

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
INSTITUTO DE VIROLOGÍA “J.M. VANELLA”



**ESTUDIO DE NUEVOS INHIBIDORES DE LA TRANSCRIPTASA
INVERSA NO NUCLEOSÍDICOS CON ACTIVIDAD ANTIVIRAL
CONTRA EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA 1 EN
COMBINACIÓN CON ACETATO DE ZINC, PARA SU POTENCIAL
USO COMO MICROBICIDAS DE AMPLIO ESPECTRO.**

MICROBIÓLOGO JOSÉ ABEL FERNÁNDEZ ROMERO

DIRECTORA: MARÍA GABRIELA PAGLINI

CO-DIRECTORA: MELISSA JANE ROBBIANI

**CENTER FOR BIOMEDICAL RESEARCH
POPULATION COUNCIL
NEW YORK, USA**

**INSTITUTO DE VIROLOGÍA
“J.M. VANELLA”
FCM – UNC
CÓRDOBA, ARGENTINA**



CÓRDOBA 2013



Estudio de nuevos inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleosídicos con actividad antiviral contra el virus de la inmunodeficiencia humana 1 en combinación con acetato de zinc, para su potencial uso como microbicidas de amplio espectro por Fernández Romero, José Abel se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

COMISIÓN DE SEGUIMIENTO

Dra. Viviana Ré. Profesora Adjunta, Instituto de Virología “J.M. Vanella” de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba. Investigadora Asistente del CONICET.

Dr. Rubén Manzo. Profesor Emérito, Departamento de Farmacia de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba. Investigador Principal del CONICET

Dra. Gabriela Paglini. Profesora Adjunta, Instituto de Virología “J.M. Vanella” de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba. Investigadora Independiente del CONICET.

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Dr. Rubén H. Manzo
Profesor Emérito
Investigador Principal CONICET
Departamento de Farmacia,
Facultad de Ciencias Químicas,
Universidad Nacional de Córdoba
UNITEFA-CONICET

Dr. Ernesto Jakob
Ex-Prof. Titular de la Cátedra de
Infectología de la Facultad de
Ciencias Médicas de la
Universidad Nacional de Córdoba

Dr. Dante Beltramo
Prof. Titular de Biotecnología
Universidad Católica de Córdoba.
Investigador Principal
CONICET-CEPROCOR
Ministerio de Ciencia y Técnica de
la Provincia de Córdoba

**A MI FAMILIA
EN ESPECIAL A MI MADRE**

Llegará una época en la que una investigación diligente y prolongada sacará a la luz cosas que hoy están ocultas... Muchos son los descubrimientos reservados para las épocas futuras, cuando se haya borrado el recuerdo de nosotros. Nuestro universo sería una cosa muy limitada si no ofreciera a cada época algo que investigar... La naturaleza no revela sus misterios de una vez para siempre.

Séneca, cuestiones naturales,

Libro 7, siglo primero

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido el fruto de años de dedicación y amor por la investigación, no solo de mi parte sino de todos aquellos que han contribuido de una forma u otra a que se lograra. Son muchos a los que debo agradecer.

A toda mi familia, cubana y dominicana.

En especial a mi madre y mis abuelas por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo a través del tiempo.

A mis maestros en Cuba, desde la primaria hasta la universidad.

Que desde pequeño me inculcaron la avidez por el conocimiento, por superarme, por las tantas horas de enseñanza magistral que hoy me han llevado a estar resumiendo esta tesis y que deseo sirva de homenaje y agradecimiento a todos ellos.

A mis adorados sobrinos Ana Paula, Luis Daniel y Leah

Espero poder trasmitirles que en la vida todo se puede con sacrificio, perseverancia, dedicación y amor al trabajo.

A Dancy,

Por su inmenso e incondicional apoyo en los tres años que ha durado este proceso.

A todos mis amigos.

En especial a Nelson Nuñez por ser el autor intelectual de desarrollar mi tesis en la Universidad de Córdoba. A Pablo, Francisco, Markus y Pedro por todas las atenciones y la cálida hospitalidad que me han brindado en Córdoba.

A Population Council.

No hay palabras para describir la admiración y respeto que siento por la organización para la cual trabajo y que me ha brindado todo el apoyo necesario para la realización de esta tesis. Eterno agradecimiento a David Phillips y Robin

Maguire que me abrieron las puertas del laboratorio y me dieron entrada en el mundo de los microbicidas hasta el día de hoy que cuento con la mayor suerte de trabajar bajo la tutela de Melissa Robbiani, quien a guiado y apoyado toda la labor científica que se ve plasmada en esta tesis. A todos mis compañeros de trabajo, pasado y presente, Kanani Titchen, Brian Ford, Othell Begay, Meropi Aravantinou, Mayla Hsu, Pedro Ignacio Gil, Aixa Rodríguez, Larisa Kizima, Ninotchka Jean-Pierre, Olga Mizenina, Keith Levendosky, Radhika Menon, Samatha Seidor y Thomas Zydowsky por su esfuerzo, dedicación y ayuda en muchos de los experimentos presentados en este trabajo.

A la Universidad de Córdoba, los miembros de la comisión, Viviana Re y Rubén Manzo, por la oportunidad y el privilegio de cursar mi doctorado en una institución de tanto prestigio.

Y por supuesto no puedo terminar sin antes expresar que no encuentro palabras para agradecer a María Gabriela Paglini todo lo que a hecho por mí. Le estaré eternamente agradecido y sabes que no desde ahora que estoy cerca de lograr este sueño, sino desde que empezamos a colaborar en este proyecto, cuentas con un amigo incondicional.

**Art. 43 “LA FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS NO SE HACE SOLIDARIA
CON LAS OPINIONES DE ESTA TESIS”.**

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	9
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
INTRODUCCIÓN	13
CAPÍTULO 1 : INFECCIONES DE TRANSMISIÓN SEXUAL	16
VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA	17
1.1.1 <i>Factores biológicos que influyen en la transmisión del VIH</i>	20
VIRUS DEL HERPES SIMPLE TIPO 2.	21
CAPÍTULO 2 : MICROBICIDAS	24
¿POR QUÉ SON NECESARIOS LOS MICROBICIDAS?	24
LA EVOLUCIÓN EN LA INVESTIGACIÓN DE MICROBICIDAS.....	25
<i>Surfactantes: agentes virucidas activos en superficie</i>	26
<i>Inhibidores de entrada/fusión viral</i>	26
<i>Inhibidores de enzimas virales</i>	29
<i>Probióticos</i>	33
ESTRATEGIAS PARA LA INVESTIGACIÓN PRECLÍNICA DE MICROBICIDAS	
CONTRA VIH Y VHS-2.	34
<i>Caracterización de las propiedades físico-químicas, liberación de las drogas</i>	
<i>formuladas y permeabilidad</i>	35
<i>Actividad antiviral in vitro y toxicidad celular</i>	35
<i>Selección y caracterización de cepas virales resistentes</i>	37
<i>Efectos en la microflora normal</i>	39
<i>Estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos</i>	40
<i>Estudios de la seguridad y eficacia en modelos animales</i>	40
HIPÓTESIS	44
OBJETIVO GENERAL	45
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
MATERIALES Y MÉTODOS	47
RESULTADOS	61
DISCUSIÓN	77
CONCLUSIONES	91
RECOMENDACIONES	92
ANEXOS	93
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURA 1. MECANISMO DE TRANSMISIÓN SEXUAL DEL VIH.	19
FIGURA 2. PATOGÉNESIS DEL VHS-2.	22
FIGURA 3. SECUENCIA A SEGUIR EN EL DESARROLLO DE PRODUCTOS CON FINES TERAPÉUTICOS O PREVENTIVOS EN HUMANOS	34
FIGURA 4. MIV-150 TIENE UN EFECTO ANTIVIRAL “MEMORIA” MUY POTENTE.....	62
FIGURA 5. CITOTOXICIDAD DE NNRTIS EN PBMC.....	64
FIGURA 6. CITOTOXICIDAD Y ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE AZ EN PBMC.	65
FIGURA 7. AZ EN COMBINACIÓN CON CG DISMINUYE SIGNIFICATIVAMENTE LA INFECCIÓN EN RATONES BALB-C.	71
FIGURA 8. EL GEL MIV-150/ZA/CG NO AFECTA LA INTEGRIDAD DE LA MUCOSA VAGINAL O RECTAL.....	72
FIGURA 9. EL GEL MIV-150/AZ/CG NO AFECTA LA VIABILIDAD DE LACTOBACILLI	73
FIGURA 10. EL GEL MIV-150/ZA/CG REDUCE SIGNIFICATIVAMENTE LA INFECCIÓN VAGINAL Y RECTAL CON ALTAS DOSIS DE VHS-2.	74
FIGURA 11. ACTIVIDAD ANTIVIRAL DEL GEL MIV-150/AZ/CG CONTRA CEPAS DE LABORATORIO.....	75
FIGURA 12. CITOTOXICIDAD DEL GEL MIV-150/AZ/CG EN PBMC.....	75
TABLA 1. NNRTIS CONTRA EL VIH.	31
TABLA 2. MUTACIONES ASOCIADAS A LA RESISTENCIA CONTRA NNRTIS	32
TABLA 3. CEPAS, AISLAMIENTOS O CLONES UTILIZADOS EN LOS EXPERIMENTOS CON VIH.	47
TABLA 4. AGENTES ANTIVIRALES UTILIZADOS EN LOS EXPERIMENTOS CON VIH-1 O VHS-2.	48
TABLA 5. FORMULACIONES UTILIZADAS EN LOS EXPERIMENTOS CON VIH-1 O VHS-2. ...	48
TABLA 6. CONSTANTES DE EQUILIBRIO DE LA INTERACCIÓN DE NNRTI CON RT TIPO SALVAJE (WT) Y MUTANTES UTILIZANDO LA TÉCNICA DE SPR.	61
TABLA 7. LOS NNRTI NO AFECTAN LA VIABILIDAD DE LACTOBACILLUS Y PERMANECEN ACTIVOS DURANTE LA TRANSICIÓN DE PH.....	63
TABLA 8. ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE NNRTIS, NRTI Y AZ CONTRA DIFERENTES AISLAMIENTOS PRIMARIOS TIPO SALVAJE O CLONES CON MUTACIONES QUE CONFIEREN MULTIRESISTENCIA VIRAL A ANTIRETROVIRALES	66
TABLA 9. RESISTENCIA CRUZADA A LOS DISTINTOS NNRTI DE LOS DIFERENTES AISLAMIENTOS VIRALES REALIZADOS EN CÉLULAS MT-4.	68
TABLA 10. DESARROLLO DE RESISTENCIA VIRAL <i>IN VITRO</i> EN PRESENCIA DE AZ, MIV-150 O LA COMBINACIÓN DE MIV-150 Y AZ.	69
TABLA 11. EFECTO ADITIVO DE LA COMBINACIÓN DE MIV-150 Y AZ UTILIZANDO EL MÉTODO DE CHOU-TALALAY	70
TABLA 12. SINERGISMO DE AZ Y CG UTILIZANDO EL MÉTODO DE CHOU-TALALAY	71
TABLA 13. ACTIVIDAD ANTIVIRAL DEL GEL MIV-150/AZ/CG CONTRA DIFERENTES AISLAMIENTOS PRIMARIOS TIPO SALVAJE O CLONES CON MUTACIONES QUE CONFIEREN MULTIRESISTENCIA VIRAL A ANTIRETROVIRALES	76

LISTA DE ABREVIATURAS

AA: aminoácidos

ACV: Aciclovir

ADARC: siglas en Inglés de Aaron Diamond AIDS Research Center

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

Ag: antígeno

ARN: ácido ribonucleico

ATCC: siglas en Inglés de American Type Culture Colection

AZ: acetato de zinc dihidratado

CC₅₀: concentración que afecta la viabilidad de las células en un 50%

CCR5: receptor de quimiocina tipo 5

CDC: siglas en Inglés de Center for Disease Control

CG: carragenina

CXCR4: receptor de quimiocina tipo 4

DPV: Dapivirina

CD: células dendríticas

DMEM: siglas en Inglés de medio eagle modificado por Dulbecco

D-PBS: siglas en Inglés de tampón fosfato salino de Dulbecco

CE₅₀: concentración efectiva que reduce 50% de la replicación viral

CE₇₅: concentración efectiva que reduce 75% de la replicación viral

CE₉₀: concentración efectiva que reduce 90% de la replicación viral

CMI₉₉: Concentración mínima que inhibe 99% del crecimiento bacteriano

DMSO: dimetil sulfóxido

EFV: Efavirenz

ELISA: siglas en Inglés de Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

ETR: Etravirina

FDA: siglas en Inglés de Food and Drug Administration

H&E: tinción hematoxilina-eosina

IC: índice de combinación

IS: índice selectivo

ITS: infecciones de transmisión sexual

K_A: constante de equilibrio de asociación

K_D: constante de equilibrio de disociación

DL₅₀: dosis letal que afecta al 50% de los animales

MAGI: siglas en Inglés de Multi-nuclear Activation of the Galactosidase Indicator

MAR: Mutaciones Asociadas a Resistencia

m.d.i.: multiplicidad de infección

MDR: siglas en Inglés de cepas con resistencia a múltiples drogas

MTN: siglas en Inglés de Microbicide Trial Network

NCI: siglas en Inglés de National Cancer Institute

NVP: Nevirapina

NIH: siglas en Inglés de National Institute of Health

NRTI: siglas en Inglés de Inhibidores de la transcriptasa inversa nucleosídicos

NNRTI: siglas en Inglés de Inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleosídicos

DO₄₉₀: Densidad óptica a 490 nm

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBMC: siglas en Inglés de células mononucleares de sangre periférica

PCR: siglas en inglés de reacción en cadena de la polimerasa

RPV: Rilpivirina

RPMI: siglas en Inglés de medio Roswell Park Memorial Institute

RT: siglas en Inglés de transcriptasa inversa

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

SHIV: siglas en Inglés de la quimera del virus de la inmunodeficiencia de los simios con el virus de la inmunodeficiencia humana

SFB: suero fetal bovino

SPR: siglas en Inglés de resonancia del plasmón de superficie

TCID₅₀: dosis de virus que infecta el 50% del las células

TEER: siglas en Inglés de Resistencia eléctrica transepitelial

TFV: Tenofovir

ufc: unidades formadoras de colonias

ufp: unidades formadoras de placas

VHS-2: virus del herpes simple tipo 2

VIH-1: virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

VHB: Virus de la hepatitis B

VPH: virus del papiloma humano

WT RT: siglas en Inglés de transcriptasa inversa tipo salvaje

XTT: sal de tetrazolio

RESUMEN

Los microbicidas constituyen una nueva herramienta, todavía en proceso de investigación, que podría ayudar en la prevención de la infección por los virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y otras infecciones de transmisión sexual. Una serie de evidencias han demostrado que la complejidad de la transmisión sexual del VIH requiere de la identificación de compuestos capaces de bloquear los eventos tempranos en el ciclo de infección viral. En este proyecto de investigación se identificaron potentes inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleosídicos y se seleccionó el mejor candidato (MIV-150) para combinar con acetato de zinc dihidratado (AZ).

Se realizaron varios ensayos *in vitro* e *in vivo* para determinar la seguridad y eficacia de cada compuesto separado o combinado. Estos ensayos incluyeron: citotoxicidad y actividad antiviral *in vitro* para determinar los índices selectivos y el efecto de la combinación MIV-150/AZ o AZ/Carragenina(CG), aislamientos de cepas virales del VIH-1 resistentes a los compuestos, resistencia eléctrica transepitelial para medir toxicidad en monocapas epiteliales diferenciadas, efecto en la viabilidad de lactobacilli, evaluación histológica de tejidos mucosales tratados con los compuestos y finalmente se estudió la eficacia contra el VHS-2 en un modelo animal.

Los compuestos, combinaciones y fórmulas no mostraron ningún efecto tóxico *in vitro* o *in vivo* y se demostró un amplio espectro de actividad antiviral *in vitro* contra VIH y una potente inhibición del virus del herpes simple tipo 2 (VHS-2) en el modelo animal. La combinación de MIV-150 con AZ resultó en un efecto aditivo en la actividad antiviral contra VIH-1, mientras que la combinación de AZ con CG mostró sinergismo en la actividad antiviral contra VHS-2. Los resultados expuestos en esta tesis posicionan al gel MIV-150/AZ/CG como un prometedor microbicida para la prevención de la transmisión sexual del VIH-1 y del VHS-2.

Palabras claves: VIH, VHS-2, microbicidas, antivirales

ABSTRACT

Microbicides are new tools that may help to prevent human immunodeficiency viruses (HIV) and other sexually transmitted infections. The complexity of HIV sexual transmission requires identifying compounds that block early steps in the viral cycle of replication. Taking this into consideration, potent non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors were identified in this project and the best candidate (MIV-150) was combined with zinc acetate dihydrate (ZA).

In vitro and *in vivo* assays were used to determine safety and efficacy of each compound or their combinations. These assays include: *in vitro* cytotoxicity and antiviral activity to determine selective indexes of each compound or the MIV-150/ZA or ZA/carrageenan(CG) combinations, selection of resistant viruses to these compounds, transepithelial electrical resistance to measure formulation toxicity on differentiated cell monolayers, lactobacilli viability in the presence of compounds or formulations, *in vivo* histological evaluation of mucosal tissues after vaginal or rectal application in mice and finally the efficacy against herpes simplex virus type 2 (HSV-2) in vaginal and rectal models.

All compounds, combinations or formulations were safe, showed a broad-spectrum antiviral activity against HIV *in vitro* and a potent anti-HSV-2 activity in a mouse model. The MIV-150/ZA combination provided an additive anti-HIV activity while the ZA/CG combination showed synergy against HSV-2. Our results demonstrate that the MIV-150/ZA/CG gel is safe and effective against HIV and HSV-2, and support the notion that the gel is a potential microbicide suitable for evaluation in clinical trials.

Key words: HIV, HSV-2, microbicides, antivirals

INTRODUCCIÓN

Desde el inicio de la pandemia a finales del siglo XX hasta la actualidad, las infecciones por el VIH y el consecuente desarrollo del SIDA, se han convertido en las principales causas de morbilidad y mortalidad en varias regiones del mundo. La habilidad del virus de mutar a una elevada frecuencia, junto con la capacidad de recombinación y otras estrategias para evadir la respuesta inmune, han dificultado el pronto desarrollo de una vacuna. Así, a tres décadas desde el descubrimiento del virus, la obtención de una vacuna todavía figura en un futuro lejano y nuevas estrategias deben ser empleadas para aminorar el crecimiento de la pandemia.

El mejor acercamiento para resolver esta problemática sería emplear todas las formas de prevención existentes incluyendo, cambios de conductas, uso de preservativos, circuncisión, diagnóstico temprano de enfermedades de transmisión sexual y su tratamiento, el cual incluye la intervención antirretroviral para infecciones recientes con VIH.

Una estrategia más reciente plantea el uso de microbicidas, los cuales constituyen nuevos productos de uso tópico, para prevenir la transmisión de VIH u otras enfermedades de transmisión sexual. Estos compuestos, además de ser efectivos y no tóxicos, deben ser asequibles económicamente para su uso en países subdesarrollados. Actualmente diferentes medios para suministrar estos productos están siendo investigados los cuales incluyen geles, cremas, filmes, supositorios y anillos vaginales [1].

El diseño de un microbicida efectivo requiere del conocimiento de los pasos que sigue el virus para el establecimiento de la infección en el tracto genital femenino y masculino, así como en el recto. La mucosa genital femenina consiste en un tejido epitelial estratificado escamoso en la vagina y ectocervix, mientras que el endocervix está formado por epitelio columnar. El recto por su parte, está constituido por tejido epitelial simple cilíndrico. Estos tejidos epiteliales establecen la primera barrera que el virus debe vencer antes de infectar las células hospedadoras por excelencia, los linfocitos T CD4+ [2]. Actualmente se acepta que

una forma de lograrlo es a través de la pérdida de la integridad del tejido, como consecuencia de infecciones genitales ulcerativas o abrasiones que se producen durante el coito. Otra hipótesis plantea la posibilidad de transitisión a través de las células epiteliales [3]. Las CDs, presentes entre células epiteliales (células de Langerhans) o en la dermis, también juegan un papel importante en el establecimiento de la infección promoviendo la multiplicación viral en linfocitos T CD4+ [2]. El virus puede ser capturado por estas células y transmitido a linfocitos T CD4 + (con previa replicación o no) [4].

Así, el primer paso para el desarrollo de microbicidas, está en identificar moléculas que puedan bloquear el establecimiento de la infección por el VIH. Los candidatos deben ser compuestos con un buen índice terapéutico, capaces de inhibir la replicación del virus a concentraciones bajas, tener buen perfil de resistencia, buena estabilidad y bajo costo de producción. Entre los compuestos que han sido y están siendo estudiados como agentes microbicidas se incluyen aquellos con actividad virucida (detergentes), moléculas que bloquean la adsorción y fusión a las células (polianiones, antagonistas del co-receptor CCR5), NRTIs o NNRTIs que bloquean la transcriptasa inversa (TMC-120, UC781, TFV), así como inhibidores de la integrasa viral [5].

Este proyecto se enfoca en la combinación de NNRTI y AZ por varias razones. Los NNRTIs tienen la capacidad de unirse a un sitio alostérico de la transcriptasa inversa e interferir con la replicación del VIH a dosis muy bajas [6]. Esto representa una importante ventaja si pensamos en el costo de producción y la necesidad de evitar efectos tóxicos. Sin embargo, el principal problema con estos compuestos está relacionado con el rápido desarrollo de resistencia viral. En este trabajo se evaluaron NNRTIs que han sido diseñados para mejorar el perfil de resistencia viral cuando se comparan con otros NNRTI que en la actualidad se utilizan para el tratamiento de individuos infectados con el VIH. También se estudió la combinación del NNRTI con AZ, lo cual mostró resultados alentadores.

En este sentido, varios estudios han demostrado que las sales de zinc tienen actividad antiviral contra un amplio rango de patógenos virales que incluye VIH y el

VHS-2 [7,8,9,10,11,12]. De esta manera, la aplicación tópica de bajas concentraciones de un NNRTI y AZ constituye una estrategia novedosa para prevenir la transmisión de VIH y otros virus como el VHS-2. El zinc es un elemento indispensable en organismos y microorganismos. Las funciones biológicas de este elemento, como un factor estructural o funcional, incluyen entre otras la participación en vías de transducción de señales, expresión de genes y metabolismo de diferentes biomoléculas [13,14]. Es por esto que varias sales de zinc representan un producto seguro para uso humano, de hecho el AZ se utiliza para el tratamiento de la enfermedad de Wilson y su uso es aprobado por la FDA [15]. Entre las ventajas de combinar AZ con un NNRTI en un microbicida se encuentran, la posibilidad de prevenir la transmisión de virus que provocan dos importantes enfermedades de transmisión sexual (VIH y VHS-2) con pequeñas dosis de cada compuesto, lo cual se traduciría en menos efectos tóxicos y bajo costo, al mismo tiempo que el desarrollo de resistencia viral pudiera ser disminuido.

