparticulele de argint atașate. Pentru detalii experimentale complete, se poate urmări secțiunea "Metode experimentale". Prezența argintului a fost confirmată separat și prin EDS (spectroscopie cu raze X energetic dispersivă), după cum se arată și în figura 3c. În mod interesant, mărimea nanoparticulelor atașate virusului (fig. 3d) a fost exclusiv în intervalul 1-10 nm. În cazul nanoparticulelor eliberate din matricea peliculară de carbon, faptul că nu s-a observat ca vreuna din nanoparticulele cu diametrul mai mare de 10 nm să se atașeze virusului este semnificativ, din moment ce aproximativ 40% din totalul de nanoparticule au dimensiuni superioare acesteia. Aceasta aduce o dovadă puternică a dependenței de dimensiune a acestei interacțiuni.

Adițional, nanoparticulele văzute în figura 3a, nu sunt atașate aleator pe suprafața virusului, fiind observate regularități spațiale între grupele de câte trei nanoparticule. Atât aranjamentul spațial al nanoparticulelor, cât și dependența de mărime a interacțiunii pot fi explicate pe baza cunoașterii anvelopei virusului HIV-1.

Exteriorul virusului este format dintr-o membrană lipidică, presărată cu noduri glicoproteice protuberante, formate din lanțuri compuse din două subunități: glicoproteina superficială GP120 este expusă exteriorului și glicoproteina membranară GP41, care străbate membrana virală și conectează GP120 de proteina matriceală internă P17[32]. Funcția principală a acestor noduri proteice protuberante realizate de către GP120 este de a se lega de receptorii CD4 ale celulelor gazdă. În anvelopa virală sunt prezente și alte proteine, însă nodurile date de GP120 sunt cele mai expuse unor potențiale interacțiuni cu nanoparticule.

Leonard și colaboratorii [34] că subunitățile GP120 au 9 legături disulfid, dintre care 3 sunt localizate în apropierea domeniului de legătură cu CD4. Aceste legături disulfid expuse ar fi locurile cele mai favorabile pentru interacțiunea dintre nanoparticulă și virus. Așa cum s-a prezentat anterior, nanoparticulele din figura 3a par să fie localizate în poziții specifice, cu relații spațiale regulate între grupe de trei particule. Aranjamentele spațiale observate sunt corelate cu poziția nodurilor glicoproteinei GP120 în modelul structural al HIV-1 propus de Nermut și colaboratorii [32].

Relațiile spațiale regulate pot fi deasemenea observate pe suprafața netratată a virusului, așa cum se poate observa în aranjamentul din figura 1b. Contrastul întunecat observat în aceste locuri ar putea indica locațiile nodurilor glicoproteice. Așa cum s-a prezentat anterior, contrastul în imaginile HAADF este puternic dependent de diferențele în numărul atomic. Acesta nu este însă singurul viral care determină contrastul imaginii. Dacă materialul este compus

din elemente cu numere atomice similare, așa cum este cazul constituenților organici ai virusului, variații locale ale densității vor produce variații de contrast notabile. Majoritatea anvelopei virale este formată din molecule lipidice dens împachetate. În cazul nodurilor glicoproteice însă, este de așteptat existența unei zone de densitate mai scăzută, datorită prezenței glicoproteinei transmembranare GP41 în locul denselor molecule lipidice. De aceea, aceste zone ar trebui să apară mai întunecate decât restul anvelopei virale.

S-a determinat că spațierea între nodurile glicoproteice este de circa 22nm [35]. În aranjamentul din figura 3a, valoarea medie măsurată între centrele nanoparticulelor atașate virusului este de circa 28nm, care este corelată cu spațierea așteptată între nodurile glicoproteice. Valoarea medie a distanței între micile zone întunecate prezente pe virusul netratat este de 22nm, fapt ce sugerează iarăși că aceste locuri sunt nodurile glicoproteinei GP120.