A su vez, en este estudio, además de estimar el efecto antiviral de estos compuestos, se evaluó la eficacia y seguridad de esta combinación formulada en un gel de CG. La formulación de CG en un gel para la aplicación vaginal, ha mostrado ser segura y aceptable para el uso tópico en humanos [16,17,18,19,20,21,22,23,24]. El perfil de seguridad favorable, así como las propiedades físico-reológicas también favorables, hacen que los geles de CG sean vehículos idóneos para la formulación de microbicidas. Además, algunos estudios preclínicos y clínicos sugieren que la CG podría prevenir la transmisión sexual del VPH [25,26,27]. Es por esto que su uso ayudaría a incrementar aún más el espectro de patógenos que pudieran ser inhibidos por un gel que contenga la combinación de un NNRTI y AZ en un gel de CG.

Sobre la base de lo anteriormente expuesto y teniendo en cuenta que la complejidad de la transmisión del VIH y del VHS-2 requiere la identificación de compuestos capaces de bloquear los eventos tempranos en el ciclo de infección de estos virus; en este proyecto de investigación se identificaron nuevos NNRTIs y se seleccionó el mejor candidato para combinar con AZ y así se obtuvo una combinación capaz de bloquear la replicación de diferentes cepas del VIH-1 y de la cepa G del VHS-2, a concentraciones muy bajas con el menor efecto tóxico.

CAPÍTULO 1 : INFECCIONES DE TRANSMISIÓN SEXUAL.

Se denomina ITS al conjunto de afecciones infecto-contagiosas que se transmiten casi exclusivamente a través de relaciones sexuales, ya sea sexo vaginal, anal u oral. Los orígenes de las ITS o enfermedades venéreas puede que se remonten tan lejos como al mismo inicio de la civilización. La etimología del nombre venéreas está relacionado con la diosa romana Venus, sinónimo de amor, belleza y fertilidad, quizá para describir la necesidad de contacto íntimo para la propagación de agentes infecciosos.

Los agentes etiológicos de estas enfermedades pueden ser bacterias, protozoarios, chlamydias y virus entre los que se destacan: *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum*, *Trichomonas vaginalis*, *Chlamydia trachomatis*, VIH, VHS-2, VPH y VHB. Sin embargo, a través de la historia de la humanidad hay dos ITS, en particular, que sobresalen por la connotación que tuvieron o tienen debido a la alta cifra de incidencia o prevalencia que las hizo o hace convertirse en pandemias: sífilis y SIDA.

El azote de la sífilis se reporta desde los siglos XV y XVI y no fue hasta principios del siglo XX, con el descubrimiento de los antibióticos, que se logró el método más efectivo para controlar y curar dicha enfermedad. Aunque no han sido siglos, el tiempo ha transcurrido desde el descubrimiento del VIH y si bien se han dado importantes avances en el tratamiento de la infección todavía continua la búsqueda de una cura o método de prevención efectivo que logre frenar la pandemia.

Según datos estimados por la OMS, en el mundo se producen 499 millones de ITS curables cada año. A esta cifra no se le suma el número de infecciones no curables, causadas por agentes como el VIH, donde la presencia de ITS no tratadas puede aumentar 10 veces el riesgo de adquirir el virus (OMS).

Las ITS pueden tener un impacto negativo en la salud reproductiva, materna y

neonatal que incluye procesos inflamatorios, infertilidad, infecciones congénitas y perinatales, cáncer e infecciones oportunistas lo cual conlleva a los altos índices de morbilidad y mortalidad.

Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

En Junio de 1981 el CDC de Atlanta, Georgia, Estados Unidos, publicó los primeros casos de un síndrome caracterizado por el desarrollo de infecciones oportunistas y ciertos tipos de neoplasias como el sarcoma de Kaposi; la enfermedad se basaba en una deficiencia inmunológica, lo que le dio el nombre de SIDA [28].

En el año 1983 el grupo de Luc Montagnier [29], luego Robert Gallo y Jay Levy [30] aíslan de forma independiente un retrovirus linfotrópico de células T. Los estudios de los genomas de los tres aislamientos, si bien presentaban ciertas diferencias, eran variantes de un mismo virus cuya asociación etiológica al SIDA se demostró por seroepidemiología [31].

Desde entonces hasta la fecha, el VIH se ha convertido en uno de los patógenos virales de mayor repercusión en la historia de la humanidad. Según la OMS, alrededor de 34 millones de personas viven con VIH de ellos 30,7 millones son adultos, 16,7 millones mujeres y 3,3 millones son niños menores de 15 años. En el 2011 hubo 2,5 millones de nuevos casos de infección por VIH, y se calcula que 1,7 millones de personas murieron (OMS, 2013).

A pesar de que el VIH puede aislarse tanto de la sangre como de la mayoría de las secreciones y fluidos biológicos humanos, se ha demostrado que solo se transmite por relaciones sexuales (homo o heterosexuales) principalmente por vía anal o vaginal, por exposición parenteral a sangre o derivados hemáticos contaminados, por recepción de órganos que provienen de donantes infectados y por la transmisión vertical de madre a hijo [32]. La transmisión sexual es la vía más común y ocurre en un número limitado de formas que pueden ser prevenibles. En general, el riesgo de transmisión por VIH luego de una simple exposición al virus es bajo comparado con otras ITS. Se estima que la probabilidad de transmisión de

hombre a mujer por acto coital vaginal es de 0,0005-0,0026, sin embargo la probabilidad de transmisión de hombre a hombre u hombre a mujer por acto coital anal es mucho más alta [33].

El VIH es un virus envuelto, de aproximadamente 100 nm de diámetro perteneciente a la familia *Retroviridae*. Presenta como genoma un ARN de 9,2 ó 9,6 kb, monocatenario, diploide y de polaridad positiva [34]. Una característica fundamental de estos virus es la presencia en el virión de la enzima transcriptasa inversa encargada de producir una copia de ADN tomando como molde el ARN genómico inmediatamente después de producirse la penetración de la cápside al citoplasma de las células susceptibles a la infección.

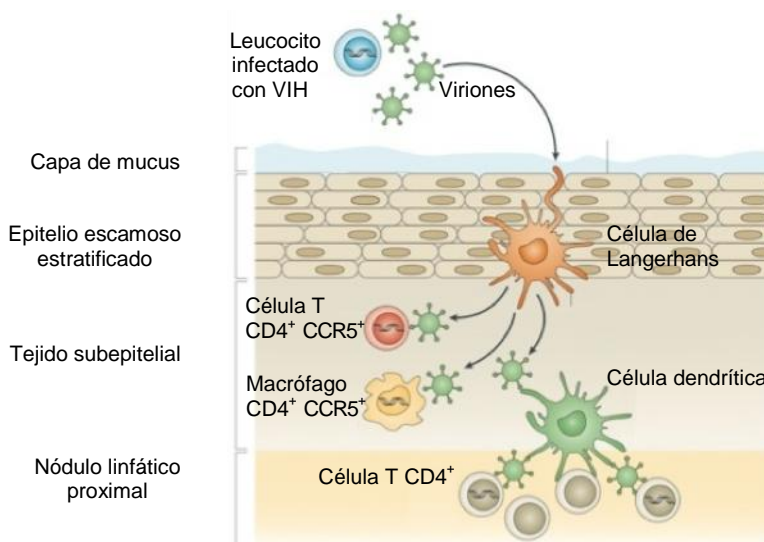
El tropismo celular se basa en la interacción específica de la glicoproteína viral más superficial de la envoltura vírica (gp120) con el receptor (CD4, $\alpha 4\beta 7$, otros) seguido por la interacción con co-receptores (CCR5, CXCR4, otros) que garantizan la entrada del virus a la célula para iniciar el ciclo de replicación viral [34,35]. En este complejo ciclo participan los productos de un total de tres genes estructurales y siete reguladores. El ciclo tiene dos fases divididas por el paso de integración. Una vez en el citoplasma la transcriptasa inversa, asociada a la nucleocápside viral, comienza a polimerizar ADN terminando la primera fase con la integración del ADN viral en el ADN celular mediante la ayuda de la integrasa viral (también asociada a la nucleocápside) [34]. Todos estos pasos de la primera fase de la replicación viral que incluyen la participación de ligandos o enzimas virales constituyen blancos idóneos para compuestos que inhiban estos procesos y que pueden ser utilizados en el tratamiento o prevención de la infección por VIH.

La segunda fase es alcanzada con la ayuda de la maquinaria celular, y para su inicio se necesita de la activación del provirus. Esta activación lleva al proceso de transcripción que permite producir ARN mensajeros o genómicos, seguido por la traducción de ARN mensajeros en proteínas, la formación de la cápside viral a nivel de membrana citoplasmática, liberación del virus por gemación y maduración. En el proceso de maduración participa la proteasa viral que también es blanco de compuestos antivirales usados en el tratamiento de la infección por VIH [34].

Todo este proceso a nivel celular, que el virus tiene que desarrollar para poder establecer la infección, es más complicado cuando se analiza a nivel de tejido u organismo. La figura 1 muestra un esquema que sintetiza el mecanismo que se acepta actualmente para explicar la transmisión sexual del VIH.

Figura 1. Mecanismo de transmisión sexual del VIH.

Se plantea que el VIH puede penetrar el epitelio escamoso estratificado del tejido ectocervical/vaginal y el epitelio columnar simple del tejido endocervical y rectal. Virus asociado o no a células, penetra en el mucus que cubre el epitelio, seguido por la entrada en el epitelio per se y subepitelio,



donde hay células susceptibles (CDs, linfocitos y macrófagos CD4⁺ CCR5⁺) que se encuentran embebidas en el epitelio o subepitelio [36]. El trayecto a estas células puede ser facilitado a través de abrasiones que se producen en el epitelio durante el acto sexual o por consecuencia de diferentes patologías, así como por translocación del virus a través de los espacios intersticiales. Cualquiera que sea el camino que el virus toma para iniciar la infección, no es fácil, y debe vencer barreras que el hospedador tiene para defenderse. Así se ha planteado que quizá una sola partícula infecciosa del VIH es responsable de establecer una pequeña población inicial en la puerta de entrada del tejido cervical, vaginal o rectal para luego expandirse hacia los nódulos linfáticos [36]. La figura es una modificación de la figura original publicada por Lederman y cols [36].

Aunque la interpretación actual de la secuencia que utiliza el virus para establecer la infección, indica varios puntos que pueden ser blanco para inhibir este proceso, todavía es necesario en algunos casos, que se establezca la relevancia y vulnerabilidad para ser bloqueados. Un entendimiento más completo y preciso de este proceso es de suma importancia para ayudar a establecer nuevas tecnologías para prevenir la transmisión del virus.

Sin embargo, cabe señalar que los avances en el tratamiento de la infección por VIH, con alrededor de 30 drogas aprobadas por la FDA, ha abierto el camino

para el uso de estos mismos compuestos, u otros con similar modo de acción, como potenciales herramientas para la prevención de la infección por VIH. Una revisión exhaustiva de este tópico se hace en el capítulo 2 de esta tesis.

1.1.1 Factores biológicos que influyen en la transmisión del VIH.

Entre todos los factores que influyen en la transmisión del VIH, la carga viral en el plasma del portador que transmite el virus es quizá el factor determinante en la predicción de la transmisión [37]. La infección primaria por VIH se caracteriza por una alta carga viral en los inicios de la infección especialmente en el plasma, en la orofaringe y en el tracto genital, constituyendo la etapa más propensa para la transmisión durante la historia natural de la infección. Si a esto se adicionan factores de comportamiento que incluye la frecuencia, naturaleza y duración del acto sexual, la probabilidad de infección aumenta. Todos los estudios hasta el día de hoy demuestran que el coito anal sin protección tiene un mayor riesgo que el sexo vaginal sin protección [37]. También el sexo receptivo es de mayor riesgo que el activo [37].

Varios mecanismos biológicos podrían explicar el mayor riesgo del sexo receptivo. Entre ellos se puede mencionar una superficie anatómica mayor y mayor número de células susceptibles al VIH en el recto o vagina comparado con el pene. Algunas investigaciones sugieren que componentes del semen pueden incrementar la infectividad del VIH [38]. También cabe mencionar el mayor grado de ruptura del epitelio, la influencia hormonal en la mujer y el alto grado de ITS sintomáticas en mujeres.

La presencia de ITS, especialmente aquellas que producen úlceras genitales, se ha descrito como uno de los factores más importantes que aumentan el riesgo de infección. El diagnóstico y tratamiento rápido de ITS puede disminuir el riesgo de adquirir VIH, así lo demostró un estudio realizado en Tanzania donde la incidencia del VIH se redujo en un 38% con un costo-beneficio favorable [39]. Entre los patógenos relacionados con un aumento en el riesgo de contraer VIH se encuentra el VHS-2.

Virus del Herpes Simple tipo 2.

Hace casi un siglo se reconoció por vez primera al herpes simple como un agente infeccioso. Sin embargo, escrituras antiguas que describen lesiones genitales quizá causada por este virus, se remontan a Circa 1500 a.C [40]. La estructura del VHS-2 es compleja, su centro es un núcleo electrodensito que consiste en una doble cadena de ADN (genoma viral) que codifica al menos 76 proteínas virales diferentes. El virión, con 225 nm de diámetro, es envuelto y en su superficie muestra alrededor de 11 glicoproteínas virales (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL y gM) que participan principalmente en el proceso de adsorción y fusión a la membrana de las células hospedadoras. El virus pertenece a la familia Herpesviridae.

Luego de la adsorción y fusión, el ciclo de replicación del VHS-2 continua con el transporte de la nucleocápside viral al núcleo de la célula hospedadora. Una vez en el núcleo, el genoma viral sirve de molde para la expresión de proteínas funcionales que regulan la expresión de genes virales como la ADN polimerasa viral (blanco del antiviral ACV) y proteínas estructurales para la producción de nuevos viriones. El ensamblaje de las partículas virales tiene lugar en el núcleo, donde adquieren una pseudomembrana a partir de la gemación de la lamela más interna de la membrana nuclear, dirigiéndose luego hacia la membrana plasmática para apropiarse de una envoltura rica en glicoproteínas virales y ser liberados los viriones con la consecuente lisis de la célula [41].

Este ciclo de replicación viral se manifiesta en la epidermis de la mucosa genital y anal que constituye el sitio primario de replicación del virus, además del sitio de recurrencia en caso de la reactivación viral de virus latente en ganglios sensoriales. La figura 2 describe la historia natural de la infección por VHS-2.

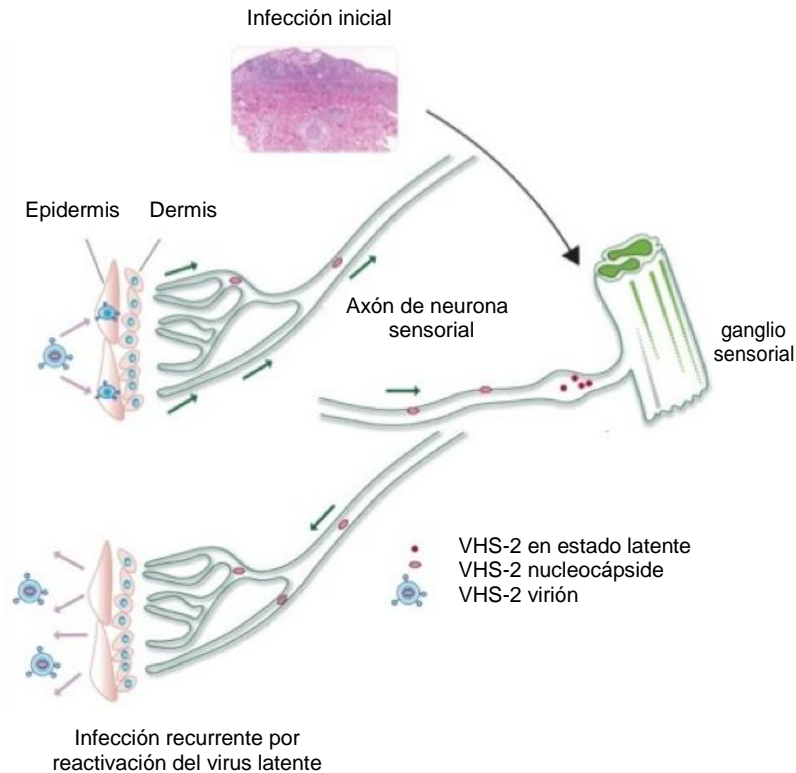


Figura 2. Patogénesis del VHS-2. El virus tiene su sitio primario de replicación en las células epiteliales de la mucosa genital o anal. El VHS-2 es transportado a lo largo del axón de neuronas sensoriales retrógradamente, hacia el ganglio sensorial donde establece latencia. La latencia es mantenida bajo vigilancia del sistema inmune que también controla al virus presente en la mucosa. Bajo determinadas condiciones, que incluyen estrés, inmunodeficiencia o inmunosupresión, el virus es reactivado y transportado de forma anterógrada a la mucosa genital o anal donde nuevamente se replica. Durante la replicación, puede o no producir lesiones y ser transmitido a otro hospedador susceptible. La figura es una modificación de la figura original publicada por Gupta y cols [42].

Se cree que personas con infección asintomática por VHS-2 liberan virus en el tracto genital de forma intermitente pero con menos frecuencia que personas con infección sintomática. Aún así, la mayoría de infecciones por herpes son adquiridas de personas sin previa historia clínica de herpes genital. Se estima un total de 536 millones de personas infectadas globalmente con una incidencia anual de 23,6 millones de casos en personas entre los 15 y 49 años de edad.

La infección con el VHS-2 se ha relacionado con un alto riesgo de infección por VIH. La transmisión de VIH es más eficiente en parejas serodiscordantes

cuando el portador de VIH también reporta úlceras genitales recientes [37,43]. La carga viral de VIH en plasma y mucosa genital aumenta durante reactivaciones sintomáticas y asintomáticas del VHS-2 [44]. Algunos estudios *in vitro* e *in vivo* muestran que el VHS-2 puede incrementar la entrada del VIH a células blanco o amplificar la población de células susceptibles al VIH [45,46]. También los niveles de VIH en el recto, tracto vaginal, fluido seminal y plasma se reducen en seropositivos al VHS-2 y VIH-1, cuando son tratados con valacyclovir para suprimir al VHS-2 [47,48,49,50].

El VHS-2 junto al VIH y el VPH constituyen las tres infecciones virales, transmitidas sexualmente, de mayor repercusión en la salud humana. Los tres virus producen infecciones crónicas o latentes, que hasta el día de hoy, no pueden ser eliminadas a través de ningún tratamiento antiviral y resultan en una alta morbilidad o mortalidad. El hecho de que tanto la presencia de VHS-2 como VPH pueden aumentar el riesgo de infección por VIH [44,51] hace que estrategias novedosas para prevenir la transmisión de estos patógenos constituya un campo de investigación de prioridad para mejorar el bienestar de millones de seres humanos, la mayoría del tercer mundo.

CAPÍTULO 2 : MICROBICIDAS.

Según la definición de la OMS, microbicidas son compuestos que pueden ser aplicados de forma intravaginal o intrarectal para proteger contra ITS que incluye el VIH. Los microbicidas pueden ser formulados como geles, cremas, filmes o supositorios y pueden tener o no efecto anticonceptivo. En la actualidad, aún no existe un microbicida efectivo que haya sido aprobado para la prevención de ITS. Sin embargo el concepto antes expuesto puede ampliarse aún más si consideramos como microbicidas otros sistemas para formular y administrar drogas como son los anillos vaginales, tabletas o dispositivos intrauterinos e incluso probióticos que han sido modificados genéticamente para expresar moléculas que puedan inhibir ITS.

¿Por qué son necesarios los microbicidas?

La transmisión sexual es responsable hoy en día del mayor número de nuevas infecciones por VIH a nivel mundial. Cambios en los hábitos sexuales a través de asesoramiento, el uso de condones para hombres o mujeres, el uso de terapia antirretroviral en la persona infectada en parejas serodiscordantes, la circuncisión en el hombre y el tratamiento de ITS pueden todos reducir el riesgo de adquirir VIH. Sin embargo a pesar de tener todas estas herramientas la epidemia sigue estable o aumenta en varias partes del mundo con una incidencia global anual de 2,7 millones de infecciones. En este total el 50% son mujeres y otro alto porcentaje, aunque difícil de estimar globalmente, corresponde a hombres que tienen sexo con hombres (OMS, 2013).

La transmisión heterosexual o homosexual juega un importante rol en la infección de mujeres y hombres, y entre las opciones disponibles para reducir la transmisión, virtualmente todas requieren del consentimiento de la pareja para ser efectivas. En esta situación, la desigualdad entre géneros, la dependencia de la pareja para la seguridad económica, la dinámica de relaciones entre parejas, son algunos de los factores que contribuyen al fallo de estas herramientas para la prevención del VIH.

En conclusión se necesitan nuevas estrategias que den múltiples opciones

para prevenir la infección por VIH. En este contexto, los microbicidas ofrecen el potencial de un método que pudiera ser controlado por el miembro dependiente de la pareja sin el necesario consentimiento del otro. Los microbicidas pueden ser formulados en anillos vaginales, tabletas o filmes que logran pasar desapercibidos durante el acto sexual. Quizá los geles, en especial si se utilizan justo antes del coito, son los más propensos a ser percibidos, pero podrían sustituir el uso de lubricantes sexuales que pueden incrementar el placer sexual y gozan de buena aceptación.

La evolución en la investigación de microbicidas.

El inicio en la investigación de microbicidas se basó en la búsqueda de compuestos capaces de inactivar el virus o bloquear la entrada en las células blanco. Muchos de estos candidatos, que iniciaron el proceso en la búsqueda de microbicidas, carecieron de un estudio profundo de su seguridad y eficacia. Esto se debió a la falta de modelos *in vitro* o *in vivo* para evaluar estos parámetros, ya que se trataba de un acercamiento novedoso a la prevención de ITS. Lo que hemos aprendido hoy en día, es que estos candidatos mostraron resultados adversos probablemente por la baja selectividad de la actividad antiviral, la baja potencia y la poca durabilidad [52].

Es así que en la actualidad se están evaluando compuestos más potentes con índices de selectividad altos que buscan inhibir enzimas o proteínas virales que son claves en la replicación del virus. Entre estos se encuentran aquellos inhibidores de la adsorción o fusión, inhibidores de la transcriptasa inversa y de la integrasa viral [5]. También, usando como paradigma la efectividad de la terapia antiretroviral altamente activa, se está explorando la combinación de varios compuestos con diferente modo de acción. Esta estrategia no solo ayudaría a minimizar una posible resistencia viral del VIH, sino que también podría generar microbicidas de espectro amplio, capaces de bloquear diferentes ITS. Las secciones 2.2.1 a la 2.2.4 describen de forma específica, los diferentes microbicidas que han sido contemplados desde el inicio en la investigación de este novedoso enfoque para la prevención del VIH y otras ITS.

Surfactantes: agentes virucidas activos en superficie

El agente surfactante no iónico nonoxynol-9 es considerado el primer microbicida estudiado en ensayos clínicos. Esta fórmula ya había sido creada y aprobada para su venta como agente espermicida sin necesidad de prescripción médica [53]. Los ensayos clínicos realizados en trabajadores sexuales en África y Tailandia demostraron un incremento en el riesgo de contraer VIH posiblemente debido a la disrupción del epitelio vaginal tras el uso de este producto [54].

El surfactante anfotérico, C31G o SAVVY, inició ensayos clínicos que fueron rápidamente detenidos debido a futilidad [55]. El surfactante catiónico cloruro de benzalconio, con un historial parecido a nonoxynol-9 en relación a su uso como espermicida, también fue contemplado como posible microbicida. Sin embargo, al igual que nonoxynol-9, la posibilidad de causar irritación vaginal e incrementar citocinas proinflamatorias impidió su evaluación como microbicida [56].

Inhibidores de entrada/fusión viral.

Este grupo incluye varias moléculas que han sido o están siendo estudiadas como posibles microbicidas. Entre las moléculas que forman parte de estrategias ya evaluadas sin resultados positivos cabe señalar los polianiones y agentes acidificantes. Las lectinas, los anticuerpos neutralizantes contra la gp120 del VIH, péptidos inhibidores de la fusión viral, inhibidores del co-receptor CCR5 y aptámeros forman parte del presente y futuro.

Los polianiones con cargas negativas, debido a la presencia de grupos sulfatos o sulfonatos, tienen la habilidad de interactuar con cargas positivas de la glicoproteína viral gp120 y bloquear la entrada del virus a las células blanco. Un aspecto interesante es la capacidad de bloquear virus que utilizan el co-receptor CXCR4 con mayor facilidad que los que usan el co-receptor CCR5 [57,58,59]. La explicación de este fenómeno se cree que debe estar relacionada a la mayor carga positiva en la gp120 de los virus que utilizan el co-receptor CXCR4 [58,60]. Sin embargo son los virus que utilizan CCR5, los que están mayormente vinculados a la transmisión del VIH [61]. La potencia más baja contra estos virus, disminución

de la actividad antiviral en presencia de fluidos biológicos, al igual que una duración corta del efecto antiviral puede ser la explicación de porque no mostraron eficacia contra VIH en los ensayos clínicos [52,62,63,64].

Carraguard, un gel que contiene carragenina derivado de un alga, fue el primer polianión estudiado en ensayos clínicos. Si bien este compuesto no mostró eficacia contra el VIH, demostró ser seguro sin efecto dañino por su uso [19]. También mostró buena aceptabilidad, lo cual unido a sus propiedades reológicas favorables lo convierten en un vehículo adecuado para formular otros compuestos más potentes con actividad antiviral contra el VIH u otras ITS [11,16,17,18,19,20,21,22,23,24]. De igual forma, otro polianión, PRO2000 no demostró eficacia contra VIH en un ensayo clínico que evaluó dos dosis (0,5% y 2%) diferentes de su compuesto activo (sulfonato de naftaleno) [65].

En la actualidad otro polianión, VivaGel, está siendo evaluado como posible candidato a microbicida. Este microbicida se basa en polímeros de dendrímeros con un mayor tamaño que los polianiones antes descrito y mayor capacidad de atrapar virus. Al igual que otros polianiones ha mostrado actividad antiviral contra varias ITS como VHS-2 y VPH [66]

En el grupo de agentes acidificantes el candidato a microbicida más estudiado ha sido BufferGel. La fórmula consiste en un tampón fuerte capaz de mantener la acidez normal de la vagina aún en presencia del eyaculado. Varios estudios han sugerido que VIH puede ser inactivado fácilmente a $\text{pH} < 4$. Los estudios en fases clínicas 1 y 2/2b sugieren que la fórmula es segura pero ineficaz contra el VIH [67].

Los anticuerpos monoclonales neutralizantes que reconocen la glicoproteína gp120 han mostrado eficacia en modelos animales [68]. Entre los anticuerpos con posible actividad microbicida destacan b12, 2G12 y PRO140 [69,70,71]. La principal desventaja de estas moléculas radica en la necesidad de fórmulas con concentraciones altas de anticuerpos. La tecnología actual no permite la producción en alta escala y bajo costo de estos anticuerpos para poder ser utilizados como

agentes microbicidas.

Las lectinas como cianovirina-N tienen un modo de acción parecido a estos anticuerpos y han mostrado ser eficaces en modelos animales vaginales y rectales [72,73]. Griffithsin, otra lectina, es quizá la molécula más prometedora de este grupo. Griffithsin muestra valores de CE_{50} subnanomolares, baja capacidad de inducir respuestas inflamatorias y ha sido expresada y purificada en plantas que permite su producción en alta escala [74]. Esta lectina tiene un amplio espectro de actividad antiviral *in vitro* que incluye virus envueltos. La actividad antiviral *in vitro* contra VHS-2 es moderada pero ha mostrado una potente actividad antiviral en el modelo animal [75].

Los péptidos con secuencias basadas en la glicoproteína viral gp41 del VIH han sido empleados para inhibir la fusión viral a células blanco [76]. De hecho, efurvitide (T-20) se emplea en el tratamiento del VIH en individuos infectados por el virus. T-20, C52L y T1249 han sido evaluados en modelos animales para prevenir la infección por el SHIV [77,78]. Estas moléculas tienen la ventaja de tener un amplio espectro antiviral contra la mayoría de diferentes subtipos del VIH pero las limita el proceso y costo de producción.

Un grupo bien particular lo constituye aquellos antivirales que bloquean moléculas de la célula hospedador utilizadas por el virus, tal es el caso de Maraviroc y PC-RANTES. Estas moléculas no solo pueden competir con el virus por la unión al co-receptor CCR5, sino que también pueden regular de forma negativa la expresión del mismo [79,80]. Una de las ventajas de estas moléculas es el hecho de poder evadir mutaciones virales ya que el blanco es una proteína del hospedador. Sin embargo, el virus ha mostrado la capacidad de utilizar diferentes co-receptores y se desconoce si esto pudiera resultar en la selección de nuevas cepas virales con afinidad por otros co-receptores. Estas moléculas también cuentan con el inconveniente del costo de producción y existe la posibilidad de respuestas inflamatorias o humorales.

Inhibidores de enzimas virales.

Hace casi 30 años el análogo nucleosídico azidotimidina (zidovudina) se convirtió en la primera droga en mostrar actividad antiviral contra el VIH [81]. Se describió como un inhibidor competitivo de la RT que una vez metabolizado por las células se convertía en análogo nucleotídico. De esta forma se estableció la primera clase de agentes antiretrovirales: los NRTI.

Los compuestos de esta clase son inactivos en su forma original y requieren de sucesivos pasos de fosforilación por quinasas y fosfotransferasas celulares para convertirlos en análogos de nucleótidos. Los NRTI compiten con los nucleótidos endógenos por su incorporación en la RT durante la polimerización y funcionan como terminadores de cadena [81].

Hoy en día se cuenta con un total de 8 NRTI que se utilizan en el tratamiento de pacientes con VIH mientras otros NRTI o sus pro-drogas se encuentran en varias etapas de desarrollo clínico. Entre los NRTI en uso para el tratamiento del VIH están el antes mencionado zidovudina además de didanosina, zalcitabina, estavudina, lamivudina, abacavir, la pro-droga TFV disoproxil fumarato y entricitabina. A la combinación de TFV disoproxil fumarato y entricitabina se le conoce como TRUVADA [81]. Estos dos últimos NRTI y su combinación, han revolucionado la investigación de microbicidas y en general de métodos novedosos para la prevención del VIH.

En el año 2010 el ensayo clínico de fase 2b CAPRISA 004, mostró que un gel que contiene 1% TFV reducía en un 39% la incidencia de VIH (intervalo de confianza al 95% de 6 a 60) [82]. Este ensayo se convirtió en la primera prueba de concepto de que un antirretroviral suministrado vaginalmente pudiera ser un microbicida efectivo. Algo inesperado en CAPRISA 004 fue un 51% de reducción en la incidencia del VHS-2. Estudios preclínicos no han sugerido que TFV tenga una alta potencia o índice selectivo contra VHS-2 [83]. En el 2011, MTN inició un estudio llamado VOICE, que examinaba la seguridad y efectividad del gel que contiene 1% TFV suministrado diariamente y también se evaluó la droga TRUVADA suministrada diariamente pero de forma oral. Este ensayo clínico arrojó

un resultado inesperado ya que tuvo que ser detenido por futilidad [84]. En la actualidad esta teniendo lugar un estudio confirmatorio (FACTS 001) que busca extender los hallazgos del ensayo clínico CAPRISA 004. Este ensayo consiste en administrar el gel de TFV vaginalmente, antes y después del coito, en mujeres entre 18 y 30 años de edad (Facts Consortium, 2013).

Otros estudios relacionados con estrategias para la prevención del VIH, y que también han utilizado las drogas TFV y TRUVADA, han arrojado resultados muy alentadores. Entre estos estudios se destacan los siguientes ensayos clínicos de pre-exposición oral:

- iPrEx, Partners PrEP y TDF2 realizados en hombres que tienen sexo con hombres, transgéneros y parejas serodiscordantes al VIH demostraron una reducción entre 44 y 63% de la incidencia del VIH [84].
- FEM-PrEP realizado en mujeres con alto riesgo de contraer el VIH, al igual que VOICE resultó en la ausencia de eficacia. Esto puede deberse a la falta de adhesión de las participantes en el estudio [85,86].

Otro grupo de drogas antiretrovirales, también contemplado en el desarrollo de microbicidas son los NNRTI. Los NNRTI son inhibidores no competitivos que se unen a un sitio alósterico de la RT e inducen cambios conformacionales que afectan el sitio activo de la enzima. Se caracterizan por una alta potencia, entre 100 y 1000 veces más potentes que los NRTI cuando se comparan las CE_{50} . Los NNRTI juegan un papel fundamental en la terapia combinada contra el VIH debido no solo a su alta potencia sino también a su relativa baja toxicidad cuando se comparan con otros antiretrovirales.

La era de los NNRTI comenzó hace más de dos décadas con el descubrimiento de HEPT y TIBO (tabla 1) como inhibidores específicos de la RT. Desde entonces se han descrito cerca de 30 clases estructurales diferentes, de los cuales solo cinco (NVP, delavirdina, EFV, ETR y RPV) se han utilizado o utilizan en el tratamiento de pacientes con el VIH. La tabla 1 muestra algunos de estos NNRTIs.

Tabla 1. NNRTIs contra el VIH.

NNRTI	Referencia
Tivirapina derivado de TIBO (R86183)	[87]
MKC-442 derivado de HEPT	[88]
NVP (BIRG-587)	[89]
Pyridinonas (L-697,661)	[90]
Delavirdina derivado de BHAP (U-90152)	[91]
TSAO-m ³ T derivado de TSAO	[92]
Lovirida derivado de α -APA	[93]
Trovirdina derivado de PETT	[94]
UC-781 derivado de tiocarboxianilina	[95]
HBY 097 derivado de quinoxalina	[96]
NSC 625487 derivado de tiazolobencimidazol	[97]
Derivados de tiazoloindolinona	[98]
L-737,126 derivado de indol-carboxamida	[99]
NSC 287474 derivado de benzotiadiazina	[100]
Derivados de quinazolinones	[101]
EFV derivado de benzoxazinones	[102]
Calanolida A	[103]
pyrrolobenzodiazepinas	[98]
Derivados de DABO	[104]
ETR and RPV, DAPY (diarylpyrimidinas)	[105,106,107]

La principal desventaja de los NNRTI quizá radica en la resistencia viral rápida que el VIH puede desarrollar, así como problemas farmacocinéticos. Es por ello que el estudio minucioso del perfil de resistencia viral constituye un paso fundamental a la hora de elegir un NNRTI como candidato a microbicida. La tabla 2 presenta una lista de mutaciones asociadas a resistencia del VIH contra los NNRTIs. Los primeros reportes de mutantes con baja susceptibilidad a NNRTI se basaban en mutaciones localizadas en el bolsillo hidrofóbico de la RT, sitio alósterico que los NNRTI utilizan en su unión a la RT. Estas mutaciones se observan fundamentalmente en dominios de la subunidad p66 de la RT que abarcan los aminoácidos 98-108, 178-190 y 225-238 [108]. Las mutaciones más prevalentes en virus aislados de pacientes donde el tratamiento con NNRTIs ha fallado son K103N y Y181C. También se han identificado mutaciones fuera de estos dominios como es el caso de Y138F y E138G/K/Q. En total son cerca de 40 las sustituciones aminoacídicas que han sido vinculadas con resistencia a los NNRTIs [6].

Tabla 2. Mutaciones asociadas a la resistencia contra NNRTIs [6].

NNRTI MAR	PREVALENCIA(%)§	CAMBIO EN LA SUSCEPTIBILIDAD DEL VIH (MÚLTIPLO DEL INCREMENTO DE LA CE ₅₀)		
		EFV	NVP	ETR
V90I	4,68	1,7	3,8	1,5
A98G	3,46	2,2	8,1	2,5
L100I	2,96	13,1	ND	1,8
K101E / P / Q	3,89 / 0,87 / 3,02	2,9 / 97,4 / 3,8	4,3 / >733,4 / ND	1,7 / 6,2 / 3,4
K103H / N / S / T	0,08 / 24,34 / 1,11 / 0,07	15,6 / 26,7 / 4,9 / 1,4	17,8 / 56,2 / 36,2 / >37	1,6 / 0,7 / 0,9 / 1,3
V106A / I / M	1,01 / 2,62 / 0,49	1,8 / ND / 2,3	86,1 / ND / 6,9	0,5 / ND / 0,8
V108I	4,81	1,2	2,7	0,5
E138G / K / Q	0,42 / 0,34 / 0,42	2,3 / 1,8 / 7,1	ND / 1,7 / ND	3,8 / 2,4 / 5,1
V179D / E / F / G / I	1,75 / 0,75 / 0,15 / 0,08 / 8,55	6,2 / 4 / 0,4 / 0,6 / 0,9	5,7 / 2,6 / 1,6 / ND / 1,3	2,6 / 1,1 / 0,1 / 0,6 / 0,8
Y181C / I / V	10,66 / 0,45 / 0,27	2,2 / 1,6 / 2,8	207,6 / >55,5 / 2155,9	3,9 / 12,5 / 17,4
Y188C / H / L	0,18 / 0,44 / 2,72	2,1 / 7,6 / 31,9	36,5 / 5,5 / 173,4	0,2 / 0,3 / 0,9
V189I	1,73	1,2	2,9	0,8
G190A / C / E / Q / S	8,16 / 0,07 / 0,29 / 0,2 / 1,66	6,8 / ND / ND / ND / 94,4	105 / ND / ND / ND / 177	0,8 / ND / ND / ND / 0,2
H221Y	3,75	2,4	4,4	2,5
P225H	2,34	2,2	2,8	1
F227C / L	0,01 / 0,97	27,2 / 0,7	24,3 / 2,9	3,6 / 0,4
M230I / L	0,08 / 0,5	4,7 / 5,7	13,1 / 13,9	2,4 / 3,4
P236L	0,09	2,4	4,6	1,3
K238N / T	0,35 / 1,79	2,7 / 3,4	ND / ND	1,7 / 2,4
Y318F	0,85	0,6	1,5	1,4

§ Representa la prevalencia de la mutación en ensayos de rutina para detectar resistencia clínica; ND=no determinado.

Las bases estructurales de la resistencia viral a NNRTIs se ha logrado comprobar a través de estudios cristalográficos. Por ejemplo NVP y delavirdina dependen mucho de la interacción por apilamiento de anillos aromáticos entre el NNRTI y los residuos aminoacídicos en las posiciones Y181 e Y188. Cuando el aminoácido aromático Y muta a un aminoácido neutro o con carga positiva como es el caso de C, I, V o H, se pierde esta interacción [108].

Varios NNRTI han sido o están siendo estudiados como agentes microbicidas. Entre ellos se encuentran UC781, DPV y RPV. Estos NNRTI se consideran moléculas con una alta afinidad por la RT (“*tight binding*”), con posible actividad virucida, además de un efecto denominado “efecto memoria” [109]. El “efecto memoria” consiste en una persistencia prolongada de la actividad antiviral *in vitro* aún cuando las células, expuestas a estas moléculas, son lavadas extensivamente antes de ser inoculadas con VIH. Se han realizado estudios preclínicos y clínicos de fase 1 con UC781 formulado al 0,1 ó 0,25% en geles, sin embargo dificultades asociadas con la obtención de formulas estables hicieron que

se detuviera el desarrollo de este NNRTI. Por su parte DPV ha sido formulado en geles y anillos vaginales que han servido para realizar varios estudios preclínicos y clínicos para acceder a la seguridad y farmacocinética de estas formulaciones. En la actualidad un estudio de fase clínica 3 (ASPIRE) está evaluando la eficacia de un anillo vaginal que contiene DPV. El anillo, denominado Ring-004, consiste en DPV formulado en silicona catalizada con platino para mejorar la estabilidad (MTN, 2013). Adicionalmente el NNRTI RPV está siendo estudiado en ensayos clínicos. El compuesto se ha formulado para ser inyectado intramuscularmente (600 mg) y mantener en el organismo niveles de la droga capaces de prevenir la adquisición del VIH por un largo período de tiempo [110].

Los inhibidores de la integrasa del VIH es otro grupo que recientemente se ha unido al arsenal de compuestos con un potencial de ser desarrollados como microbicidas. Al igual que los NNRTIs se caracterizan por CE_{50} subnanomolares y no requieren ser activados por las células blanco. Los inhibidores de la integrasa se clasifican de acuerdo al sitio de inhibición en inhibidores de 3'-P, inhibidores de la transferencia de cadena e inhibidores del complejo macromolecular LEDGF/p75-IN [111]. Entre los compuestos que más se destacan en este grupo están raltegravir, elvitegravir y dolutegravir ([112,113].

Probióticos.

El reconocimiento de este grupo de posibles microbicidas ha ido en ascenso. Se trata de promover la colonización en la vagina de microorganismos modificados genéticamente para expresar moléculas capaces de inhibir el VIH u otra ITS [114,115]. Estos probióticos utilizan en su mayoría bacterias del género *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*. Estos mismos géneros han sido evaluados en ensayos clínicos con otros fines para la prevención de enterocolitis, diarrea y reacciones alérgicas [116]. El principal desafío está en que estos probióticos mantengan estabilidad genética, se adhieran y persistan, que produzcan el compuesto en concentraciones suficientes y sostenidas para bloquear la transmisión del VIH u otra ITS y además mantengan el balance normal de la microflora vaginal.

ESTRATEGIAS PARA LA INVESTIGACIÓN PRECLÍNICA DE MICROBICIDAS CONTRA VIH Y VHS-2.

Antes de iniciar estudios clínicos con cualquier droga o dispositivo con fines terapéuticos o preventivos en humanos, se requiere un estudio minucioso utilizando sistemas *in vitro* y modelos animales que informen sobre la seguridad y eficacia de dicha droga o dispositivo. Estos estudios, en su mayoría guiados por pre-requisitos sugeridos o impuestos por agencias reguladoras que aprueban los ensayos clínicos, ayudan a un acercamiento racional y ético que finalmente permite el estudio en humanos.

La figura 3 muestra el algoritmo a seguir en el desarrollo de cualquier producto con fines terapéuticos o preventivos. Las cinco fases descritas se inician con la investigación básica donde se trata de ampliar el conocimiento de los principios fundamentales que rigen el fenómeno que se estudia. En el caso específico de microbicidas contra VIH y VHS-2, la investigación básica se centra en tratar de entender con el mayor lujo de detalles el proceso de transmisión viral, cuales son los factores claves que propician el establecimiento de la infección y los puntos débiles de este proceso que se pueden convertir en blanco de nuevas estrategias para la prevención. Estas nuevas estrategias podrían ser drogas o dispositivos novedosos que bloquean el establecimiento de la infección lo cual requiere una serie de estudios preclínicos que comprueben la selectividad de la droga o dispositivo para bloquear al agente infeccioso sin causar daño en el hospedador (humanos).

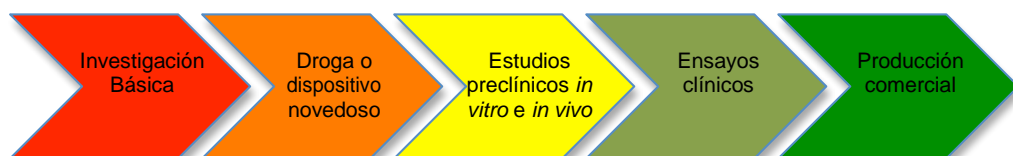


Figura 3. Secuencia a seguir en el desarrollo de productos con fines terapéuticos o preventivos en humanos.

En las dos últimas fases se prueba la seguridad y eficacia en humanos a través de diferentes fases clínicas seguidas por la introducción del producto al

mercado. Aunque el diagrama parece un proceso simple y rápido, estos estudios desde la investigación básica hasta la producción comercial, pueden tardar un promedio de 12 a 15 años.

Caracterización de las propiedades físico-químicas, liberación de las drogas formuladas y permeabilidad.

Los estudios preclínicos de microbicidas empiezan con una evaluación extensa de las propiedades físico-químicas de los candidatos. Entre los estudios previos a la formulación destacan la solubilidad, estabilidad física y química, compatibilidad con excipientes y estudios de combinaciones. Una vez formulado el microbicida se debe tener en cuenta pH, osmolaridad, propiedades reológicas en el caso de un gel, apariencia, olor, contenido y uniformidad de la droga, impurezas, volumen de las dosis, dimensiones del producto, entre otras características.

Luego de contar con un prototipo de la formulación se deben realizar estudios de estabilidad química y física. Se recomienda hacer estudios de almacenamiento prolongado (25°C/60% de humedad relativa o 30°C/65% de humedad relativa) o acelerado (40°C/75% de humedad relativa, > 40°C para anillos vaginales) así como otras condiciones como por ejemplo exposición a la luz [117].