Presupunând că locurile preferențiale de interacțiune sunt fracțiile sulfuroase ale nodurilor glicoproteinei GP120, există doar un număr limitat de legături pe care le poate realiza o nanoparticulă. Numărul limitat al locurilor stabilizatoare explică de ce nu se observă atașarea de virus a nanoparticulelor de dimensiuni mai mari. Presupunând că fiecare nanoparticulă interacționează cu un singur nod glicoproteic și că fiecare nod învecinat este ocupat de o nanoparticulă, din considerații geometrice, limita teoretică superioară pentru aceste nanoparticule ar fi de circa 20nm. Totuși, dacă o nanoparticulă cu diametrul mai mare de 14nm, care este diametrul unui astfel de nod glicoproteic [35] s-ar atașa virusului, doar o mică parte a suprafeței totale a nanoparticulei ar fi ancorată, rezultând o interacțiune mai puțin stabilă. Astfel, dacă interacțiunea nanoparticulelor de argint cu HIV-1 se realizează prin legarea acesteia de nodurile glicoproteinei GP120, ne-am așteptat să găsim mai ales nanoparticule cu diametrul mai mic de 14nm legate de suprafața virusului, ele beneficiind de cele mai stabile interacțiuni de suprafață, ceea ce corespunde îndeaproape cu observațiile noastre, care arată că diametrul maxim al acestor particule este de 10nm.

Cu toate că mecanismul prin care HIV-1 infectează celulele gazdă nu este pe deplin cunoscut, sunt doi pași în acest mecanism considerați critici pentru aceasta: primul pas constă în legarea lui GP120 la receptorii specifici CD4 de pe membrana celulei gazdă. După legarea la CD4, o modificare structurală este indusă în GP120, rezultând în expunerea unor noi centri de legătură pentru alți receptori ai celulei gazdă, cum ar fi CCR5 sau CXCR4 [36-38]. Un agent care ar interacționa preferențial cu GP120 ar bloca legarea virusului de celula gazdă. Pentru aceasta, am măsurat efectele inhibitoare ale nanoparticulelor de argint asupra HIV-1, in vitro.

Capacitatea nanoparticulelor de argint de a inhiba activitatea infecțioasă a HIV-1 a fost determinată prin testarea pe celule CD4+MT-2 și celule raportor cMAGI HIV-1. Pentru detalii experimentale complete, a se vedea vedea secțiunea "Metode". Efectele citopatice ale infecțiilor CD4+MT-2 au fost analizate prin microscopie optică, apreciindu-se formarea syncytium-ului, așa cum este descris în [39, 40], precum și prin infectarea HIV-1 a celulelor cMAGI, utilizând tehnica "Blue Cell" [41,42]. Citotoxicitatea preparatelor de nanoparticule asupra celulelor MT-2 a fost realizată prin "Tripin Blue" [43]. Pentru toate cele trei preparate, la concentrații de nanoparticule de argint de peste 25microgram/ml, infectivitatea virală a fost redusă până acolo încât nu a putut fi detectată formarea syncytium-ului,

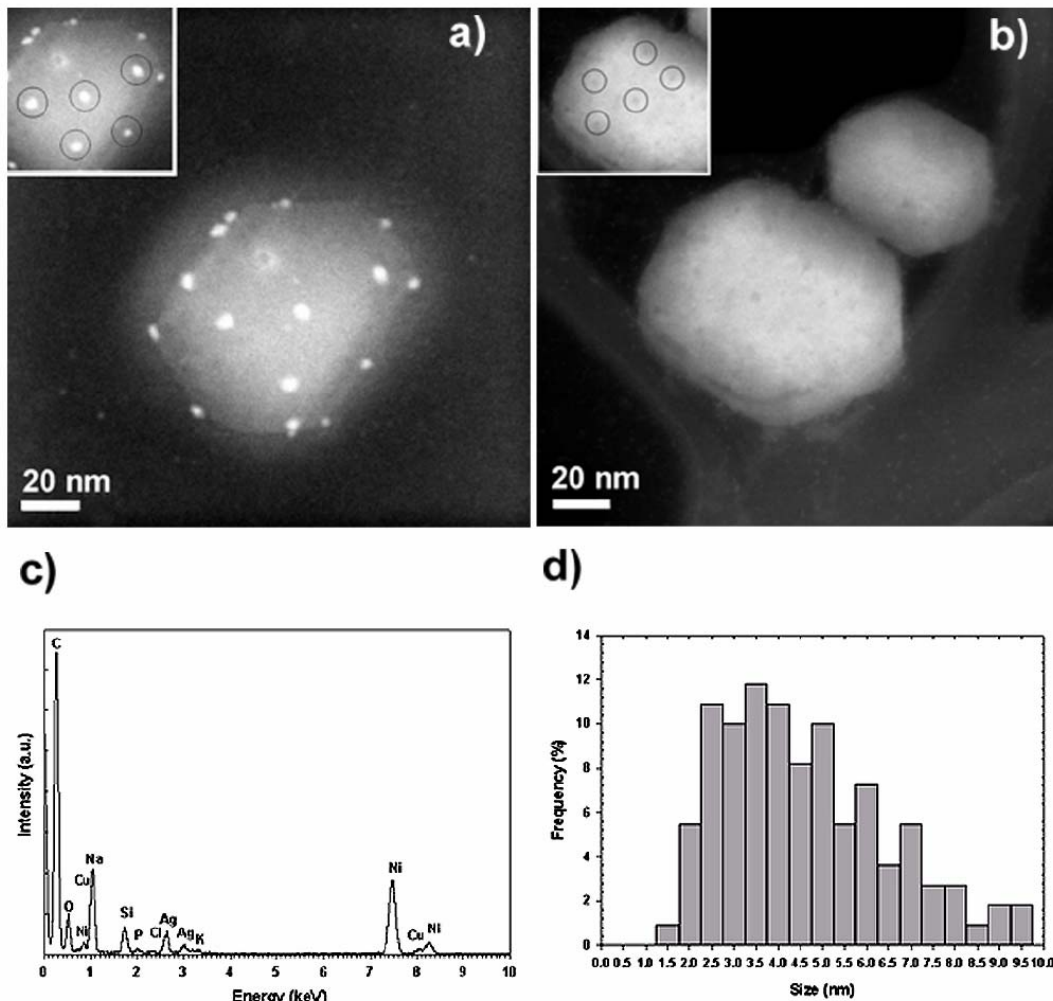


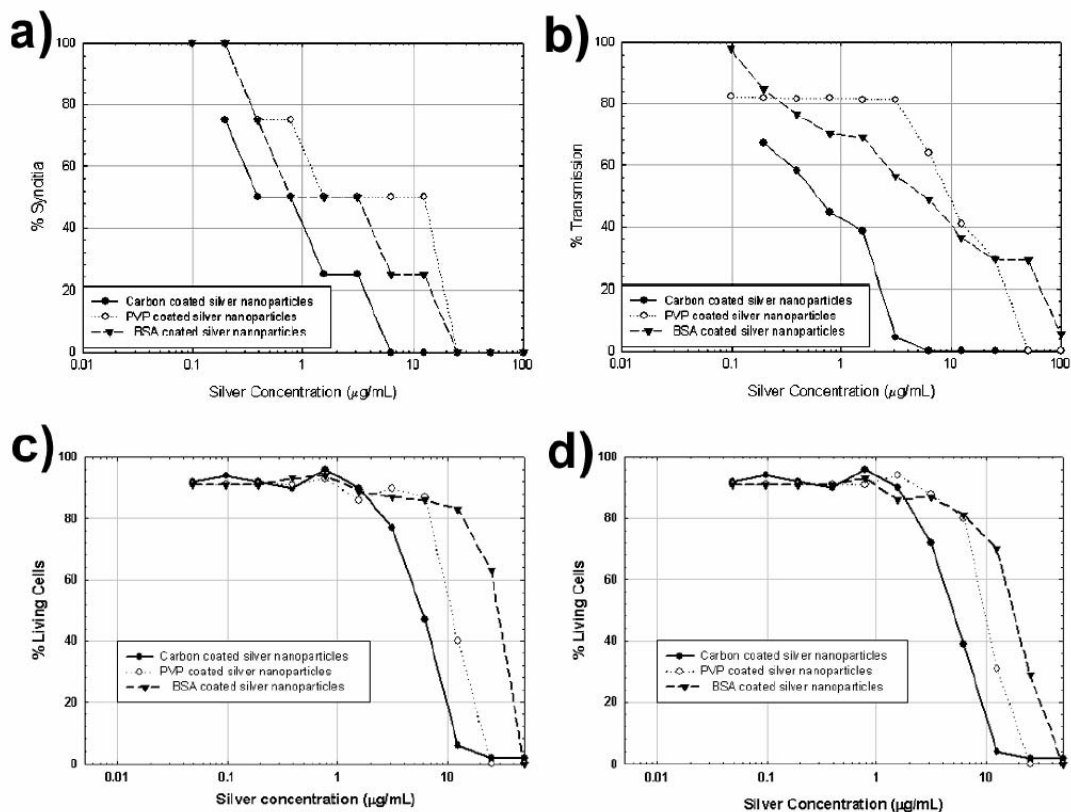
Fig.3 Imaginile HAADF ale virusului HIV-1: a) imaginile virusului expus nanoparticulelor de argint conjugate cu BSA. Sublinierea evidențiază aranjamentul spațial regulat între grupurile de trei nanoparticule. b) imaginile virusului fără tratamentul cu nanoparticule. Sublinierea arată aranjamentul spațial regulat observat pe suprafața virusului netratat. c) analiza EDS a cazului din imaginea a), arătând prezența argintului. Semnalul C provine atât din grila suport a TEM cât și de la virus, O și P sunt de la virus, Na, Cl și K sunt prezente în mediul de cultură, Ni și Si provin de la grila suport TEM, iar Cu este atribuit suportului eșantionului. d) distribuție dimensională compusă a nanoparticulelor legate de suprafața virusului, provenită din toate eșantioanele.

așa cum este reprezentat grafic în figura 4. Pentru fiecare preparat de nanoparticule s-a găsit o dependență de doză a infectivității virusului HIV-1 astfel încât dozei IC50 îi corespunde doar o citotoxicitate relativ scăzută (n.t. această citotoxicitate poate fi corelată și cu acoperirea nanoparticulelor de argint cu materialele respective).