También durante el desarrollo temprano de la investigación de un microbicida se deben realizar estudios de disolución *in vitro* que se realizan utilizando diversos procedimientos, dependiendo del tipo de formulación. En el caso de un gel, los estudios de liberación se realizan empleando celdas tipo Franz mientras que los anillos vaginales emplean sistemas de incubación con agitación orbital [118]. Otros estudios relevantes, incluye la permeabilidad en tejidos para lo cual se han desarrollado diferentes sistemas *in vitro* e *in vivo* entre los que destacan los explantes ectocervicales y colorectales [119].

Actividad antiviral *in vitro* y toxicidad celular.

A diferencia de los ensayos de susceptibilidad en bacterias, no existe un ensayo estándar para determinar actividad antiviral y numerosas variables pueden afectar

el resultado de este tipo de ensayo:

- El ensayo de la actividad antiviral contra un mismo virus en diferentes cultivos celulares (línea celular indicadora o cultivo primario) puede conllevar a resultados diferentes.
- El uso de cepas virales semillas o aislamientos primarios pueden mostrar diferente susceptibilidad a un agente antiviral.
- El uso de inóculos virales muy concentrados puede traducirse en una falsa resistencia al agente antiviral, de igual forma el uso de un inóculo muy diluido puede aparentar una sensibilidad extrema al mismo agente.
- La opción del ensayo antiviral *per se* es otra variable debido a la diversidad de métodos disponibles.

En los últimos tiempos se han desarrollado múltiples bioensayos para la evaluación *in vitro* de compuestos con potencial antiviral. Estos métodos se basan en determinar la concentración efectiva media (CE_{50}) teniendo en cuenta la concentración citotóxica media (CC_{50}) para establecer la relación CC_{50}/CE_{50} también conocido como índice selectivo (IS). El criterio de verdadero agente antiviral basado en los valores del IS varía entre diferentes laboratorios y puede tener valores umbrales entre 10 y 100. En general se requiere disponer de una línea celular o células primarias sobre la cual se replique el virus, donde pueda mostrar los efectos citopáticos característicos o cuantificar proteínas o ácidos nucleicos virales. No obstante para los virus que no poseen un sistema biológico donde replicarse, se han desarrollado técnicas capaces de estimar la actividad antiviral. Tal es el caso de los pseudovirus de VPH que contienen genomas reporteros y permiten estimar la actividad de compuestos capaces de interferir con la adsorción y fusión de VPH a células susceptibles [26].

Técnicas fluorescentes o colorimétricas como el CyQuant, Vibrant Assay, Presto Blue, Rojo Neutro, MTT y XTT son de gran utilidad en la determinación de la CC_{50} y la CE_{50} ofreciendo grandes ventajas en velocidad, simplicidad, costo y seguridad de estos ensayos [120]. Otro método de uso tradicional en Virología es la disminución del número de placas de lisis virales, que a pesar de ser un procedimiento tedioso,

es altamente confiable y está avalado por su alta sensibilidad y reproducibilidad [120]. En el caso específico del VHS-2, el ensayo de placas es aceptado como el “*gold estándar*” para determinar la susceptibilidad a agentes antivirales.

En el caso específico del VIH, recientemente el FDA publicó una guía para el estudio preclínico de microbicidas, donde recomienda el uso de determinados ensayos en un intento de estandarizar los procedimientos y así poder comparar resultados entre los diferentes agentes microbicidas que están siendo desarrollados. Entre los ensayos y criterios a tener en cuenta se incluye:

- Determinar las curvas de dosis-respuesta en PBMC contra un amplio rango de aislamientos primarios geográficamente diferentes y con fenotipos diferentes, incluyendo al menos una cepa semilla de laboratorio bien caracterizada.
- Determinar la actividad antiviral en explantos cervicovaginales y coloretcales.
- Considerar solo aquellos agentes con $IS > 10$.
- Utilizar un rango adecuado de multiplicidades de infección.
- Comprobar la actividad antiviral contra virus asociados o no a células.
- Determinar la posible interferencia de fluidos biológicos (semen o fluido vaginal) y la transición de pH en la actividad antiviral del agente en estudio.

Selección y caracterización de cepas virales resistentes.

La resistencia a antivirales se define como una disminución en la susceptibilidad del virus a un agente antiviral y se comprueba por la determinación *in vitro* de la CE_{50} cuyo valor (en el caso específico del VIH) incrementa de 5 a 10 veces en una resistencia moderada, o más de 10 veces en una resistencia bien establecida. Este resultado puede ser confirmado a través del análisis genético del virus y del estudio bioquímico de la proteína viral alterada.

Los experimentos para seleccionar y caracterizar cepas virales resistentes son de vital importancia. Una característica de los retrovirus y en particular del VIH, con implicaciones para la patogénesis, diagnóstico, terapia y prevención, es la

variabilidad genética determinada por [121]:

- la participación de polimerasas virales y celulares en el ciclo replicativo, sin actividad correctora (RT y ARN polimerasa II celular).
- Naturaleza diploide del genoma que facilita deleciones, duplicaciones, inversiones o combinaciones de estos, mediante mecanismos de recombinación.
- La integración del ADN provírico en el ADN celular.

Estos mecanismos facilitan la existencia del virus en forma de quasiespecies virales donde la secuencia viral predominante está en constante cambio según la presión selectiva que se ejerce sobre el virus [122]. Esto facilita por ejemplo, en la monoterapia para VIH, que virus resistentes al antiretroviral se seleccionen rápidamente y se produzca un fallo en el tratamiento que se manifiesta en el incremento de la carga viral en plasma. La mejor estrategia para controlar la resistencia del virus es combinar varias drogas con diferentes mecanismos de acción, ya que se necesitarían múltiples mutaciones en un mismo genoma viral para que el virus pueda mostrar resistencia. Este tratamiento con combinación de antivirales se conoce como terapia antiretroviral altamente activa [123]. Aún así, especialmente si el tratamiento no es seguido con estricta disciplina, se han podido aislar VIH multiresistentes a varias clases de drogas (NRTI, NNRTI e inhibidores de proteasas).

Qué relación puede tener el uso de microbicidas para la prevención del VIH con el desarrollo de resistencia viral a estos productos? En un escenario ideal, estos productos serían utilizados solo por personas VIH negativas pero en realidad existe la posibilidad que una persona que conozca o desconozca su seropositividad al VIH también use estos productos. Otra pregunta, que todavía no tiene respuesta, es si el uso meramente tópico de estos productos (no sistémico como en el tratamiento de personas infectadas) es capaz de ejercer la presión necesaria para seleccionar resistencia viral. Es oportuno señalar que muchos de los compuestos con potencial de ser desarrollados como microbicidas no se absorben bien a través de las mucosas genitales o rectales lo que conlleva a la ausencia o presencia de

concentraciones muy bajas en el plasma. Aún así, como mencionaba anteriormente, habría que demostrar que la población viral en la mucosa genital o rectal de personas infectadas no es propensa a seleccionar mutantes resistentes al microbicida.

Por esta razón es bueno realizar experimentos *in vitro* que permitan seleccionar mutantes resistentes para caracterizarlos genética y fenotípicamente. Esto ayudaría a predecir una posible reducción en la susceptibilidad del virus al microbicida e indicaría mutaciones que deben ser monitoreadas en estudios clínicos. De igual forma estos experimentos permiten indagar en el mecanismo de acción de los microbicidas ya que mutaciones en proteínas virales indicarían el blanco de la actividad antiviral del compuesto.

Quizá el mejor enfoque para evitar resistencia viral con microbicidas, y teniendo como paradigma la eficacia de la terapia antiretroviral altamente activa, sea el empleo de combinaciones de microbicidas con diferentes mecanismos de acción.

Efectos en la microflora normal.

El uso de microbicidas vaginales o rectales si bien puede resultar extremadamente útil en caso de inhibir ITS tiene que garantizar seguridad para evitar efectos tóxicos. Un ejemplo de estos efectos tóxicos puede ser el desequilibrio bacteriano en las mucosas que podría conllevar a la eliminación de la flora bacteriana. Independiente de la potencia del candidato microbicida contra cualquier ITS, si afecta la viabilidad de bacterias de la microbiota como los lactobacilos, no se debe continuar su desarrollo. Es por ello que los ensayos *in vitro*, incubando lactobacilus con el candidato a microbicida, deben ser realizados en un inicio.

Una vez formulados en geles, anillos vaginales, filmes o tabletas se pueden hacer estudios *in vivo* en monos donde se estudia la microflora normal antes y después del suministro continuo del producto. Otros estudios incluyen monitoreo del pH vaginal o rectal así como la producción de citocinas que puedan predecir

algún proceso inflamatorio [124,125].

Estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos.

Estos estudios permiten indagar todo el proceso que sigue un fármaco desde que se aplica a un organismo hasta que se elimina del mismo. También nos dan información sobre los efectos bioquímicos y fisiológicos, el mecanismo de acción y la relación entre la concentración del fármaco y su eficacia. El microbicida ideal debe ser distribuido en los tejidos de las mucosas susceptibles a la infección por VIH, debe ser metabolizado (si es necesario) de forma eficiente en estos tejidos y alcanzar una concentración adecuada y sostenida. Adicionalmente, como se discutió en la sección de resistencia viral, el paso a la circulación sistémica debe ser evitado para minimizar el desarrollo de resistencia viral así como cualquier efecto tóxico.

La mayoría de los estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos realizados con microbicidas contra VIH, se han realizado utilizando monos como modelo animal o en estudios clínicos de fase 1 ó 2 [126]. Muchos de los estudios se han basado en comparar diferentes dosis del microbicida luego de una simple o múltiple aplicación, monitoreando los niveles del microbicida en fluidos vaginales o rectales, biopsias vaginales, cervicales o rectales así como en el plasma. Las muestras de tejidos rectales, colectadas luego de la aplicación del microbicida, también han sido empleadas para explorar la protección de estos tejidos *ex vivo* cuando son inoculados con VIH [127]. En general se han observado resultados alentadores en algunos de los microbicidas que se han estudiado, pero la relevancia de estos resultados aún está por ser determinada ya que estos métodos no han sido validados.

Estudios de la seguridad y eficacia en modelos animales.

Existen diferentes modelos animales para el estudio de la seguridad y eficacia de microbicidas. Aunque los modelos para el estudio de la seguridad constituyen un requisito primordial para avanzar a las fases clínicas, las agencias reguladoras todavía no consideran relevantes los modelos animales para estudiar eficacia contra el VIH. Esto se debe a la ausencia de modelos animales validados

para predecir eficacia en humanos. Sin embargo, el contar con datos de eficacia para un microbicida, especialmente cuando se realizan ensayos muy rigurosos y exigentes que requieren de un microbicida de alta potencia, puede considerarse útil a la hora de elegir entre muchos candidatos cual pudiera ser el más apto para entrar en estudios clínicos.

Modelos animales para el estudio de la seguridad.

La evaluación preclínica de la seguridad de los microbicidas se basa fundamentalmente en *ensayos in vitro* que miden citotoxicidad en cultivos celulares o explantes de tejidos cervicovaginales o colorectales. Sin embargo, estos sistemas *in vitro* carecen de procedimientos que permitan la exposición prolongada o repetida a un microbicida y carecen de tejidos de la mucosa intactos donde realmente se puede evaluar una respuesta inflamatoria.

Los modelos animales en conejos, cerdos, ratones y monos han sido utilizados para evaluar el potencial inflamatorio y de irritabilidad de formulaciones concebidas para uso vaginal [128,129,130]. El modelo de irritación vaginal en conejos es quizás el más utilizado y el único aprobado por la FDA para la evaluación de irritación vaginal. El modelo consiste en la aplicación repetida de la fórmula en la vagina de conejos y el monitoreo de la presencia de eritemas, edemas y secreciones vaginales. El estudio también incluye la obtención de cortes histológicos de tejido expuesto a la formulación para evaluar la presencia de exfoliación epitelial, infiltración de leucocitos, edemas y congestión vascular.

Otro modelo importante, es la aplicación del candidato a microbicida por vía vaginal o rectal (de forma repetida o persistente) en monos macacos rhesus (*Macaca mulatta*). Estos estudios permiten monitorear el pH vaginal o rectal, los componentes y constituyentes microbiológicos en lavados vaginales o rectales para obtener medidas indicadoras de la salud general de la mucosa vaginal o rectal [124,125].

Recientemente se ha descrito el modelo de incremento de la susceptibilidad a la infección por VHS-2 en ratones, que se utiliza como biomarcador para predecir

el incremento del riesgo a la infección por VIH [131]. Este modelo consiste en la aplicación sucesiva en ratones, de varias dosis del microbicida por vía vaginal, antes de infectar con una dosis sub-óptima del VHS-2. La dosis de virus empleada permite detectar un incremento en la infección del VHS-2 en caso de que ocurran daños que perjudiquen la integridad de la mucosa vaginal.

Modelos animales para el estudio de la eficacia contra VIH o VHS-2.

Existen modelos en primates no humanos donde virus quiméricos preparados a partir del virus de la inmunodeficiencia de los simios, que portan información genética del VIH, se utilizan para infectar monos macacos rhesus [132]. Por ejemplo cuando se estudia el efecto de un compuesto que tiene como mecanismo de acción bloquear la transcripción inversa, se utiliza un virus quimérico que porta la enzima RT del VIH y se les denomina SHIV-RT.

Estos modelos en monos macacos rhesus se pueden realizar con una sola dosis alta de SHIV o dosis repetidas bajas que intentan asemejar el escenario real de exposición en humanos al VIH. Ambos modelos tienen sus ventajas y desventajas. El modelo de dosis única alta se realiza en monos pre-tratados con progesterona lo que conduce a una reducción del grosor del epitelio vaginal, facilitando la transmisión del virus. Este tratamiento puede representar, junto a la dosis alta del virus, un escenario demasiado riguroso y exigente para un candidato a microbicida. Sin embargo, si el candidato bloquea la transmisión en estas condiciones, se le puede considerar como un microbicida con actividad robusta contra el VIH [133].

El modelo de dosis repetidas bajas consiste en exponer los monos macacos rhesus al SHIV semanalmente. Facilita la evaluación de la eficacia del candidato a microbicida en condiciones controladas, pero tiene como desventaja la complejidad en la logística. Un experimento puede tardar cerca de un año [134,135,136]. Ambos modelos tienen como desventaja el no poder utilizar virus asociado a células.

Un reciente modelo, con resultados prometedores, es la quimera

ratón/humana a través del injerto de células del sistema inmune humano en ratones con inmunodeficiencia (modelo de ratón BLT) [137]. En este modelo se utilizan células humanas fetales de médula ósea, del hígado y del timo. A través de este modelo se ha estudiado la eficacia de candidatos microbicidas empleando como inóculo viral, virus asociado o no a células [138]. La principal desventaja de este modelo es la disponibilidad de tejidos humanos así como el costo del procedimiento.

El modelo de ratón (*Mus musculus*) para estudiar la eficacia de compuestos con actividad antiviral contra VHS-2 tiene un largo historial y es el más utilizado. Existen diferentes modelos en ratón dependiendo de la vía que se utilice para la infección ya sea vaginal, rectal, intranasal o por escarificación lumbosacral [11,83,139,140,141]. Tiene la ventaja de bajo costo y el uso de una línea consanguínea de ratón pero el modelo carece de reactivación espontánea y excreción del virus en las mucosas. Otros modelos animales como cobayos (*Cavia porcellus*) o rata del algodón (del inglés cotton rat; *Sigmodon hispidus*) sí reproducen la reactivación espontánea y excreción del virus que se ve en humanos [142,143]. También existen modelos en primates no humanos como es el caso del mono lechuza (*Aotus trivirgatus*) con una susceptibilidad y mortalidad alta luego de la infección con el VHS-2 y más recientemente un modelo en monos macacos rhesus que resulta en lesiones genitales en un 10% de los animales [144,145].

HIPÓTESIS

La selección de un NNRTI potente con un perfil de resistencia adecuado, en combinación con AZ y formulado en un gel de CG, resulta en un gel microbicida seguro y potente con un amplio espectro antiviral contra ITS.

OBJETIVO GENERAL

Seleccionar NNRTIs y combinar el más efectivo con AZ, buscando el mejor perfil *in vitro* de actividad antiviral contra diferentes cepas de VIH-1 y el VHS-2 cepa G, para ser empleados como microbicidas.

Enfocaremos nuestros esfuerzos en la selección de una combinación que presente la mayor eficacia a dosis bajas, lo que podría traducirse en una menor toxicidad y costo, así como reducir el desarrollo de resistencia viral.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la actividad antiviral y citotoxicidad de diferentes NNRTI y AZ empleando cepas virales de laboratorio.
2. Obtener el perfil de resistencia de NNRTI y AZ, empleando cepas virales primarias con multiresistencia a drogas.
3. Estudiar el desarrollo de resistencia viral *in vitro*.
4. Ensayar la combinación de NNRTI con AZ y determinar el efecto sinérgico, aditivo o antagónico.
5. Investigar efectos tóxicos y eficacia del NNRTI combinado con AZ y formulados en un gel de CG, mediante el uso de diferentes métodos *in vitro* e *in vivo* para acceder seguridad y eficacia contra el VHS-2.

MATERIALES Y MÉTODOS

Virus.

La tabla 3 resume las diferentes cepas virales de laboratorio, aislamientos primarios o clones con MDR. Las cepas de laboratorio incluyen VIH-1_{MN}, VIH-1_{BaL}, VIH-1_{ADAM}, VIH-1_{NL4-3} provenientes del NCI Frederick, MA, USA, así como el VIH-1_{MG505.WOM.ENV.CZ}, que contiene la gp120 de un aislamiento temprano responsable del establecimiento de la infección por VIH. Este virus fue suministrado por la Dra. E. Martinelli (Population Council, New York, NY, USA). Los aislamientos primarios fueron suministrados por el NIH Reagent Program (Frederick, MA, USA) y los clones virales se basan en un panel de virus con resistencia a antiretrovirales, creado por el Dr. R.W. Shafer (Universidad de Standford, Standford, CA, USA). También se emplearon otras cepas que han sido gentilmente suministradas por el Dr. M. Markowitz (ADARC, New York, NY, USA). Para los ensayos con el VHS-2 se utilizó la cepa G (ATCC, Manassas, VA, USA).

Tabla 3. Cepas, aislamientos o clones utilizados en los experimentos con VIH.

VIH-1 Cepa/clon/ aislamiento	Subtipo	Co-receptor	Mutaciones en RT	
			NRTI	NNRTI
BaL	B	CCR5	-	-
ADA-M	B	CCR5	-	-
MN	B	CXCR4	-	-
MG505.WOM . ENV.CZ	B	CCR5	-	-
NL4-3	B	X4	-	-
92UG029	A	X4	-	-
91US056	B	R5	-	-
92BR014	B	R5/X4	-	-
92HT593	B	R5/X4	-	-
97ZA009	C	R5	-	-
97USNG30	C	R5	-	-
96USNG31	C	R5/X4/R3	-	-
92BR025	C	R5	-	-
93MW965	C	R5	-	-
CMU06	E	R5/X4	-	-
92TH020	E	R5	-	-
93TH051	E	R5/X4	-	-
35764-2	B	ND	75I, 77L, 116Y, 151M	-
7295-1	B	ND	67N, 70R, 215F, 219Q, 184V, 69N, 218E	-
29129-2	B	ND	41L, 67G, 210W, 215Y, 184V	103N
56252-1	B	ND	70R, 77L, 116Y, 151M, 65R, 75I, 115F, 39A, 44D	103N
4755-5	B	ND	41L, 67G, 210W, 215Y, 184V, 69D, 39A, 43A, 44D, 118I	-
1617-1	B	ND	70G, 184V, 69K, 62V, 77L, 116Y, 115M, 75I, 115F	-
7324-4	B	ND	67N, 70R, 215F, 219E, 39A, 203D	-
7136-1	B	ND	65R	-
8415-2	B	ND	184V, 65R	-
7324-1	B	ND	41L, 67N, 70R, 215F, 219E, 69N, 39A, 203D	-
J18-1 (2)	B	ND	41L, 44D, 69D, 118I, 210W, 215D	108I
V17763-5	B	ND	41L, 215Y	101P, 103N
W1023892-2	B	ND	67N, 69N, 215S, 219Q	101E, 138K, 181C
OL-1/4(II)d4	B	ND	41L, 67D/N, 118I, 184V/I, 210 L/G/M/R/V, 215C/Y, 219E	101E, 181I

ND=No determinado.

Compuestos evaluados.

Los compuestos incluyen diferentes NNRTIs, que fueron provistos generosamente por el Centro de Investigación Farmacéutica Medivir (Huddinge, Suecia), o por el NIH Reagent Program. También se emplearon AZ y CG (60% lambda y 40% kappa), todos disponibles comercialmente (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Una vez identificadas la combinación o combinaciones idóneas, los compuestos formulados en geles fueron suministrados por el departamento de química del Centro para Estudios Biológicos de Population Council (Anexo 1). La única excepción fue el gel Gynol II, suministrado por www.drugstore.com. Las tablas 4 y 5 resumen los compuestos y formulaciones en forma de gel utilizadas en nuestros experimentos.

Tabla 4. Agentes antivirales utilizados en los experimentos con VIH-1 o VHS-2.

Compuestos	Clase	Virus	Mecanismo de acción
MIV-150*	NNRTI	VIH-1	Inhibidor no competitivo de RT
MIV-160*	NNRTI	VIH-1	Inhibidor no competitivo de RT
MIV-170*	NNRTI	VIH-1	Inhibidor no competitivo de RT
EFV*	NNRTI	VIH-1	Inhibidor no competitivo de RT
NVP*	NNRTI	VIH-1	Inhibidor no competitivo de RT
ETR*	NNRTI	VIH-1	Inhibidor no competitivo de RT
AZ	N/A	VIH-1	No está del todo dilucidado aunque publicaciones recientes y estudios presentados en esta tesis sugieren RT como el blanco para su efecto antiviral.
	N/A	VHS-2	Se une a las glicoproteínas de la envoltura del virión y bloquea los pasos tempranos de unión y entrada a la célula hospedadora.
CG	N/A	VHS-2	Bloquea los pasos tempranos de unión y entrada a la célula hospedadora.

* más información en el anexo 2

Tabla 5. Formulaciones utilizadas en los experimentos con VIH-1 o VHS-2.

Gel	% de componentes activos	Número de lotes
CG	3% CG	110919A525ML; 080424A515SR
AZ/CG (5 geles)	1% AZ/3% CG; 0,5% AZ/3% CG; 0,3% AZ/3% CG; 0,1% AZ/3% CG 0,03% AZ/3% CG	0902224B725ML; 090224A726ML; 080623A710ML; 080630A710ML; 080701A710ML
MIV-150/AZ/CG	0,002% MIV-150/0,3% AZ/3,1% CG	110523A1005ML
Gynol II	4% Nonoxynol 9	DCEM 03/13

Determinación de las constantes K_D y K_A de los NNRTIs.