Cu toate că rezultatele privind interacțiunea cu HIV-1 au fost aproape similare în cazul celor trei chimii de suprafață, toxicitatea și rezultatele inhibitorii nu au fost la fel. Diferențele în tendințele inhibitorii asupra HIV-1 pot fi explicate prin diferența între agenții protectori folosiți. Nanoparticulele protejate cu BSA și PVP prezintă un efect inhibitor mai redus, pentru că suprafața nanoparticulei este legată la substanța respectivă și încapsulată de ea. În contrast, nanoparticulele eliberate din matricea carbonică au un efect inhibitor mai ridicat, datorită suprafeței libere semnificativ mai mari. Deoarece un număr semnificativ al acestor nanoparticule prezintă suprafețe aproape libere, sunt capabile să interacționeze mai puternic cu celulele gazdă, ceea ce crește toxicitatea lor. În mod clar, selecția agenților de încapsulare va fi crucială pentru cercetările viitoare ale

interacțiunii nanoparticulelor cu virusii, bacteriile, precum și cu biosistemele mai complexe, existând totodată multe variabile care trebuie testate, precum prezența pe termen lung a nanoparticulelor, impactul urmelor de molecule precursor precum și a prezenței produșilor secundari de reacție (n.t. acestea din urmă, deși foarte importante, nu constituie o problemă în cazul nanoparticulelor de argint produse pe cale electrochimică).

În concluzie, s-a găsit că nanoparticulele de argint interacționează dependent de formă cu HIV-1, și că particulele legate prezintă distribuții spațiale regulate. Aceasta duce la concluzia că nanoparticulele realizează legături preferențiale cu nodurile glicoproteinei GP120 din anvelopa virală. Nanoparticulele de argint inhibă infectivitatea HIV1 in vitro, ceea ce suportă presupunerea noastră privind interacțiunea preferențială cu GP120. Probele pentru susținerea acestui mecanism de interacțiune sunt indirecte, fiind realizate în continuare testări pentru a determina categoric dacă are loc o conjugare între GP120 și nanoparticulele de argint.



**Fig.4 Inhibirea HIV-1 și toxicitatea:** a) aprecierea formării mediate de către HIV-1a syncytium-ului în celulele MT-2. b) Procentajul transmisiei HIV-1 în celulele cMAGI. Toxicitatea preparatelor de nanoparticule față de celulele MT2 a fost determinată utilizând Tripan Blue. Mostrele au fost incubate la 37 de grade, iar celulele au fost evaluate prin microscopie electronică după c) 3 ore și d) 24 de ore de la expunerea la nanoparticule.

## Metode

### a) culturile de celule și tulpinile HIV-1

Tulpina de laborator HIV-1IIB a virusului HIV-1, un tip X4 (wt) a fost obținută prin AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH. Linia de celule CD4+ MT-2 a fost obținută de la American Type Culture Collection. Celulele raportoc cMAGI HIV-1 au fost un dar generos al dr. Phalguni Gupta, de la universitatea din Pittsburgh. Toți ceilalți reagenți au fost de cea mai bună calitate disponibilă.

Celulele cMAGI au fost cultivate în mediu lichid DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (1X), fără fosfat și piruvat de sodiu. Mediul de cultură a conținut 4500mg/l D-glucoză și L-glutamină (Invitrogen, Paisley, UK), cu 10% ser fetal de vițel (FCS), 0,2mg/ml geneticină (G418) și 0,1 µg/ml puromicină. Celulele MT-2 au fost cultivate în RPMI 1640, conținând 10% FCS și antibiotice.

Izolații clinici primari HIV-1IIB au fost propagați pe subcultura în celulele cMAGI și MT-2. HIV-1IIB a fost glicerină. Odată cu dizolvarea PVP-ului s-a crescut temperatura la 140°C. După 30 minute s-au adăugat 2ml de Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,015M și s-au lăsat să reacționeze 1 oră.

reprodus conform "DAIDS Virology Manual for HIV Laboratories", versinea 1997, alcătuită de divizia AIDS a "National Institute of Allergies and Infectious Diseases and the National Institute of Health". [...]

### b) sinteza celor trei preparate de nanoparticule

Nanoparticulele acoperite cu carbon utilizate în acest studiu au fost obținute de la Nanotechnologies Inc. și utilizate fără un tratament suplimentar. Pentru mai multe informații privind sinteza acestor nanoparticule, vizitați [www.nanoscale.com](http://www.nanoscale.com).

Nanoparticulele de argint acoperite cu PVP au fost sintetizate prin metoda poliolică, utilizând glicerina atât ca agent reductor, cât și ca solvent. Sulfatul de argint (Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) și poli (N-vinil-2-pirolidona) (PVP-K30, masa moleculară 40000) au fost cumpărate de la Sigma Aldrich, iar 1,2,3 propantriolul (glicerină, >99%) au fost cumpărate de la Fischer Chemicals, toate materialele fiind utilizate fără tratament suplimentar. Pe scurt, s-au adăugat adăugat 0,2g de PVP într-un balon cu fund rotund, urmată de adăugarea a 30g de Nanoparticulele de argint direct conjugate cu molecule de proteine BSA au fost produse după cum urmează: azotatul de argint, AgNO<sub>3</sub> (0,945M), borohidruza de sodiu (NaBH<sub>4</sub>, 99%) și etanol de grad spectrofotometric au fost achizitionate de la Aldrich. BSA a fost achizitionată de la Fischer, și