Los valores de K_D y K_A fueron estimados utilizando la técnica de SPR en un Biacore 3000 (Biacore AB, Uppsala, Suecia). Las enzimas RT WT (NIH Reagent Program) o con las mutaciones K103N o K103N+Y181C (Medivir) fueron inmovilizadas por acoplamiento de amina en la superficie de sensores CM5 (Biacore AB) siguiendo el procedimiento descrito en el kit de acoplamiento de aminas (Biacore AB). Para la inmovilización, 5 μ l de cada enzima fueron inyectados a una concentración de 0.5 mg/ml, seguido por 35 μ l de solución de bloqueo (0.5 M Tris, pH 7.6, 4 mM $MgCl_2$ y 0.5 M KCl). La inmovilización y estudios de interacción se realizaron a 25°C utilizando como tampón de corrida HBS-EP (Biacore AB) con 3% DMSO (v/v). Los NNRTIs fueron diluidos en el tampón de corrida e inyectados utilizando el modo kinject durante 60 segundos y un flujo de 50 μ l/minuto. Luego de 5 minutos de disociación, la superficie del sensor fue lavada por 60 segundos (50 μ l/minute) con HBS-EP con 20% DMSO (v/v) para las enzimas mutantes o 0.5 M LiCl en 50% (v/v) de etilenglicol para la RT WT. Seis concentraciones diferentes (duplicadas) fueron utilizadas para cada NNRTI (0,2-50 μ M para NVP y 0,02-6 μ M para el resto de los NNRTI). El análisis se realizó empleando el software Biaevaluation versión 4.1.1 (Biacore). Se realizaron 2-3 experimentos independientes.

Ensayo de citotoxicidad.

Se utilizó un ensayo colorimétrico empleando la sal de tetrazolio XTT (Life Technologies, Grand Island, NY) como se ha descrito anteriormente [146]. Este compuesto es transformado en un producto soluble (sal de formazan) en células metabólicamente activas. Se utilizaron células provenientes de la línea celular TZM-bl (NIH Reagent Program) las cuales fueron sembradas en microplacas de 96 pocillos con fondo plano e incubadas a 37°C, 5% CO_2 y 98% de humedad. El medio de cultivo celular consiste de DMEM conteniendo antibióticos y 10% de SFB (Life Technologies). Después de 24 horas de incubación diferentes concentraciones de los compuestos fueron añadidos en réplicas de tres y las microplacas se incubaron por 72 horas en las condiciones descritas anteriormente. Al cabo de este tiempo se añadió una solución de XTT con metasulfato de fenazina (Sigma Aldrich) y las

microplacas fueron incubadas por 4 horas bajo las mismas condiciones. Posteriormente se determinó la densidad óptica a 450nm en un lector de microplacas (Molecular Devices Emax precision, Sunnyvale, CA, USA). Los resultados fueron analizados utilizando el programa Softmax Pro v 5.2 (Molecular Devices) para posteriormente obtener la concentración que afecta la viabilidad de las células en un 50% (CC₅₀).

Ensayo antiviral contra VIH en células TZM-bl.

El ensayo MAGI fue empleado para determinar la actividad antiviral de los diferentes compuestos o geles. El ensayo utiliza la línea celular TZM-bl transformada de manera estable con plásmidos que contienen los genes que expresan el receptor celular para VIH (molécula CD4), el co-receptor CCR5 y un gen reportero asociado a la secuencia terminal del VIH-1 (VIH-1-LTR-β-Gal). Las células que son infectadas por el virus comienzan a producir la enzima β-galactosidasa y en presencia del sustrato X-gal generan un producto insoluble de color azul que se localiza en el núcleo y puede ser visible al microscopio. Las células fueron sembradas en microplacas opacas de 96 pocillos con fondo plano (10⁴ células por pocillo) e incubadas a 37°C, 5% CO₂ y 98% de humedad. Después de 24 horas de incubación diferentes concentraciones de los compuestos o diluciones de los geles y 100-200 partículas infecciosas (m.o.i ~ 0,001) de los virus VIH-1_{BaL}, VIH-1_{ADA-M}, VIH-1_{MG505.WOM.ENV.CZ} o VIH-1_{MN} se añadieron en réplicas de tres. El medio de cultivo celular consistió de DMEM conteniendo antibióticos y 10% de SFB. Las microplacas se incubaron por 72 horas en las condiciones descritas anteriormente y fueron procesadas utilizando el ensayo MAGI [146] para obtener el número de células infectadas en el lector de microplacas ELISPOT (AID, San Diego, CA, USA). El ensayo culmina con el cálculo de la concentración de compuestos necesaria para disminuir en un 50% el número de células MAGI azules con relación a los controles no tratados (CE₅₀). Con este valor y el CC₅₀ se obtuvo el índice de selectividad (IS) que representa el cociente CC₅₀/CE₅₀. Sólo compuestos con un IS mayor de 100 fueron empleados en los subsiguientes experimentos.

Efecto antiviral “memoria” de los NNRTI en células TZM-bl: El experimento se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Motakis y cols [109]. Las células TZM-bl fueron incubadas por 2 horas con cada NNRTI por separado a la concentración final de 0,1 ó 10 μ M (3 réplicas por tratamiento). Las células fueron resuspendidas en medio DMEM sin rojo fenol (Life Technologies) y centrifugadas a 300 g, 10 minutos y 25°C. Este proceso de lavado se repitió un total de tres veces para eliminar los NNRTIs que no están asociados a las células. Las células fueron infectadas inmediatamente con el VIH-1_{ADA-M} (m.o.i. ~ 0,001) o cultivadas para ser infectadas 1, 4 ó 5 días luego de ser expuestos a los NNRTI. Los valores de CE₅₀ fueron obtenidos empleando el ensayo MAGI, como se describe en la sección anterior. Se realizaron tres experimentos de forma independiente.

Actividad antiviral de los NNRTI durante la transición de pH: El ensayo MAGI en células TZM-bl, descrito anteriormente, fue empleado para evaluar la actividad antiviral de los NNRTIs durante la transición de pH [147]. Los NNRTIs fueron diluidos a diferentes concentraciones en medio DMEM (pH=3,0 o pH=7,0) y añadidos a células TZM-bl por 5 minutos (3 réplicas por cada concentración evaluada). Luego de la breve incubación, se añadieron 100-200 partículas infecciosas (m.o.i ~ 0,001) del virus VIH-1_{ADA-M} preparado en medio DMEM (pH=8,0) para neutralizar el pH ácido. Las microplacas se incubaron por 72 horas y fueron procesadas como se describió anteriormente para obtener los valores de CE₅₀. Se realizaron dos experimentos de forma independiente.

Efecto de los NNRTI sobre la viabilidad de lactobacilli.

Se empleó el procedimiento descrito por Lackman-Smith y cols [147]. *Lactobacillus jensenii* y *Lactobacillus crispatus* fueron suministrados por ATCC. Los NNRTIs y el control positivo para inhibición de lactobacilli (penicilina/estreptomicina) fueron diluidos en medio *Lactobacillus* MRS (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) e incubados con *L. jensenii* o *L. crispatus* (10^8 bacterias/ml) en placas de 96 pozos con fondo en U (tres réplicas por concentración de NNRTI o penicilina/estreptomicina). Las muestras fueron incubadas por 24 horas a 37°C, 5% CO₂ y 98% de humedad. El crecimiento bacteriano fue determinado en un lector

espectrofotométrico (Molecular Devices Emax) a una densidad óptica de 490 nm. Los resultados fueron analizados utilizando el programa Softmax Pro v 5.2 para posteriormente obtener la concentración que afecta la viabilidad de lactobacilli en un 99% (CMI₉₉). Se realizaron dos experimentos de forma independiente.

Actividad antiviral de los compuestos contra cepas primarias del VIH y cepas o clones multiresistentes a antiretrovirales.

Cepas virales, aislamientos primarios que representan diferentes subtipos de VIH y clones con multiresistencia a antiretrovirales (tabla 1), fueron empleados para estudiar el perfil de resistencias y la capacidad de inhibir diferentes subtipos virales, mediante el ensayo antiviral en PBMC.

Estimulación de PBMC: Se utilizaron PBMC provenientes de donantes humanos seronegativos y saludables (New York Blood Center, Long Island, NY, USA). PBMC fueron activados por el método 3x3 y la fracción de células CD8+ fue eliminada [148]. La eliminación de células CD8+ fue verificada en un citómetro de flujo (FACScalibur) empleando anticuerpos contra las moléculas CD4 y CD8 conjugados con FITC. El método 3x3 consiste en el procesamiento de células provenientes de tres donantes y activadas por 3 vías diferentes: incubación por 72 horas en presencia de baja concentración de fitohemaglutinina, alta concentración de fitohemaglutinina y a través del anticuerpo OKT3 (anti-CD3). Las células activadas por estas tres vías son combinadas para incrementar la consistencia de la infección por VIH.

Ensayo de citotoxicidad: Microplacas de 96 pocillos fueron utilizadas para combinar diferentes concentraciones de los compuestos con PBMC activados (2×10^5 células por pocillo) y se incubaron por 7 días a 37°C, 5% CO₂ y 98% de humedad. El medio de cultivo a utilizar consiste de RPMI-1640 (Life Technologies) conteniendo antibióticos (penicilina/estrptomina, Life Technologies), 10% de SFB (Life technologies) y 20 U/ml de rIL-2 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Los valores de CC₅₀ fueron estimados mediante el empleo del ensayo colorimétrico XTT, como fue descrito anteriormente. También se empleó el ensayo de

proliferación celular CyQuant que se basa en la medida del contenido de ADN celular a través de la unión de una molécula fluorescente al ADN. Para el ensayo CyQuant en lugar de la solución de XTT con metasulfato de fenazina se añadió a las células el reactivo CyQuant NF (Life Technologies) seguido de una incubación por 30 minutos que culminó con la medida de fluorescencia (Excitación a 485 nm y emisión a 530 nm) en el lector de microplacas (Molecular Devices GEMINI EM). Los resultados fueron analizados utilizando el programa Softmax Pro v 5.2 (Molecular Devices) para posteriormente obtener la concentración que afecta la viabilidad de las células en un 50% (CC₅₀).

Ensayo para medir actividad antiviral contra VIH in vitro: El estudio empleó cepas primarias del VIH al igual que cepas o clones multiresistentes a antiretrovirales. Estos virus fueron titulados utilizando el método de Reed y Muench [149] en PBMC activados. Para el ensayo antiviral, se añadieron diferentes concentraciones de los compuestos en microplacas y se incubaron por 1 hora con PBMC activados (2x10⁵ células por pocillo). Después de esta breve incubación, se añadieron 100 TCID₅₀ de virus. El medio de cultivo utilizado fue RPMI-1640 conteniendo antibióticos, 10% de SFB y 20 U/ml de rhIL-2. Las microplacas fueron incubadas por 18 horas a 37°C, 5% CO₂ y 98% de humedad para luego retirar el sobrenadante y reemplazarlo con medio de cultivo. La microplacas fueron incubadas nuevamente en las condiciones antes descritas y al cuarto día se repitió el proceso de cambio de medio. Los sobrenadantes de cada pocillo fueron colectados al séptimo día y congelados a -20°C para luego cuantificar la proteína viral p24 utilizando el método de ELISA HIV-1 p24 (Zeptometrix, Buffalo, NY, USA). Se estimaron los valores de CE₅₀ a través de la determinación en el sobrenadante del % del Ag viral p24 en relación a los controles no tratados con los compuestos. Este experimento nos permitió comparar los perfiles de resistencia de cada compuesto así como la capacidad de inhibir la replicación de diferentes subtipos virales.

Ensayo para medir actividad antiviral o virucida de AZ contra VIH en PBMC: Estudios realizados por Teleshova y cols (comunicación personal) han demostrado en el sistema de explantes de tejido, que la adición de AZ de forma repetida durante el cultivo del virus produce un efecto antiviral más pronunciado. Tomando

esto en consideración, la actividad antiviral de AZ contra el virus VIH-1_{NL4-3} fue determinada como se describe en la sección anterior utilizando concentraciones no tóxicas. Adicionalmente se realizó otro experimento donde AZ fue añadido nuevamente luego de las 18 horas y 4 días de incubación, utilizando la mismas concentraciones iniciales de AZ. También se evaluó la actividad virucida, pre-incubando el VIH-1_{NL4-3} (1000 TCID₅₀) con diferentes concentraciones no tóxicas de AZ por 6 horas antes de añadir el virus a las células. El sobrenadante fue retirado luego de 18 horas y reemplazado por medio fresco, al cuarto día de incubación se volvió a reemplazar el medio de cultivo. Los sobrenadantes de cada pocillo fueron luego colectados al séptimo día y congelados a -20°C para luego cuantificar la proteína viral p24 utilizando el método de ELISA HIV-1 p24 (Zeptomatrix). Se estimaron los valores de CE₅₀ a través de la determinación en el sobrenadante del % del Ag viral p24 con relación a los controles no tratados con los compuestos. Este experimento nos permitió seleccionar el mejor procedimiento para obtener la mejor curva de dosis-respuesta del AZ contra VIH y estudiar bajo estas condiciones, la actividad antiviral contra otras cepas, aislamientos primarios y clones del VIH. Es importante señalar que los mismos procedimientos se hicieron en ausencia del virus para estimar la citotoxicidad de AZ y poder descartar cualquier efecto tóxico.

Ensayo para medir actividad virucida contra VHS-2 *in vitro*.

La actividad virucida fue determinada utilizando el método descrito por Arens y cols [7], con algunas modificaciones. El ensayo consiste en combinar 10⁴ ufp de VHS-2 G con diferentes concentraciones de cada compuesto en tampón de acetato de sodio 10 mM (Sigma Aldrich, pH 6,2; 300 mosmol/kg) en un volumen de 200 µl. Un control viral conteniendo solo virus en el buffer de acetato de sodio fue incluido en los experimentos. Cada concentración de compuestos o control constó de tres réplicas. Las muestras fueron incubadas por 6 horas a 37°C, 5% CO₂ y 98% de humedad. Luego de la incubación, se realizó una dilución decimal de cada muestra para determinar el número de partículas virales infecciosas utilizando el ensayo de placas descrito por Ashley [120]. El porcentaje de inhibición de la replicación viral (con respecto al control de virus) para cada concentración fue calculado y graficado

para obtener las curvas de dosis-respuesta.

Inducción de resistencia del VIH *in vitro*.

Se utilizó el procedimiento de subcultivo viral en presencia de concentraciones subóptimas de cada compuesto [150]. Las células MT-4 (ATCC) o PBMC fueron infectadas con VIH-1_{MN} o VIH-1_{92BR014} cultivadas en presencia o no (control viral) de cada compuesto (NNRTI, AZ o la combinación de NNRTI y AZ) a una concentración que inhibe alrededor del 80% la replicación viral. También se seleccionaron virus resistentes en presencia de combinaciones de NNRTIs y AZ. Los subcultivos se realizaron cada 3 ó 4 días y la misma concentración inicial del compuesto fue añadida, a menos que ocurriera un incremento en la replicación viral. La replicación viral se midió tomando una muestra del sobrenadante e infectando TZM-bl cells o detectando la concentración de p24 a través del ELISA. En las muestras donde el incremento de la replicación viral ocurrió, se duplicó la concentración del compuesto con respecto al subcultivo anterior. Los subcultivos continuaron hasta el aislamiento de virus resistentes con valores de CE₅₀ hasta 100 veces mayor que los valores iniciales.

Clonaje y secuenciación de la RT en los mutantes seleccionados: Se utilizó el procedimiento descrito por Kenney y cols [151]. El ARN viral fue extraído de los sobrenadantes celulares que contienen los mutantes seleccionados. La extracción se realizó utilizando el kit de Qiagen para el aislamiento de ARN viral (Qiagen, Valencia, CA, USA) según las instrucciones del fabricante. El ARN viral fue transcrito de forma inversa a ADNc utilizando el kit Superscript III Reverse Transcriptase (Life Technologies). La secuencia de RT fue amplificada utilizando PCR con la polimerasa Pfu Ultra II Hotsart (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), el cebador directo (5- TACTAAAGAATACAAAAATGTAGA-3) y el cebador inverso (5-CTCTGTGGATTGTATGGTACCCC-3). Las reacciones de amplificación se realizaron en un MyCycler Thermal Cycler (Bio-Rad, Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) con activación inicial de la polimerasa a 94°C por 5 minutos seguido de 30 ciclos de amplificación (94°C 1 minuto, 44°C 1 minuto, 72°C 2 minutos y extensión final a 72°C por 5 minutos). El product del PCR fue ligado utilizando el kit

de clonaje TOPO TA (Life Technologies) y el ADN de 15-20 colonias fue preparado para secuenciar la región que codifica la RT viral (Genewiz, Inc., South Plainfield, NJ). El software DNASTar Lasergene 8 (DNASTAR, Inc., Madison, WI, USA) fue utilizado para analizar las secuencias.

Estudio de la combinación de compuestos.

Se empleó el método descrito por Chou [152]. La proporción de las combinaciones de compuestos fue equipotencial y estuvo determinada por los valores de CE_{50} de cada compuesto. Se estudió la combinación de NNRTI y AZ y se analizó el posible efecto sinérgico, aditivo o antagónico en la actividad antiviral contra VIH en PBMC. De igual forma se evaluó la combinación de AZ y CG y se analizó el posible efecto sinérgico, aditivo o antagónico en la actividad virucida contra VHS-2 en células Vero. Se estudiaron los parámetros que determinan la relación dosis-efecto para cada compuesto y cada una de las combinaciones. La relación dosis efecto fue determinada por la estimación del índice de combinación (IC) utilizando el programa Calcosyn (Calcosyn, Biosoft, Cambridge, UK). El valor de IC es una medida cuantitativa del grado de interacción entre los compuestos en términos de efecto aditivo ($IC=1$), efecto sinérgico ($IC<1$) o efecto antagónico ($IC>1$). La citotoxicidad y actividad antiviral en PBMC para VIH o células Vero para VHS-2, fueron estimados utilizando los ensayos descritos anteriormente.

Análisis de los resultados.

Los resultados obtenidos fueron transferidos de los programas Softmax Pro v 5.2 (ensayos de citotoxicidad y ensayo antiviral utilizando ELISA p24) y ELISPOT 4.0 (ensayo MAGI) al programa GraphPad Prism 5.0b para estimar los valores de CC_{50} y CE_{50} con un 95% de confianza. La prueba U de Mann Whitney ($P<0.05$) fue utilizada para comparar el efecto antiviral “memoria” entre los NNRTIs. Los resultados del ensayo de placas del VHS-2 fueron analizados en el programa GraphPad Prism 5.0b para estimar los valores de CE_{50} con un 95% de confianza.

ESTUDIOS CON NNRTI Y AZ FORMULADOS EN GEL DE CG (NNRTI/AZ/CG gel).

Resistencia eléctrica transepitelial.

El ensayo se realizó de la forma descrita en publicaciones previas [11] con la diferencia que el medio de cultivo empleado en ambas cámaras fue reemplazado con DMEM sin rojo fenol (Invitrogen) y suplementado con MITO + Serum Extender como recomienda el proveedor (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Brevemente, el ensayo consiste en monitorear la TEER luego de aplicar los geles diluidos sobre monocapas diferenciadas de células Caco-2. La integridad de la monocapa celular es comprometida si los valores de TEER decrecen por debajo de $300 \Omega\text{cm}^2$ (valor que determina la integridad de monocapas diferenciadas según el proveedor). El gel fue diluido 1:10 en el medio descrito anteriormente y aplicado en la cámara superior (3 réplicas por muestra) para iniciar la lectura de TEER a tiempo 0, 2, 4, y 6 horas después de la aplicación y así determinar si la muestra puede tener algún efecto tóxico que reduzca los valores de TEER. Se empleó el voltómetro epitelial EVOM de World Precision Instruments (Sarasota, FL, USA) para medir los valores de TEER.

Efecto del gel (NNRTI/AZ/CG) sobre la viabilidad de lactobacilli.

Se utilizó el procedimiento descrito por Moncla y cols [153]. El gel y el control positivo para inhibición de lactobacilli, penicilina/estreptomina, fueron diluidos en solución salina (15mM NaCl, pH 7,0, 277 mOsmol/kg) con 7,5% de SFB e incubados con *L. jensenii* o *L. crispatus* a una densidad de 2×10^8 bacterias/ml. Las muestras fueron incubadas por 30 minutos a 37°C, 5% CO₂ y 98% de humedad y luego diluidas en medio *Lactobacillus* MRS para diseminar 100 µl en placas de agar LBS (Thermo Scientific). Se emplearon tres réplicas por muestra. Las placas fueron incubadas por 48-72 horas y las colonias fueron contadas en el Colony Doc-it Imaging station (UVP, Upland, CA, US). Las muestras con una reducción en viabilidad mayor de 1 log₁₀ fueron consideradas sensibles al efecto antibacteriano [119,153].

Estudios en animales.

Todos los procedimientos de cuidado animal estuvieron de acuerdo con las regulaciones detalladas en el Animal Welfare Act y la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio [154,155]. Los animales fueron monitoreados diariamente por técnicos veterinarios para asegurar el bienestar de los animales. Todos los protocolos fueron revisados y aprobados por el Comité para el uso y cuidado de los animales de la Universidad de Rockefeller.

Evaluación histológica de la mucosa cervico-vaginal y rectal luego de dosis única.

Ratones hembras de la cepa Balb-c (8 semanas de edad, Charles River laboratory International, Wilmington ,MA, USA), tratados con Depo-Provera (17-acetato de medroxiprogesterona, Henry Schein, Melville, NY, USA) o anestesiados con solución de Ketamina/xylazina (Henry Schein) recibieron gel de forma vaginal o rectal respectivamente. El tratamiento con Depo-Provera se realiza para sincronizar el ciclo menstrual en ratones e incrementar la susceptibilidad al VHS-2. Aunque la evaluación histológica no incluye la infección con VHS-2, el experimento se realiza bajo las mismas condiciones en que se realiza la infección viral para poder extrapolar los resultados. Tres ratones por grupo, recibieron gel de NNRTI/AZ/CG, gel de CG, D-PBS como control positivo o Gynol II como control negativo para ausencia de daño. Los ratones fueron sacrificados 1, 6 ó 24 horas luego de la aplicación del gel. Los tejidos vaginales o rectales fueron colectados, fijados en 10% formalina y embebidos en parafina para luego obtener secciones de tejido de 4-6 μm de espesor. El análisis morfológico fue realizado mediante microscopía convencional sobre los cortes procesados para la tinción con H&E [11,156]. Las microfotografías fueron obtenidas con un microscopio Zeiss Axioplan 2 (Carl Zeiss Microscopy, Thornwood, NY, USA) y una cámara digital Spot Insight QE (Spot Imaging Solutions, Sterling Heights, MI) mediante el software Spotbasic (Spot Imaging Solutions).