utilizată fără tratament suplimentar. Pe scurt, borohidruza de sodiu a fost adăugată unei soluții apoase conținând azotat de argint și BSA, simultan cu o agitare puternică. Raportul molar Ag<sup>+</sup>:BSA a fost 28:1, iar masa molară Ag<sup>+</sup>:BH<sub>4</sub> a fost 1:1. Volumul de reacție a fost de 40ml, și a conținut 13,5μmol BSA. Reacția a durat 1h, după care produsul a fost purificat prin precipitare la -5°C, urmată de filtrarea în etanol rece.

#### c) caracterizarea diferitelor preparate de nanoparticule

Analizele TEM au fost realizate cu un microscop HRTEM JEOL 2010F, echipat cu un tun Schottky și piese polare de înaltă rezoluție (Cs 0,5mm), unitate STEM și detector HAADF, operând la 200kV. Pe scurt, o picătură din fiecare eșantion de nanoparticule de argint a fost plasată pe o sită de cupru acoperită cu carbon și lăsată la evaporat. Distribuția de dimensiuni pentru fiecare preparat de nanoparticule a fost obținută prin analiza TEM asupra a 400 de particule, respectiv 600 în cazul preparatului BSA.

- Bonnemann H, Richards RM: Nanoscopic metal particles- Synthetic methods and potential applications. *Eur J Inorg Chem* 2001, 10:2455-2480.
- Nam JM, Thaxton CS, Mirkin CA: Nanoparticle-based bio-bar codes for the ultrasensitive detection of proteins. *Science* 2003, 301:1884-1886.
- Tkachenko AG, Xie H, Coleman D, Glomm W, Ryan J, Anderson MF, Franzen S, Feldheim DL: Multifunctional Gold Nanoparticle-Peptide Complexes for Nuclear Targeting. *J Am Chem Soc* 2003, 125:4700-4701.
- Hirsch LR, Stafford RJ, Bankson JA, Sershen SR, Rivera B, Price RE, Hazle JD, Halas NJ, West JL: Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. *PNAS* 2003, 100:13549-13554.
- Liz-Marzan LM: Nanometals: Formation and color. *Materials Today* 2004, 7:26-31.
- Mulvaney P: Surface Plasmon Spectroscopy of Nanosized Metal Particles. *Langmuir* 1996, 12:788-800.
- Burda C, Chen X, Narayanan R, El-Sayed MA: Chemistry and Properties of Nanocrystals of Different Shapes. *Chemical Reviews (Washington, DC, United States)* 2005, 105:1025-1102.
- Yu YY, Chang SS, Lee CL, Wang CRC: Gold nanorods: electrochemical synthesis and optical properties. *Journal of Physical Chemistry B* 1997, 101:6661-6664.
- Canizal G, Ascencio JA, Gardea-Torresday J, Jose-Yacamán M: Multiple twinned gold nanorods grown by bio-reduction techniques. *Journal of Nanoparticle Research* 2001, 3:475-481.
- Jana NR, Gearheart L, Murphy CJ: Seed-mediated growth approach for shape-controlled synthesis of spheroidal and rod-like gold nanoparticles using a surfactant template. *Advanced Materials (Weinheim, Germany)* 2001, 13:1389-1393.
- Jana NR, Gearheart L, Murphy CJ: Wet chemical synthesis of high aspect ratio cylindrical gold nanorods. *Journal of Physical Chemistry B* 2001, 105:4065-4067.
- Sun Y, Mayers B, Herricks T, Xia Y: Polyol Synthesis of Uniform Silver Nanowires: A Plausible Growth Mechanism and the Supporting Evidence. *Nano Letters* 2003, 3:955-960.
- Lisiecki I, Filankembo A, Sack-Kongehl H, Weiss K, Pileni MP, Urban J: Structural investigations of copper nanorods by high-resolution TEM. *Physical Review B: Condensed Matter and Materials Physics* 2000, 61:4968-4974.
- Zhou Y, Yu SH, Cui XP, Wang CY, Chen ZY: Formation of Silver Nanowires by a Novel Solid-Liquid Phase Arc Discharge Method. *Chemistry of Materials* 1999, 11:545-546.
- Schultz S, Smith DR, Mock JJ, Schultz DA: Single-target molecule detection with nonbleaching multicolor optical immunolabels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America FIELD Publication Date:2000 Feb 1* 97:996-1001. FIELD Reference Number: FIELD Journal Code:7505876 FIELD Call Number:.
- Liau SY, Read DC, Pugh WJ, Furr JR, Russell AD: Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions. *Lett Appl Microbiol* 1997, 25:279-283.
- Gupta A, Silver S: Silver as biocide: Will resistance become a problem? *Nat Biotechnol* 1998, 16:888.
- Nomiya K, Yoshizawa A, Tsukagoshi K, Kasuga NC, Hirakawa S, Watanabe J: Synthesis and structural characterization of silver (I), aluminium (III) and cobalt(II) complexes with 4-isopropyltropolone (hinokitol) showing noteworthy biological activities. Action of silver(I)-oxygen bonding complexes on the antimicrobial activities. *J Inorg Biochem* 2004, 98:46-60.
- Sondi I, Salopek-Sondi B: Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci* 2004, 275:177-182.
- Burt JL, Gutierrez-Wing C, Miki-Yoshida M, Jose-Yacamán MJ:

Spectrele UV-VIS au fost obținute la temperatura camerei cu un Spectrometru Cary5000. Toate soluțiile au fost diluate de 30x în apă deionizată înainte de prelevarea spectrelor.

#### d) microscopia electronică a HIV-1 și a nanoparticulelor de argint

[...] (n.t. în curs de traducere)

#### e) inhibarea HIV-1 de către nanoparticulele de argint

[...] (n.t. în curs de traducere)

#### f) citotoxicitatea nanoparticulelor de argint față de celulele MT-2

[...] (n.t. în curs de traducere)

#### Referințe:

- Noble-Metal Nanoparticles Directly Conjugated to Globular Proteins. *Langmuir* 2004, 20:11778-11783.
- Bradley JS: Clusters and Colloids: From Theory to Applications. In *Clusters and Colloids: From Theory to Applications* Edited by: Schmid GE, Weinheim, VCH; 1994:459-536.
  - Bonet F, Guery C, Guyomard D, Urbina RH, Tekaiia-Elhissen K, Tarascon JM: Electrochemical reduction of noble metal compounds in ethylene glycol. *International Journal of Inorganic Materials* 1999, 1:47-51.
  - Wiley B, Sun Y, Mayers B, Xia Y: Shape-controlled synthesis of metal nanostructures: The case of silver. *Chemistry - A European Journal* 2005, 11:454-463.
  - Peters TJ: All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications. In *All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications* San Diego, Academic Press; 1996:9-75.
  - Brause R, Moeltgen H, Kleinermanns K: Characterization of laserablated and chemically reduced silver colloids in aqueous solution by UV/VIS spectroscopy and STM/SEM microscopy. *Applied Physics B: Lasers and Optics* 2002, 75:711-716.
  - Kerker M: The optics of colloidal silver: something old and something new. *Journal of Colloid and Interface Science* 1985, 105:297-314.
  - Sosa IO, Noguez C, Barrera RG: Optical Properties of Metal Nanoparticles with Arbitrary Shapes. *Journal of Physical Chemistry B* 2003, 107:6269-6275.
  - Mock JJ, Barbic M, Smith DR, Schultz DA, Schultz S: Shape effects in plasmon resonance of individual colloidal silver nanoparticles. *Journal of Chemical Physics* 2002, 116:6755-6759.
  - Petit C, Lixon P, Pileni MP: In situ synthesis of silver nanocluster in AOT reverse micelles. *Journal of Physical Chemistry* 1993, 97:12974-12983.
  - Sweeney RY, Mao C, Gao X, Burt JL, Belcher AM, Georgiou G, Iverson BL: Bacterial Biosynthesis of Cadmium Sulfide Nanocrystals. *Chemistry & Biology* 2004, 11:1553-1559.
  - James EM, Browning ND: Practical aspects of atomic resolution imaging and analysis in STEM. *Ultramicroscopy* 1999, 78:125-139.
  - Forster MJ, Mulloy B, Nermut MV: Molecular modelling study of HIV p17gag (MA) protein shell utilising data from electron microscopy and X-ray crystallography. *J Mol Biol* 2000, 298:841-857.
  - Arthur LO, Bess JW, Sowder RC, Benveniste R, Mann D, Chermann J, Henderson L: Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines. *Science* 1992, 258:1935-1938.
  - Leonard CK, Spellman MW, Riddle L, Harris RJ, Thomas JN, Gregory TJ: Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1990, 265:10373-10382.