Ensayo de eficacia contra VHS-2 G utilizando el modelo vaginal.

El procedimiento se realizó empleando ratones hembras de la cepa BALB/c de 8 semanas de edad como se ha descrito previamente [11,156]. Los ratones fueron tratados con Depo-Provera y luego de una semana, 10 µl del gel de NNRTI/AZ/CG, gel de CG o placebo (D-PBS) fueron administrados de forma intravaginal. La inoculación del VHS-2 G se realizó 10 minutos después de la aplicación de los geles o placebo utilizando un inóculo que contiene 10^6 ufp/ratón (1000 DL₅₀). Los animales fueron examinados durante 21 días luego de la inoculación para detectar cualquier síntoma de infección, tales como parálisis, enrojecimiento, pérdida del pelaje, inflamación y/o lesiones en el área vaginal. Todo animal con síntomas de infección fue registrado y eutanizado. Un total de veinte animales fueron utilizados para cada tratamiento.

Ensayo de eficacia contra VHS-2 G utilizando el modelo rectal.

El procedimiento se realizó empleando ratones BALB/c de 8 semanas de edad como se ha descrito previamente [11,156]. Los ratones fueron anestesiados con Ketamina/xylazina y recibieron 20 µl del gel de NNRTI/AZ/CG, gel de CG o placebo (D-PBS) de forma intrarectal. La inoculación del VHS-2 G se realizó 10 minutos después de la aplicación de los geles o placebo utilizando un inóculo que contiene 10^6 ufp/ratón (1000 DL₅₀). Al igual que el experimento anterior, los animales fueron examinados durante 21 días luego de la inoculación para detectar cualquier síntoma de infección (parálisis, enrojecimiento, pérdida del pelaje, inflamación y/o lesiones en el área rectal). Todo animal con síntomas de infección fue registrado y eutanizado. Un total de veinte animales fueron utilizados para cada tratamiento.

Modelo para detectar incremento de susceptibilidad al VHS-2.

Se realizó el procedimiento descrito por Wilson y cols. [131] para verificar que el gel no causa algún daño que pueda incrementar la susceptibilidad al VHS-2. El procedimiento se llevó a cabo empleando ratones hembras BALB/c de 8

semanas de edad, que fueron tratadas con Depo-Provera y luego de una semana, 10 µl del gel de NNRTI/AZ/CG, gel de CG o placebo (D-PBS) fueron administrados de forma intravaginal a diario por siete días consecutivos. Doce horas después de la última dosis, los ratones fueron inoculados de forma intravaginal con una dosis viral sub-óptima que infecta aproximadamente el 50% de los animales. Durante 21 días post-inoculación viral, los animal fueron examinados para detectar cualquier síntoma de infección.

Análisis estadístico.

El Test Exacto de Fisher fue empleado para la comparación estadística en todos los modelos de infección con el VHS-2 en ratones. Para detectar diferencias estadísticas ($P < 0.05$) se utilizó el programa GraphPad Prism versión 5.02 para Windows, GraphPad Software, San Diego, CA.

RESULTADOS

Afinidad de los distintos NNRTI por la enzima RT del tipo salvaje y mutantes.

Iniciamos nuestros experimentos con el estudio de la afinidad de los diferentes NNRTI, MIV-150, MIV-160 y MIV-170 por la enzima viral RT, blanco de estos compuestos. Las constantes de afinidad K_A (asociación) y K_D (disociación) fueron estimadas utilizando la técnica de SPR en un Biacore 3000. El Biacore utiliza un biosensor basado en la resonancia del plasmón de superficie y monitorea de forma precisa la interacción entre un ligando (en nuestro caso RT inmovilizado en un sensor) y el analito en disolución (NNRTI). En este estudio se emplearon RT recombinantes del tipo salvaje así como RT que presentan mutaciones muy comunes, tales como K103N o la combinación de K103N con Y181C.

La tabla 6 muestra los resultados de los compuestos MIV-150, MIV-160 y MIV-170, los cuales presentan valores de afinidad muy superiores cuando se los compara con NVP, uno de los primeros análogos no-nucleosídicos empleados en el tratamiento de pacientes con VIH con una pobre afinidad por RT que contienen las mutaciones K103N o K103N+Y181C. También cabe destacar que la afinidad de los nuevos compuestos que estamos evaluando fue similar a ETR, un NNRTI recientemente aprobado para el tratamiento del VIH y con un perfil de resistencia muy superior a la primera o segunda generación de NNRTI.

Tabla 6. Constantes de equilibrio de la interacción de NNRTI con RT tipo salvaje (WT) y mutantes utilizando la técnica de SPR.

NNRTI	WT RT		K103N RT		K103N+Y181C RT	
	K_A (1/M)	K_D (M)	K_A (1/M)	K_D (M)	K_A (1/M)	K_D (M)
MIV-150	$4,6 \times 10^7$	$2,2 \times 10^{-8}$	$6,9 \times 10^6$	$1,5 \times 10^{-7}$	$1,7 \times 10^6$	$5,8 \times 10^{-7}$
MIV-160	$5,7 \times 10^7$	$2,3 \times 10^{-8}$	$4,0 \times 10^6$	$2,5 \times 10^{-8}$	$1,1 \times 10^6$	$8,8 \times 10^{-7}$
MIV-170	$7,4 \times 10^7$	$1,0 \times 10^{-8}$	$3,3 \times 10^7$	$3,5 \times 10^{-8}$	$5,8 \times 10^6$	$1,8 \times 10^{-7}$
EFV	$4,5 \times 10^7$	$2,6 \times 10^{-8}$	$1,8 \times 10^6$	$5,7 \times 10^{-7}$	$4,4 \times 10^6$	$7,4 \times 10^{-7}$
NVP	$1,2 \times 10^6$	$8,5 \times 10^{-7}$	$6,1 \times 10^6$	$1,6 \times 10^{-7}$	$1,2 \times 10^3$	$8,5 \times 10^{-4}$
ETR	$1,5 \times 10^8$	$6,8 \times 10^{-9}$	$1,3 \times 10^7$	$7,7 \times 10^{-8}$	$1,1 \times 10^6$	$8,9 \times 10^{-7}$

Efecto antiviral “memoria” de los distintos NNRTI.

Los NNRTI también se caracterizan por tener un marcado efecto antiviral “memoria”. Esta denominación se utiliza para describir la excelente actividad antiviral aún cuando las células son pre-incubadas con NNRTI, lavadas extensivamente e infectadas con el VIH a diferentes horas o incluso días después del tratamiento con el NNRTI.

La figura 4 muestra el efecto antiviral “memoria” en células TZM-bl pre-incubadas con 0,1 ó 10 μM por 1 hora, lavadas extensivamente con medio de cultivo y finalmente infectadas con VIH-1_{ADA-M} (m.d.i. entre 0,003 y 0,007) a los días 0, 1, 4 ó 5 después del tratamiento con los distintos NNRTI. Los resultados sugieren que el compuesto MIV-150 posee el mejor efecto antiviral “memoria” en relación a los otros compuestos, en particular cuando se comparan los resultados de los días 0 y 1 a la concentración de 0,1 μM ($p=0,0004$) y los resultados de los días 4 y 5 a la concentración de 10 μM ($p<0,0004$).

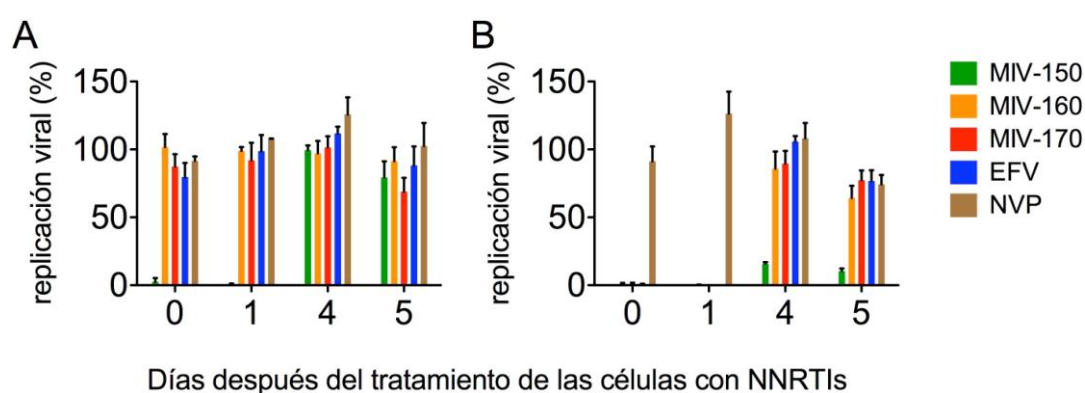


Figura 4. MIV-150 tiene un efecto antiviral “memoria” muy potente. Las células TZM-bl fueron incubadas por 1 hora con 0,1(A) ó 10 μM (B) de cada NNRTI, resuspendidas en 10 ml de medio de cultivo y centrifugadas para remover el sobrenadante que contiene el exceso de NNRTI. Este proceso fue repetido dos veces antes de infectar las células con VIH-1_{ADA-M} (m.d.i. entre 0,003 y 0,007) a los días 0, 1, 4 ó 5 después del tratamiento con NNRTI. La figura muestra el promedio y desviación estándar de tres experimentos independientes.

Efecto de los NNRTI sobre la viabilidad de lactobacilli y su actividad antiviral durante la transición de pH.

Otro aspecto de vital importancia a la hora de elegir un candidato como posible microbicida es evaluar su efecto sobre la viabilidad de microorganismos que forman parte de la microbiota vaginal o rectal. Al mismo tiempo es importante verificar que la actividad antiviral del microbicida se mantenga invariable en presencia de cambios fisiológicos que pueden ocurrir *in vivo*. Un ejemplo de esto sería la transición de pH ácido a neutro que ocurre cuando un microbicida es depositado en el lumen vaginal y se pone en contacto con fluido seminal.

La tabla 7 resume dos experimentos que responden a estos dos problemas planteados. El primero consistió en estudiar el crecimiento de *L. jensenii* y *L. crispatus* durante 48 horas en presencia de cada NNRTI y compararlo con el control que solamente contenía medio de cultivo. En el segundo experimento se evaluó la actividad antiviral de los NNRTI, añadiendo los mismos a células TZM-bl en medio ácido y seguido de la inoculación con VIH-1_{ADA-M} ligeramente básico para neutralizar el pH. El mismo ensayo pero en condiciones de cultivo normales (sin transición de pH) fue utilizado como control.

Como puede observarse en la Tabla 7, los NNRTI no mostraron ningún efecto tóxico contra *L. jensenii* o *L. crispatus*, ni tampoco hubo ningún efecto negativo en la actividad antiviral en células TZM-bl luego de someter a cada NNRTI a una transición de pH.

Tabla 7. Los NNRTI no afectan la viabilidad de lactobacillus y permanecen activos durante la transición de pH.

NNRTI	CI ₅₀ (μM)		CC ₅₀ (μM)	CE ₅₀ nM (intervalo de confianza del 95%) con o sin transición de pH	
	<i>L.jensenii</i>	<i>L.crispatus</i>		+	-
MIV-150	>500	>500	>100	0,25 (0,22 a 0,27)	0,39 (0,23 a 0,67)
MIV-160	>500	>500	>100	0,29 (0,12 a 0,67)	0,12 (0,10 a 0,35)
MIV-170	>500	>500	>100	0,43 (0,39 a 0,48)	0,20 (0,10 a 0,40)
EFV	>500	>500	>100	0,51 (0,29 a 0,91)	0,37 (0,27 a 0,50)
NVP	>500	>500	>100	47,9 (34,6 a 66,2)	64,8 (40,2 a 104,6)
ETR	>500	>500	>100	0,30 (0,28 a 0,31)	0,62 (0,29 a 1,31)

Citotoxicidad y actividad antiviral de AZ y de los distintos NNRTI en PBMC.

La citotoxicidad del AZ y de los NNRTI fue evaluada en PBMC para verificar la ausencia de efectos tóxicos y facilitar el cálculo del IS. A su vez, la actividad antiviral de cada uno de los NNRTI y AZ fue evaluada en células PBMC, contra un panel de aislamientos primarios o clones que representan diferentes subtipos, fenotipos del VIH-1 así como mutaciones representativas que confieren resistencia a antiretrovirales. Es oportuno destacar que la evaluación antiviral de AZ se realiza solo en células primarias (PBMC) pues esta actividad es difícil de apreciar en líneas celulares.

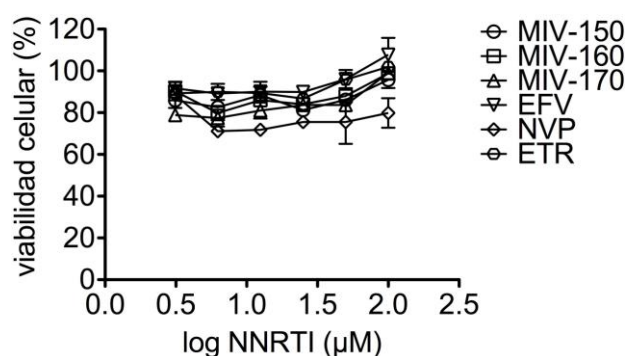


Figura 5. Citotoxicidad de NNRTIs en PBMC. La citotoxicidad de NNRTIs en PBMC fue estimada utilizando el mismo procedimiento para estudiar la actividad antiviral pero en ausencia de virus. La viabilidad celular fue estimada a través del ensayo colorimétrico (XTT). Se estimaron los valores de CC_{50} a través de la determinación del % de viabilidad celular con relación a los controles celulares no tratados con los compuestos. La figura muestra el promedio de 3 réplicas por concentración de NNRTI.

Los NNRTI mostraron valores de $CC_{50} > 100 \mu\text{M}$ (figura 5). La figura 6A muestra los resultados del ensayo XTT y CyQuant en PBMC tratados con diferentes concentraciones de AZ. Teniendo en cuenta el valor de CC_{50} de aproximadamente $400 \mu\text{M}$ (línea vertical en el eje x) decidimos efectuar la evaluación antiviral a concentraciones menores de $300 \mu\text{M}$ donde la viabilidad celular alcanza cerca de un 100%.

Los ensayos de actividad antiviral y virucida de AZ contra VIH-1_{NL4-3} (figura 6B) demostraron que AZ no tiene ningún efecto directo en el virus pues aún cuando

el VIH-1_{NL4-3} fue pre-tratado con diferentes concentraciones de AZ por 6 horas no se observó ninguna inhibición en su replicación. De igual forma cuando las células fueron pre-tratadas por 1 hora antes de añadir el VIH-1_{NL4-3}, y AZ fue retirado del medio de cultivo luego de 18 horas de incubación, no se observó actividad antiviral. Sin embargo, cuando AZ se mantuvo en el medio de cultivo durante los 7 días que duró el ensayo la curva de dosis-respuesta (figura 6B) muestra una CE₅₀ de 62,2 μ M, con un intervalo de confianza al 95% de 52,7 a 73,4. La figura 6C muestra un ejemplo de un aislamiento viral resistente a la actividad antiviral de AZ con un 100% en la replicación del virus, aún en la dosis más alta de AZ (228 μ M) corroborando la ausencia de toxicidad en las concentraciones de AZ utilizadas en el ensayo antiviral.

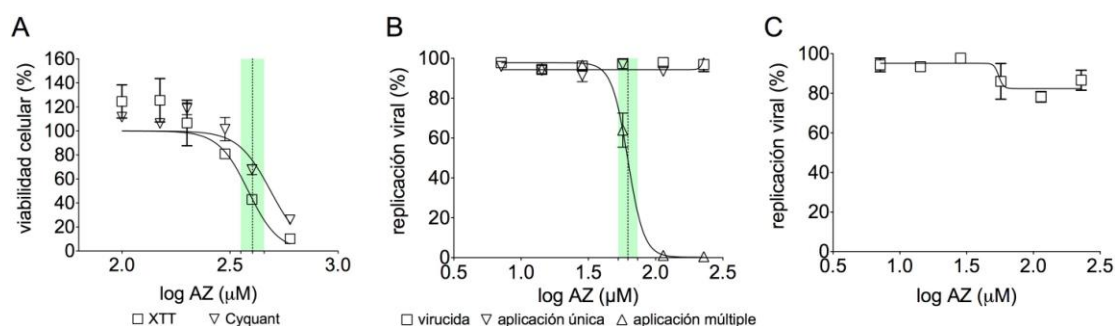


Figura 6. Citotoxicidad y actividad antiviral de AZ en PBMC. A) La citotoxicidad de AZ en PBMC fue estimada utilizando el mismo procedimiento para estudiar la actividad antiviral pero en ausencia de virus. La viabilidad celular fue estimada a través de ensayos colorimétrico (XTT) o fluorescente (Cyquant). B) La actividad antiviral o virucida de AZ contra el virus VIH-1_{NL4-3} fue determinada utilizando concentraciones no tóxicas. C) Ausencia de actividad antiviral de AZ contra el VIH-1_{97ZA009} en las mismas condiciones que VIH-1_{NL4-3} se mostró susceptible. Se estimaron los valores de CC₅₀ y CE₅₀ a través de la determinación del % de viabilidad celular o el % del Ag viral p24 con relación a los controles no tratados con los compuestos. Las figuras muestran el promedio y desviación estándar de 3 réplicas por concentración de AZ y los valores de CC₅₀ o CE₅₀, se muestran como líneas verticales con el intervalo de confianza al 95% en verde.

Para el ensayo antiviral de los NNRTIs, se añadieron diferentes concentraciones de los compuestos a PBMC activados, seguido de la infección con 100 TCID₅₀ de virus. El medio de cultivo fue removido 18 horas después para

añadir medio fresco sin los compuestos antivirales, proceso que fue repetido al cuarto día luego de la infección y que finalizó con la colección de sobrenadantes el día séptimo. En el caso particular de AZ se realizó el mismo procedimiento con la única diferencia que AZ fue añadido nuevamente en cada cambio de medio (como se describió en la figura 6B). Se estimaron los valores de CE₅₀ a través de la determinación en el sobrenadante del % del Ag viral p24 en relación a los controles no tratados con los compuestos. Este experimento a su vez, nos permitió comparar los perfiles de resistencia viral a cada compuesto, así como la capacidad de inhibir la replicación de diferentes subtipos virales.

Los resultados presentados en la tabla 8 sugieren que MIV-150, MIV-160 y MIV-170 tienen un perfil favorable, con la exclusión de dos aislamientos (OL-1/4 y W1023892-2) que contienen 2 ó más mutaciones en la RT y que afectan la actividad de los NNRTI.

Tabla 8. Actividad antiviral de NNRTIs, NRTI y AZ contra diferentes aislamientos primarios tipo salvaje o clones con mutaciones que confieren multiresistencia viral a antiretrovirales.

VIH-1	CE ₅₀ nM (Intervalo de confianza del 95%) [‡]						
	MIV-150	MIV-160	MIV-170	ETR	EFV	NVP	AZ
NL4-3	0,6 (0,2 a 1,7)	0,6 (0,2 a 1,7)	0,8 (0,4 a 1,8)	0,6 (0,2 a 1,5)	0,8 (0,4 a 1,9)	ND	70,2 (42,7 a 115,2)
92UG029	0,5 (0,3 a 0,9)	1,6 (0,6 a 4,1)	0,3 (0,1 a 0,5)	4,6 (2,5 a 8,5)	ND	ND	~228
91US056	1,5 (0,5 a 4,2)	0,2 (0,1 a 0,5)	ND	ND	0,9 (0,2 a 3,4)	233 (104 a 519)	~106,5
92BR014	0,7 (0,6 a 0,9)	3,9 (1,9 a 7,6)	4,3 (2,1 a 8,9)	4,3 (1,7 a 10,8)	4,2 (2,2 a 7,8)	ND	65,1 (57,7 a 73,4)
92HT593	2,2 (1,7 a 2,8)	ND	0,1 (0,05 a 0,3)	0,3 (0,2 a 0,7)	0,8 (0,4 a 1,6)	47 (23 a 94)	110 (103 a 117,6)
96USNG31	1,1 (0,8 a 1,5)	ND	0,2 (0,1 a 0,7)	0,2 (0,06 a 1,2)	0,3 (0,1 a 0,5)	232 (94 a 574)	> 228
97USNG30	0,6 (0,2 a 2,2)	0,2 (0,1 a 0,6)	0,6 (0,2 a 2,0)	3,9 (2,5 a 6,1)	5,3 (2,6 a 11)	ND	~228
97ZA009	0,9 (0,2 a 4,1)	0,2 (0,05 a 0,7)	0,1 (0,03 a 0,6)	0,5 (0,3 a 0,9)	0,4 (1,5 a 4,2)	ND	> 228
92BR025	0,2 (0,1 a 0,3)	ND	ND	ND	ND	ND	47,1 (37 a 59,9)
93MW965	2,4 (0,6 a 8,7)	ND	ND	ND	ND	ND	82,1 (63,8 a 105,5)
92TH020	0,6 (0,2 a 2,4)	2 (0,7 a 5,6)	ND	0,2 (0,1 a 0,4)	0,2 (0,1 a 0,7)	59 (27 a 131)	52,8 (37,5 a 74,2)
93TH051	1,4 (0,8 a 2,3)	3,3 (1,7 a 6,3)	ND	ND	ND	351 (209 a 588)	63,9 (58,6 a 69,6)
CMU06	0,9 (0,6 a 1,6)	2,3 (0,9 a 5,6)	0,5 (0,2 a 1)	0,3 (0,6 a 5,1)	2,6 (1,6 a 4,3)	184 (101 a 335)	> 228
1617-1	4,2 (1,6 a 11,2)	1,4 (0,4 a 4,6)	1,9 (0,8 a 4,6)	1,5 (0,5 a 4,3)	3,8 (1,9 a 7,5)	848 (233 a 3089)	41,2 (30,4 a 55,7)
4755-5	0,4 (0,2 a 0,9)	0,8 (0,4 a 1,6)	0,2 (0,1 a 0,5)	0,7 (0,3 a 1,6)	3,7 (1,7 a 8,1)	294 (163 a 530)	79,5 (61,7 a 102,6)
6463-13	0,2 (0,05 a 0,8)	0,2 (0,1 a 0,5)	ND	ND	0,4 (0,07 a 2,1)	161 (45 a 572)	20,9 (3,3 a 133)
7136-1	0,1 (0,07 a 0,2)	0,1 (0,04 a 0,4)	0,4 (0,2 a 0,9)	ND	ND	> 10000	63,7 (46 a 88,1)
7295-1	0,9 (0,4 a 1,9)	0,7 (0,5 a 0,9)	1,8 (1,1 a 3,1)	1,8 (1,1 a 3,1)	5,0 (2,6 a 9,8)	231 (119 a 449)	88,7 (47,6 a 165,2)
7324-1	0,1 (0,03 a 0,7)	0,2 (0,1 a 0,6)	ND	1 (0,3 a 3,3)	ND	168 (94 a 301)	63,5 (48,7 a 82,8)
7324-4	0,7 (0,3 a 1,5)	0,9 (0,3 a 2,6)	0,2 (0,1 a 0,3)	1,2 (0,5 a 2,5)	3,9 (1,7 a 8,9)	ND	63 (53,3 a 75,7)
8415-2	3,3 (1,6 a 6,8)	4,1 (2,1 a 8,2)	0,8 (0,5 a 1,1)	1,6 (1,1 a 2,4)	3,7 (1,6 a 8,5)	ND	70,6 (53,5 a 93,2)
29129-2	0,5 (0,2 a 1)	0,9 (0,6 a 1,4)	0,6 (0,3 a 1,2)	0,6 (0,3 a 1,2)	7,3 (4 a 13,2)	123 (69 a 218)	80,2 (55,8 a 115,2)
35764-2	0,1 (0,05 a 0,3)	0,2 (0,1 a 0,4)	ND	0,7 (0,3 a 2,2)	0,8 (0,5 a 1,3)	241 (149 a 389)	35,6 (23,9 a 53,1)
J18-1	1,4 (0,9 a 2,2)	1,9 (0,9 a 4,2)	ND	ND	ND	319 (150 a 676)	>228
OL-1/4	>1000	>1000	>1000	327 (1612 a 663)	ND	>10000	>228
V17763-5	0,5 (0,1 a 3)	ND	ND	ND	ND	>10000	23,7 (16,2 a 34,6)
W1023892-2	9,6 (5,9 a 15,4)	>10	0,5 (0,3 a 1)	3,6 (1,9 a 6,9)	ND	> 10000	71 (24,8 a 202,6)

[‡] con la excepción de AZ que está dada en µM; ND = valor no determinado.

Por su parte, AZ mostró valores de CE_{50} entre 20 y 100 μM lo cual se traduce en un IS cercano a 10. Alrededor de cinco aislamientos primarios o clones mostraron resistencia a AZ y están siendo investigados para identificar posibles mutaciones responsables de esta pérdida de la actividad antiviral.

Resistencia Viral a los diferentes NNRTI.

El posible desarrollo de resistencia a un agente antiviral es un factor importante a tener en cuenta cuando se selecciona un compuesto con potencial de ser empleado como microbicida contra el VIH. Es por esto que el estudio del desarrollo de resistencia viral *in vitro*, forma parte esencial de los experimentos a cumplir en los ensayos preclínicos.

Con estas consideraciones en mente, células MT-4 fueron infectadas con la cepa viral de laboratorio VIH-1_{MN} y mantenidas en presencia de concentraciones subóptimas de cada uno de los NNRTI a estudiar. Las concentraciones fueron incrementadas paulatinamente a medida que la replicación viral aumentaba y de esta forma se ejerció una presión selectiva para identificar mutaciones capaces de disminuir la susceptibilidad del virus a cualquiera de los NNRTI estudiados. Una vez seleccionados estos virus, se estudió, a su vez, la posible resistencia cruzada entre los diferentes NNRTI y los virus seleccionados por cada NNRTI.

La tabla 9 presenta los resultados de este estudio en células MT-4, en la cual se puede observar que son necesarias 2 ó 3 mutaciones en la enzima RT para disminuir la susceptibilidad del VIH a MIV-150, MIV-160 o MIV-170. Es importante resaltar que nuestros resultados coinciden con estudios realizados por otros grupos de investigación (Medivir) donde se comprobó la necesidad de 2 ó más mutaciones en la enzima RT para reducir la susceptibilidad del VIH al compuesto MIV-150. En nuestro caso, la combinación de 3 mutaciones bien caracterizadas (K101Q, K103N, Y181I o E138G, Y181C, M230L) fueron imprescindible para disminuir la actividad antiviral de MIV-150 contra el VIH.

Tabla 9. Resistencia cruzada a los distintos NNRTI de los diferentes aislamientos virales realizados en células MT-4.

NNRTI en el cultivo <i>in vitro</i>	Mutaciones prevalentes en la secuencia de AA en la RT	CE ₅₀ (μM)					
		MIV-150	MIV-160	MIV-170	EFV	NVP	ETR
Ninguno	WT	0,0007	0,0004	0,0006	0,0006	0,0038	0,0004
MIV-150*	L100I, K103N, Y181C	>10	>10	4,7	>10	>10	ND
	E138G, Y181C, M230L	9,4	0,5	0,009	ND	>10	0,011
MIV-160*	L100I, Y181C	4,8	>10	2,8	2,55	>10	ND
	L100V, K103N, Y181C	0,077	0,9	0,023	ND	>10	0,008
MIV-170	L100I, V179F, Y181C	5,2	>10	>10	2,71	>10	ND
EFV	L100I, K103N	0,9	0,06	0,06	>10	>10	ND
NVP	Y181C	0,0002	0,0008	0,0008	0,001	>10	ND
ETR	ND	>10	>10	6,7	ND	>10	8,1

Los virus fueron aislados (5-10 semanas) después de estar expuestos a concentraciones crecientes de cada NNRTI. Los aislamientos virales fueron clonados y un total de 14 clones/aislamiento fueron secuenciados. La susceptibilidad a cada NNRTI fue determinada a través del ensayo MAGI. Como se puede observar, se necesitan 2 ó 3 mutaciones, en un mismo genoma, para que disminuya la actividad antiviral de MIV-150, MIV-160 o MIV-170. * Se realizaron dos experimentos independientes. ND = No determinado.

Posteriormente, se aislaron los virus que fueron subcultivados en PBMC por 9 semanas en presencia de cada compuesto o la combinación. Estos virus fueron secuenciados y titulados en PBMC y la susceptibilidad a AZ o MIV-150 fue comparada con el virus semilla inicial (VIH-1_{92BR014}). Se emplearon tres réplicas de cada concentración de los compuestos para obtener la curva de dosis-respuesta y estimar los valores de CE₅₀.

Este estudio de desarrollo de resistencia viral en PBMC identificó dos posibles mutaciones (K43R, A554S) que pudieran ser responsables de la disminución de la susceptibilidad del VIH a AZ (tabla 10). El virus resistente mostró un aumento de la CE₅₀, verificando la resistencia viral. Las mutaciones fueron halladas en el gen que codifica para la enzima viral RT lo cual concuerda con recientes publicaciones que describen una disminución en la actividad catalítica de esta enzima en presencia de zinc [12]. También se identificó la mutación A554S en 6 de los 7 virus que mostraron resistencia a AZ (Tabla 8). El único virus resistente a AZ que no contiene la mutación A554S es el aislamiento OL-1/4. Se están realizando estudios adicionales, empleando mutagénesis directa en el VIH-1_{NL4-3},

para introducir la mutación A554S y corroborar que la misma está asociada con la resistencia a AZ. También es importante señalar que el mutante resistente a AZ permaneció susceptible a MIV-150, lo cual indica la ausencia de resistencia cruzada. A su vez, es interesante resaltar la ausencia de resistencia viral en la combinación de MIV-150 y AZ, lo cual favorece el empleo de ambos compuestos en un microbicida contra VIH.

Tabla 10. Desarrollo de resistencia viral *in vitro* en presencia de AZ, MIV-150 o la combinación de MIV-150 y AZ.

Virus	Mutaciones prevalentes en la secuencia de AA en la RT	CE ₅₀ (intervalo de confianza del 95%)	
		AZ (µM)	MIV-150 (nM)
VIH-1 _{92BR014}	WT RT	65,1 (57,7 a 73,4)	0,7 (0,6 a 0,9)
Seleccionado con AZ 90µM	WT RT	89,6 (34,5 a 102,7)	1,4 (0,9 a 2,2)
Seleccionado con AZ 180µM	K43R, A554S	>228	0,2 (0,03 a 1,4)
Seleccionado con MIV-150 800nM	V75I, K101E, K103T, Y181C	ND	ND
Seleccionado con AZ:MIV-150 (90µM:0,5nM)	-	-	-

ND = No determinado

Por otra parte, se aisló un posible virus resistente a MIV-150 con mutaciones características de resistencia a NNRTIs pero la baja replicación de este virus *in vitro* no permitió hacer estudios fenotípicos. En su lugar, los virus resistentes a MIV-150 (L100I, K103N, Y181C) y MIV-160 (L100V, K103N, Y181C) que se muestran en la tabla 9, se propagaron favorablemente en PBMC. Los dos mutantes fueron susceptibles a AZ con CE₅₀ de 63,8 µM (35,7 a 113,9) para el mutante seleccionado con MIV-150 y CE₅₀ de 38,7 µM (24,7 a 60,7) para el mutante seleccionado con MIV-160.

Combinación de compuestos y sus efectos en la actividad antiviral.

Teniendo en cuenta los resultados hasta ahora expuestos decidimos elegir MIV-150 como el candidato más prometedor basado en la potente actividad antiviral, efecto memoria y el favorable perfil de resistencia.

La combinación de MIV-150 y AZ fue entonces estudiada en el mismo sistema de PBMC donde previamente se evaluó cada compuesto por separado.

Para este estudio se eligió un aislamiento primario, VIH-1_{92BR014} susceptible a ambos compuestos. La relación dosis efecto se determinó por la estimación del IC utilizando el programa Calculusyn (Calculusyn, Biosoft, Cambridge, UK). La proporción de las combinaciones de compuestos fue equipotencial y se determinó por los valores de CE₅₀ de cada compuesto. Como puede observarse en la tabla 11, los resultados sugieren un efecto aditivo de la combinación de MIV-150 y AZ ya que los valores de IC son cercanos a 1.

Tabla 11. Efecto aditivo de la combinación de MIV-150 y AZ utilizando el método de Chou-Talalay.

Compuestos	Valor de IC			Dm*	m [¥]	r [†]
	CE ₅₀	CE ₇₅	CE ₉₀			
AZ	NA	NA	NA	47863	3,17	0,978
MIV-150	NA	NA	NA	0,95	3,01	0,916
AZ:MIV-150 (50000:1)	0,95	0,97	0,99	22633	2,91	0,970

* Dosis efectiva media (CE₅₀); ¥ representa una medida de la sigmoidicidad de la curva dosis-efecto; † coeficiente de correlación linear.

Actividad antiviral sinérgica de la combinación AZ y CG contra VHS-2.

Luego del extensivo estudio de citotoxicidad y actividad antiviral de cada compuesto decidimos explorar la formulación de ambos en forma de gel utilizando CG como vehículo. La opción de CG estuvo determinada por la amplia experiencia de nuestro laboratorio con este polímero que incluye estudios clínicos que demuestran una excelente seguridad y aceptabilidad, además de estudios preclínicos que sugieren una posible actividad antiviral contra el VHS-2 y el virus del papiloma humano (VPH).

Con el objetivo de explorar la actividad antiviral de la combinación de CG y AZ contra VHS-2, realizamos un estudio de dicha combinación utilizando el ensayo de placas de lisis virales en células Vero. Para este estudio se utilizó el virus VHS-2 cepa G. La relación dosis efecto se determinó por la estimación del IC utilizando el programa Calculusyn (Calculusyn, Biosoft, Cambridge, UK). La proporción de las combinaciones de compuestos fue equipotencial y se determinó por los valores de CE₅₀ de cada compuesto. Los resultados obtenidos sugieren un efecto sinérgico de ambos compuestos con valores de IC<1 (Tabla 12) .

Tabla 12. Sinergismo de AZ y CG utilizando el método de Chou-Talalay.

Compuestos	Valor de IC			Dm*	m‡	r†
	CE ₅₀	CE ₇₅	CE ₉₀			
CG	NA	NA	NA	0,036	0,77	0,966
AZ	NA	NA	NA	67,379	0,67	0,885
CG:AZ (1:1000)	0,41	0,26	0,17	0,009	1,06	0,994

* Dosis efectiva media (CE₅₀); ‡ representa una medida de la sigmoidicidad de la curva dosis-efecto;

† coeficiente de correlación linear

A su vez, se estudió el efecto sinérgico de CG y AZ *in vivo*. Para ello, se utilizó el modelo murino en ratones Balb-C donde los animales fueron tratados con Depo-Provera siete días antes de la infección viral. Posteriormente, los ratones fueron tratados con 10 µl de geles de CG conteniendo diferentes concentraciones de AZ, gel de CG, solución de AZ o placebo (D-PBS), los cuales fueron administrados de forma intravaginal. La inoculación del VHS-2 G se realizó 10 minutos luego de la aplicación de los geles, AZ o placebo utilizando un inóculo que contiene 10⁶ ufp/ratón (1000 DL₅₀).

La figura 7 muestra una clara ventaja en la combinación de CG con AZ para lograr disminuir significativamente la infección por VHS-2 aún en condiciones rigurosas donde el inóculo viral fue de 1000 DL₅₀.

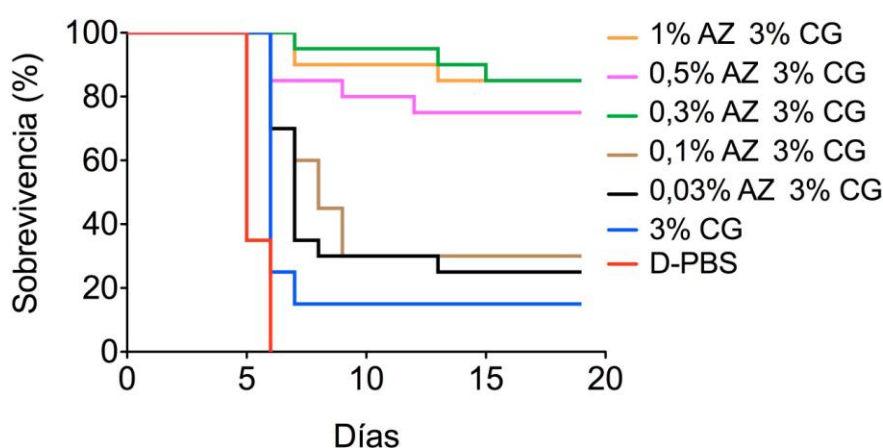


Figura 7. AZ en combinación con CG disminuye significativamente la infección en ratones Balb-C. El % de supervivencia está basado en los síntomas de la infección. Los geles de CG que contienen más de 0,3% de AZ protegen significativamente

comparados con geles que contienen menos AZ ($P < 0,01$), geles que contienen solo CG ($P < 0,0001$) y D-PBS placebo ($P < 0,0001$). $n=20$.

Seguridad del gel MIV-150/ZA/CG en ensayos *in vitro* e *in vivo*.

Paralelamente y con el objetivo de investigar la seguridad del gel realizamos varios ensayos *in vitro* e *in vivo* de toxicidad. Estos ensayos incluyen: el efecto del gel en la resistencia eléctrica transepitelial de monocapas diferenciadas de células Caco-2, efectos en la arquitectura de los tejidos cervico-vaginales y rectales de ratones Balb-C luego de la aplicación *in vivo* del gel, y por último el modelo murino para detectar incremento de susceptibilidad al VHS-2 debido a posibles efectos tóxicos del gel. La figura 8 muestra que en todos los modelos utilizados el gel que combina MIV-150, AZ y CG no tuvo ningún efecto perjudicial.

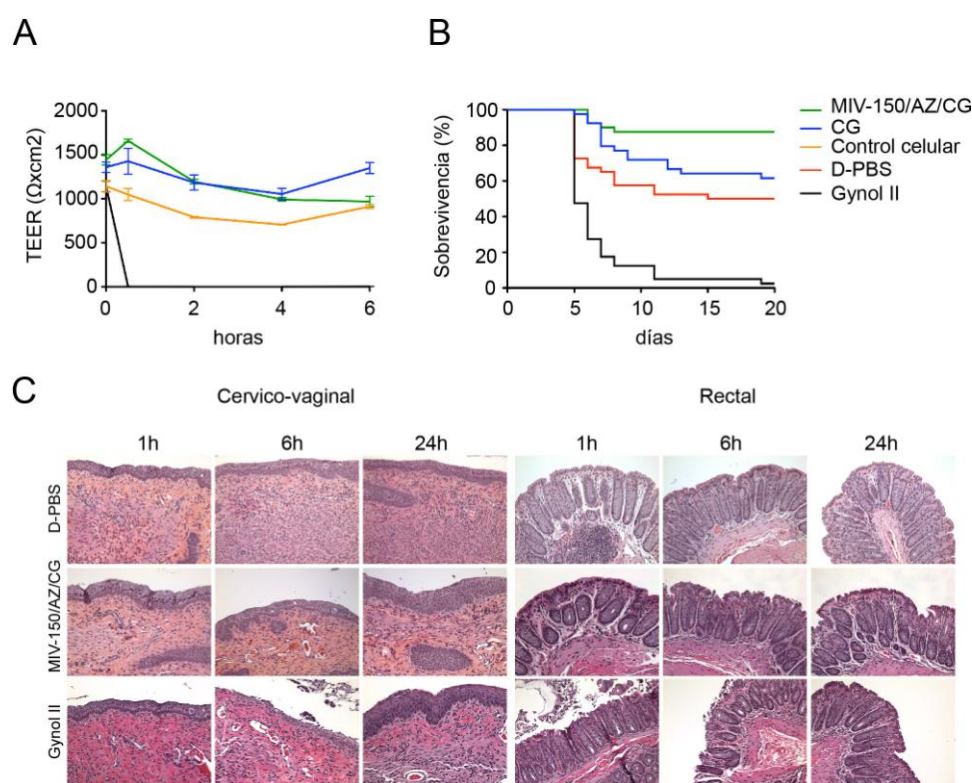


Figura 8. El gel MIV-150/ZA/CG no afecta la integridad de la mucosa vaginal o

rectal. A) Monocapas diferenciadas de células Caco-2 fueron tratadas con geles diluidos (1:10) durante 0, 2, 4 ó 6 horas antes de medir los valores de TEER (tres réplicas). El gráfico muestra el promedio \pm SD para cada muestra (dos experimentos independientes). B) Ratones BALB/c ($n=40$ /muestra) tratados con Depo-Provera recibieron una dosis diaria intravaginal de gel durante 7 días. Los ratones fueron infectados con una dosis subóptima del VHS-2 (2×10^3 ufp) 12 horas luego de la última dosis de gel. El gráfico muestra el % de sobrevivencia durante 21 días luego de la

infección. Se observó un incremento significativo de la infección por VHS-2 en los animales que recibieron Gynol II (control negativo) vs. D-PBS, MIV-150/ZA/CG o CG ($p < 0,0001$). C) Ratones Balb/C fueron tratados con Depo-Provera (modelo vaginal) o no tratados (modelo rectal) antes de aplicarse CG o MIV-150/ZA/CG. El tracto reproductivo o rectal fue removido cuidadosamente luego de la eutanasia a diferentes tiempos luego de administrar los geles (1, 6 ó 24 horas). Los tejidos fueron procesados para realizar la tinción de H&E. El panel muestra un ejemplo de las seis secciones colectadas en 2-3 animales que recibieron cada gel. Las fotos se obtuvieron a una magnificación de 20X.

Además del efecto en la integridad de los epitelios cervico-vaginales y rectales se evaluó el posible efecto tóxico contra lactobacilli. La figura 9 muestra que el gel MIV-150/AZ/CG no alcanza a reducir el número de lactobacilli viables a más de 1 \log_{10} , mientras que el control positivo de penicilina/estreptomicina inhibe completamente el crecimiento de lactobacilli.

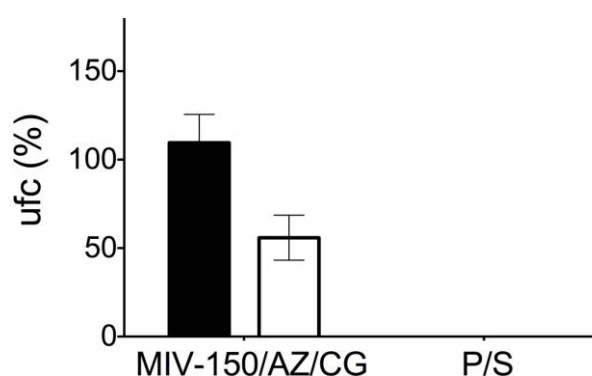


Figura 9. El gel MIV-150/AZ/CG no afecta la viabilidad de lactobacilli. La posible toxicidad del gel fue evaluada a través de la incubación por 30 minutos de *L. jensenii* (barra blanca) y *L. crispatus* (barra negra) con el gel diluido 1:10 en comparación con penicilina/estreptomicina (P/S). La figura muestra el porcentaje de ufc (promedio y desviación estándar de tres experimentos independientes) relativo al control de lactobacilli en buffer salino que contiene 7,5% de SFB.

Eficacia del gel MIV-150/ZA/CG en el modelo vaginal y rectal del VHS-2 en ratones.

Continuando con el efecto antiviral contra el VHS-2 decidimos verificar la actividad del gel que contiene MIV-150, AZ y CG y comprobamos que dicho gel es igual de eficaz en reducir la infección por VHS-2 en ratones Balb-C, no solo en un modelo vaginal sino también rectal (Figura 10).

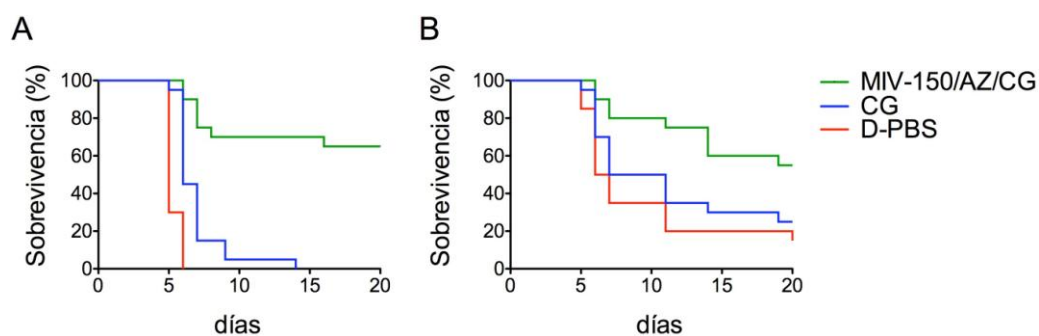


Figura 10. El gel MIV-150/ZA/CG reduce significativamente la infección vaginal y rectal con altas dosis de VHS-2. Ratones Balb/C fueron tratados con Depo-Provera (infección vaginal, A) o no tratados (infección rectal, B) e infectados con 10^6 ufp VHS-2 10 minutos luego de aplicar los geles (n=20). La prueba exacta de Fisher fue utilizada para la comparación estadística de MIV-150/ZA/CG vs. CG o D-PBS. $P < 0,05$ fueron tomados como diferencia significativa.