  - Gelderblom HR, Hausmann EHS, Ozel M, Pauli G, Koch MA: Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology* 1987, 156:171-176.
  - Dalgleish AG, Beverley PCL, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA: The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 1984, 312:763-767.
  - Klatzmann D, Champagne E, Chameret S, Gruest J, Guetard D, Herceud T, Gluckman JC, Montagnier L: T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 1984, 312:767-768.
  - Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger E: HIV-1 entry cofactor: Functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 1996, 272:872-877.

39. Harada S, Koyanagi Y, Yamamoto N: Infection of HTLV-III/LAV in HTLV-I-carrying cells MT-2 and MT-4 and application in a plaque assay. *Science* 1985, 229:563-566.  
40. Sodroski J, Goh WC, Rosen C, Campbell K, Haseltine WA: Role of the HTLV-III/LAV envelope in syncytium formation and cytopathicity. *Nature* 1986, 322:470-474.  
41. Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, Di Marzio P, Marmon S, Sutton RE, Hill CM, Davis CB, Peiper SC, Schall TJ, Littman DR, Landau NR: Identification of a major co-receptor

for primary isolates of HIV-1. *Nature* 1996, 381:661.  
42. Chackerian B, Long EM, Luciw PA, Overbaugh J: Human immunodeficiency virus type 1 coreceptors participate in postentry stages in the virus replication cycle and function in simian immunodeficiency virus infection. *J Virol* 1997, 71:3932-3939.  
43. Kaltenbach JP, Kaltenbach MH, Lyons WB: Nigrosin as a dye for differentiating live and dead ascites cells\*1. *Exp Cell Res* 1958, 15:112-117.

## Additional material

### Additional File 1

Supporting information. The file is a word document that contains the complete size distribution of the carbon-coated silver nanoparticles evaluated by TEM

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1477-3155-3-6-S1.doc>]

## Acknowledgements

The authors want to thank Nanotechnologies, Inc. for providing their silver nanoparticles. J. L. Elechiguerra, J. R. Morones, and A. Camacho-Bragado acknowledge the support received from CONACYT- México. J.L.Burt thanks the University of Texas at Austin College of Engineering and Mr. Robert L. Mitchell for their financial support through the Thrust 2000 Robert L. and Jane G. Mitchell Endowed Graduate Fellowship in Engineering. This material is based upon work supported under a National Science Foundation Graduate Research Fellowship (to JLB).

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

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

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

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

Submit your manuscript here:

[http://www.biomedcentral.com/info/publishing\\_adv.asp](http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp)



Traducerea în limba română realizată de:  
**Aghoras Invent srl Romania**