Actividad antiviral del gel MIV-150/ZA/CG contra el VIH-1.

En este ensayo se exploró la actividad antiviral del gel MIV-150/AZ/CG contra VIH-1, utilizando aislamientos de laboratorios que incluyen cepas con fenotipo CXCR4 (VIH-1_{MN}) y fenotipo CCR5 (VIH-1_{BaL}, VIH-1_{ADA-M}, VIH-1_{MG505.WOM.ENV.CZ}). Cabe destacar que la cepa VIH-1_{MG505.WOM.ENV.CZ} es un virus que contiene la gp120 de un aislamiento temprano responsable del establecimiento de la infección por VIH y por lo tanto de gran importancia en el estudio de compuestos o fórmulas que puedan bloquear la transmisión del virus.

La actividad antiviral fue evaluada en células TZM-bl con una multiplicidad de infección aproximada a 0.001, empleando el ensayo MAGI. La figura 11 muestra los valores de CE_{50} para los virus CCR5 y el virus CXCR4. La diferencia en CE_{50} entre cepas de diferente fenotipos puede estar dada por el hecho de que el gel contiene CG, y este polianión puede bloquear la infección por virus CXCR4 pero tiene baja potencia contra los virus CCR5 (fenotipo asociado al establecimiento de la infección por VIH).

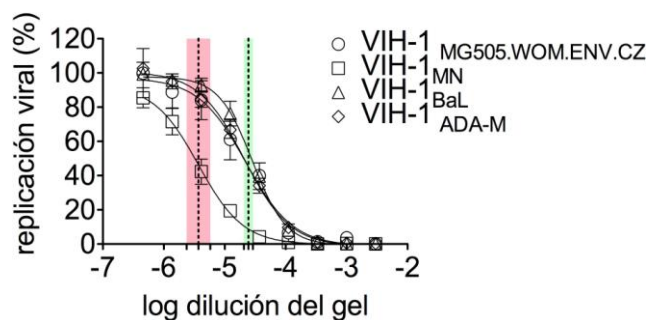


Figura 11. Actividad antiviral del gel MIV-150/AZ/CG contra cepas de laboratorio. La actividad antiviral fue evaluada en células TZM-bl con una multiplicidad de infección aproximada a 0.001, empleando el ensayo MAGI. La figura muestra el promedio y desviación estándar de 2 ó 3 experimentos independientes y los valores de CE_{50} , se muestran como líneas verticales con el intervalo de confianza del 95% (verde para cepas CCR5 y rosado para la cepa CXCR4).

Para culminar los estudios de la actividad antiviral del gel que combina MIV-150/AZ/CG, los mismos aislamientos primarios y clones empleados en la tabla 8 fueron utilizados para estudiar si el gel tiene un amplio espectro de actividad contra VIH-1, mediante el uso del ensayo antiviral en PBMC.

Los resultados obtenidos sugieren que el gel no compromete la viabilidad de PBMCs ($CC_{50} > 0,0166$; Figura 12) y produce una potente inhibición del VIH-1 con IS entre 80 y 1250, aunque al igual que en la evaluación antiviral de NNRTI y AZ, el aislamiento VIH-1_{OL-1/4} se mostró particularmente resistente a la inhibición por el gel (Tabla 13).

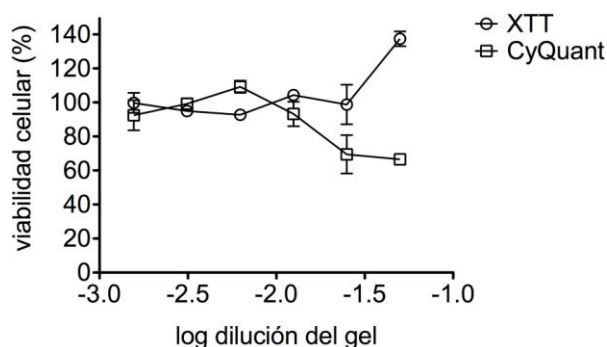


Figura 12. Citotoxicidad del gel MIV-150/AZ/CG en PBMC. La citotoxicidad del gel fue evaluada utilizando el mismo procedimiento para estudiar la actividad antiviral pero en ausencia de virus. La viabilidad celular fue estudiada a través de los ensayos XTT y Cyquant. Se estimaron los valores de CC_{50} a través de la determinación del % de viabilidad celular con relación a los controles

celulares no tratados con los compuestos. La figura muestra el promedio y desviación estándar de 3 réplicas por concentración de NNRTI.

Tabla 13. Actividad antiviral del gel MIV-150/AZ/CG contra diferentes aislamientos primarios tipo salvaje o clones con mutaciones que confieren multiresistencia viral a antiretrovirales.

VIH-1	CE₅₀ dada en dilución del gel (Intervalo de confianza del 95%)	IS
NL4-3	0,0002 (0,00008 a 0,0007)	>250
92UG029	0,0004 (0,0003 a 0,0005)	>125
91US056	0,0004 (0,0002 a 0,0007)	>125
92BR014	0,0003 (0,0001 a 0,0007)	>167
92HT593	0,0001 (0,00005 a 0,0002)	>500
96USNG31	0,0006 (0,0002 a 0,003)	>83
97USNG30	0,0006 (0,0005 a 0,0009)	>83
97ZA009	0,0001 (0,00009 a 0,0002)	>500
92TH020	0,00006 (0,00004 a 0,0001)	>833
93TH051	0,0004 (0,0002 a 0,001)	>125
CMU06	0,0001 (0,00005 a 0,0002)	>500
1617-1	0,0001 (0,00006 a 0,0004)	>500
4755-5	0,0002 (0,0001 a 0,0005)	>250
6463-13	0,00004 (0,00002 a 0,00009)	>1250
7136-1	0,0001 (0,00007 a 0,0003)	>500
7295-1	0,0005 (0,0004 a 0,0007)	>100
7324-1	0,0003 (0,0001 a 0,0009)	>167
7324-4	0,0003 (0,0002 a 0,0005)	>167
8415-2	0,0004 (0,0001 a 0,0012)	>125
29129-2	0,0002 (0,00009 a 0,0003)	>250
35764-2	0,00008 (0,00003 a 0,0002)	>625
J18-1	0,0002 (0,0001 a 0,0007)	>250
OL-1/4	>0,0025	ND
V17763-5	0,0004 (0,0001 a 0,0016)	>125
W1023892-2	0,0002 (0,00006 a 0,0005)	>250

ND = valor no determinado

DISCUSIÓN

La complejidad de la transmisión del VIH expone la necesidad de identificar microbicidas capaces de bloquear los eventos tempranos en el ciclo de infección del virus. Este proyecto se ha enfocado en identificar compuestos individuales o combinaciones que puedan resultar en un microbicida potente, capaz de bloquear la replicación del virus, a concentraciones muy bajas con el menor efecto tóxico. A su vez, también se centró en la selección de diferentes compuestos que presenten el mejor perfil de resistencia.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis demostraron que la combinación de MIV-150 con AZ resultó en un efecto aditivo en la actividad antiviral contra VIH-1, mientras que la combinación de AZ con CG mostró sinergismo en la actividad antiviral contra VHS-2; y por lo tanto posicionan al gel MIV-150/AZ/CG como un prometedor microbicida para la prevención de la transmisión sexual del VIH-1 y del VHS-2.

La RT del VIH es una enzima heterodimérica que consiste en dos subunidades p66 y p51. La subunidad p66 contiene los dominios de la polimerasa y la ribonucleasa H [157,158]. La estructura de la subunidad p66 se describe como una mano derecha que contiene tres dominios: palma de la mano, el pulgar y el resto de los dedos [157]. El ARN molde es sujetado por el pulgar y el resto de los dedos, quedando en contacto con la palma de la mano. El sitio activo, que consiste en una tríada de aspartatos en interacción con cationes divalentes (Mg^{2+} o Mn^{2+}), se encuentra en la palma de la mano [159].

Los NNRTI se unen a un sitio alostérico (también conocido como “bolsillo hidrofóbico”) en el dominio de la palma de la mano de la subunidad p66 [160,161]. Este sitio se encuentra cerca del sitio activo de la enzima. Se ha planteado que el “bolsillo hidrofóbico” es en realidad una estructura que se forma solo al unirse el NNRTI e inducir el ascenso de las cadenas laterales de los aminoácidos Y181 e Y188 [160,161]. Las dos tirosinas en la posición 181 y 188 son responsables de las interacciones por apilamiento de anillos aromáticos que se producen especialmente

con los NNRTI de primera generación (NVP y delavirdina). Es por ello que la mutación Y181C puede inducir una fácil resistencia del virus a estas drogas.

Se han propuesto varios mecanismos para explicar la inhibición de la enzima RT por parte de los NNRTIs. Una de las primeras hipótesis fue la llamada “artritis molecular” inducida por NVP [157]. Otra de ellas plantea una distorsión de la tríada del sitio activo a una conformación que impide la unión de cationes divalentes. La pérdida de contra iones (Mg^{2+} o Mn^{2+}) afecta la unión de nucleótidos debido a una repulsión de cargas entre los grupos fosfatos de los nucleótidos y los aspartatos en la tríada [162,163,164].

Una cualidad extraordinaria de los NNRTI es su alta afinidad por la RT, la cual se ve reflejada en los altos valores de las constantes de asociación y valores muy pequeños en las constantes de disociación (tabla 6, página 62), además del prolongado efecto memoria especialmente de MIV-150 (Figura 4, página 63). La firme unión a la RT y el efecto memoria potente también han sido descritos para otros NNRTI, tales como UC781 y DPV [165]. Experimentos realizados con tejidos de explantes cervicales, tratados con diferentes concentraciones de DPV por 2 ó 24 horas, seguido de un proceso de lavado para remover el compuesto antes de exponer el tejido al VIH-1; demostraron que 0,1 μM de DPV, inhibe hasta un 90% de la replicación del VIH-1 solo cuando la infección se realiza inmediatamente después de retirar el compuesto. Sin embargo para lograr similar nivel de inhibición, luego de 4 días después de remover DPV, se necesita una concentración igual o superior a 10 μM del compuesto [166].

Un resultado superior se obtuvo en nuestro estudio solo con MIV-150 ya que 0,1 μM de este NNRTI, inhibe hasta un 90% de la replicación del VIH-1, incluso realizando la infección 24 horas después de retirar el compuesto. Además, 10 μM de MIV-150 protegió las células TZM-bl de la infección por VIH-1 hasta al menos 5 días después de remover el NNRTI. Otros NNRTIs (MIV-160, MIV-170, EFV) solo protegieron las células TZM-bl de la infección por VIH-1, a las 24 horas de haber sido retirado cada compuesto, utilizando una concentración de 10 μM . Por su parte NVP no inhibió la infección por el VIH-1 en ninguna de las circunstancias

analizadas.

Por otra parte, los NNRTIs fueron activos en condiciones de transición de pH, ensayo que busca detectar la solidez de la actividad antiviral durante el cambio de pH que se produce durante el coito, una vez que el semen (pH alcalino) se pone en contacto con el fluido vaginal (pH ácido). El fundamento del uso de este ensayo se basa en que algunos compuestos, en especial proteínas, pueden verse afectadas su solubilidad y actividad a diferentes pH [167]. MIV-150, MIV-160, MIV-170, EFV y ETR mantuvieron valores de CE_{50} subnanomolares en presencia o ausencia de la transición de pH.

También se evaluó el posible efecto de los NNRTIs en la viabilidad de *L.jensenii* y *L.crispatus*, bacterias que forman parte de la microflora normal del tracto vaginal [168]. Ninguno de los compuestos, evaluados a concentraciones tan altas como 500 μ M, afectó el crecimiento *in vitro* de las bacterias.

Sin embargo, la principal desventaja de los NNRTI radica en la resistencia viral rápida que el VIH puede desarrollar a estos compuestos. Las tablas 9 y 10 (páginas 69 y 70) muestran que todos los NNRTI evaluados desarrollaron resistencia viral durante las 9 semanas de subcultivo del VIH-1_{MN}, en presencia de concentraciones crecientes del NNRTI en células MT-4. Cabe destacar que en el caso de MIV-150 y MIV-170 se necesitó la combinación de tres cambios aminoacídicos para seleccionar una cepa viral resistente. Este resultado contrasta con NVP, NNRTI de la primera generación que todavía se emplea en el tratamiento para VIH. NVP solo necesita un cambio aminoacídico (Y181C) para decrecer la susceptibilidad del virus. Esta mutación, seleccionada *in vitro*, coincide con una de las mutaciones de resistencia a NVP detectada en pacientes que fallan con la terapia con este NNRTI [169]. El mutante seleccionado con EFV (K103N + Y181C) también coincide con la detección de K103N o la combinación de K103N+Y181C en la mayoría de los pacientes que fallan con la terapia con EFV [170]. Estos hallazgos avalan los resultados del método de selección *in vitro* expuestos en este trabajo. El mutante simple, seleccionado con NVP, no fue suficiente para resistir la inhibición de la replicación viral por MIV-150, MIV-160 o MIV-170.

Aunque es cierto que estos tres NNRTI muestran una barrera genética superior cuando se comparan a otros inhibidores como NVP o EFV, dobles o triples mutantes pueden desarrollarse y comprometer la eficacia de estas drogas o incluso el tratamiento con otro NNRTI en caso de resistencia cruzada. En el caso particular de MIV-150 se seleccionaron mutantes con 3 ó 4 cambios aminoacídicos en dos experimentos independientes que contienen la combinación de K101Q+K103N+Y181I, E138G+Y181C+M230L o V75I+K101E+K103T+Y181C. Destaca la presencia de K103N o Y181C, las dos mutaciones con mayor prevalencia en la resistencia a NNRTIs (tabla 2, página 33), aunque siempre son seleccionados en combinación con otras mutaciones para poder reducir la susceptibilidad del virus a MIV-150.

Es así que para entender el papel que juegan las mutaciones que confieren resistencia a NNRTIs hay que conocer el proceso mediante el cual el NNRTI se une a la enzima y bloquea su actividad. Las bases estructurales que explican la mutación K103N no están del todo bien establecidas. K103 no establece generalmente, una interacción directa con los NNRTI aunque se han reportado puentes de hidrógeno con delavirdina [171]. Se plantea que el mecanismo de resistencia a NNRTIs en la mutación K103N puede estar explicado por la formación de un puente de hidrógeno entre el grupo amida de la asparagina (103N) y el grupo hidroxilo de la tirosina (Y181). Se cree que esta interacción estabiliza la conformación de la apoenzima y reduce la unión del NNRTI [172].

En el caso de las otras tres mutaciones observadas en los mutantes seleccionados con MIV-150 se plantea que una de ellas, L100, participa en el posicionamiento correcto del NNRTI en el sitio alostérico [173]. El cambio de Leucina a isoleucina pudiera perturbar las interacciones por apilamiento de anillos aromáticos que se producen con los aminoácidos Y181 e Y188 [162,174,175,176]. La mutación en el aminoácido E138 puede interferir en la interacción del NNRTI con el sitio alostérico debido a repulsión de cargas [177]. En el caso particular de la mutación M230L se necesitan más estudios para determinar el mecanismo por el cual este cambio afecta la actividad antiviral de NNRTIs [178].

Estudios similares de desarrollo de resistencia *in vitro* a NNRTIs se han realizado con DPV, microbicida que se encuentra en fase clínica 3 [150]. Los estudios han mostrado la selección de un doble mutante que contiene las mutaciones L100I y E138K. La presencia de la mutación E138K en la selección de resistencia con DPV es un punto importante. Esta misma mutación está implicada en la resistencia viral a dos NNRTIs de última generación ETR y RPV lo cual no sorprende debido a la relación estructural entre DPV, ETR y RPV [99,179,180].

En conclusión, el VIH puede desarrollar resistencia viral a NNRTIs y quizá la mejor forma de emplear estos compuestos en fórmulas microbicidas sea en combinación con otros agentes anti-VIH. Sin embargo es oportuno señalar que la selección de resistencia viral por aplicación tópica de un antiretroviral, en individuos infectados con VIH, todavía no se ha demostrado. Los NNRTI que están siendo desarrollados como microbicidas se caracterizan por una biodisponibilidad pobre que se traduce en niveles sistémicos nulos o muy bajos. Esto se podría interpretar como una ventaja ya que con los microbicidas se persigue obtener concentraciones antivirales en las mucosas genitales sin necesidad de absorción en el torrente sanguíneo. Esto pudiera minimizar el desarrollo de resistencia viral además de disminuir posibles efectos tóxicos.

Por otra parte, la actividad antiviral de todos los NNRTIs fue evaluada en un sistema *in vitro* utilizando PBMC y 25 cepas virales que incluyen diferentes subtipos y MDR del VIH. Este experimento se realizó para estudiar el amplio espectro de actividad antiviral y perfil de resistencia de cada compuesto. La infección se realiza en PBMC activados a través de un proceso llamado 3x3. Esto se debe a que las células provienen de 3 donantes diferentes, son activadas en 3 medios diferentes: con el anticuerpo OKT3 (anti-CD3), con baja concentración de fitohemaglutinina (0.5 µg/ml) o con alta concentración de fitohemaglutinina (5 µg/ml). Este proceso garantiza la expresión de diferentes factores celulares (como co-receptores del VIH-1) para obtener una población de células susceptibles a la mayoría de los aislamientos del VIH-1 [148].

Los PBMC fueron pre-tratados con los NNRTIs por 1 hora antes de infectar con las distintas cepas de virus y fueron mantenidos en el medio solo por 18 horas luego de la infección. Este procedimiento se empleó para imitar la exposición temporal de los tejidos a los compuestos microbicidas cuando son administrados en forma de gel, y poder comparar los resultados con otros NNRTIs (DPV y UC781) que han sido estudiados de forma similar [165].

La mayoría de los NNRTI (MIV-150, MIV-160, MIV-170, EFV y ETR) mostraron una potente actividad antiviral contra la variedad de aislamientos y clones virales con valores de CE_{50} que fluctúan entre 0,1 y 5 nM. Los valores de CE_{50} se traducen en IS excelentes (entre 20000 y 1000000) teniendo en consideración la baja citotoxicidad en PBMC ($CC_{50} > 100 \mu M$). Entre las cepas virales estudiadas resalta la alta resistencia, a la mayoría de los NNRTIs estudiados, de los aislamientos MDR OL1/4 y W1023892-2. El aislamiento OL1/4 posee la doble mutación K101E y Y181I mientras que W1023892-2 contiene las mutaciones K101E, E138K e Y181C. El papel que juegan las mutaciones E138K y Y181C en la resistencia a NNRTIs ha sido discutido anteriormente. La mutación K101E, por si misma, tiene una prevalencia de 3.8% en ensayos de rutina que detectan resistencia clínica a NNRTIs [6]. Esta mutación incrementa entre 2 y 5 veces los valores de CE_{50} de la mayoría de NNRTIs lo cual representa una resistencia moderada. Las bases estructurales de esta resistencia pueden estar relacionadas con que esta lisina se encuentra en el bolsillo hidrofóbico de la RT e interactúa con algunos NNRTI a través de fuerzas de van der Waals [181] o a través de una red con tres moléculas de H_2O [182]. La mutación K101E produce una inversión de carga en esta posición que hace que el residuo aminoacídico de E se aleje del bolsillo hidrofóbico debido a yuxtaposición de cargas similares [183].

Un dato curioso es el hecho de que mientras OL1/4 muestra resistencia a MIV-150 con la doble mutación (K101E y Y181I), otros mutantes que contienen cambio aminoacídico en una de estas posiciones son susceptibles a este NNRTI. En el caso del clon V177663-5 que contiene las mutaciones K101P y K103N el valor de CE_{50} de MIV-150 es 0,5 nM (tabla 8, página 67). También el mutante resistente a NVP seleccionado en células MT-4, que contiene la mutación simple Y181C, es

completamente susceptible a MIV-150 con una CE_{50} de 0,2 nM (tabla 9, página 69). Estos resultados confirman otros estudios realizados por Medivir donde se observó una alta potencia de MIV-150 a mutantes simples y solo una reducción en la actividad antiviral en presencia de determinadas mutaciones dobles o triples.

Tomados en conjunto los resultados discutidos hasta el momento demuestran que MIV-150 posee una prolongada e irreversible inhibición de la replicación *in vitro* del VIH y retiene esta potente actividad antiviral en transición de pH. MIV-150 tiene un excelente índice selectivo contra una amplia variedad de cepas virales, buen perfil de resistencia y los estudios *in vitro* sugieren que no perturba uno de los microorganismos esenciales de la microflora normal vaginal. Por todas estas razones, y principalmente por el potente efecto memoria que supera al resto de los candidatos, se eligió MIV-150 como el NNRTI a combinar con AZ.

Zinc es un elemento indispensable para todos los organismos y microorganismos. Las funciones biológicas de zinc como factor estructural y funcional incluyen la participación en procesos de transducción de señales, expresión de genes y metabolismo de diferentes biomoléculas [13]. Las sales de zinc suministradas como suplemento alimenticio o con fines de tratar alguna enfermedad han sido aprobadas por la FDA. Uno de los usos de zinc es en el tratamiento de resfríos comunes e infecciones recurrentes de oídos [184,185]. Se ha planteado que el efecto antiviral contra los rinovirus, agente etiológico más frecuente del resfrío común, puede estar relacionado con su actividad antioxidante, antiinflamatoria o la inhibición de la interacción del virus con su receptor ICAM-1 [184]. El medicamento Zicam, un spray nasal para el tratamiento del resfrío común, ha estado vinculado con efectos tóxicos que provocan disfunciones en el olfato [186], sin embargo estos efectos también han sido asociados al uso incorrecto (sobredosis) del medicamento. También se piensa que el mismo efecto tóxico por sobredosis sea la causa de deficiencia de cobre y enfermedad neurológica que se produce por el uso incorrecto de cremas fijadoras de prótesis dentales que contienen zinc [187].

Las sales de zinc también se utilizan en productos para el tratamiento del acné,

acelerar la cicatrización de heridas, tratamiento de la irritación de los ojos, pastas dentales y enjuagues bucales así como ungüentos o supositorios rectales (Xyloprocto) para tratar malestares y prurito. La experiencia en los diferentes usos de productos con zinc le han otorgado la clasificación de generalmente reconocido como seguro (FDA, 2013).

Las sales de zinc han mostrado un amplio espectro de actividad antiviral *in vitro*, no solo contra rinovirus como se describió anteriormente, sino contra otros virus como el VHS-2 y el VIH-1 [7,12]. Se sugiere que la actividad antiviral contra el VIH tenga como mecanismo de acción la interacción con la enzima RT y la subsecuente disminución de la actividad catalítica [12].

Demostrar actividad antiviral de las sales de zinc en ensayos *in vitro* es un desafío. Las sales de zinc, como AZ, precipitan fácilmente en los medios de cultivo y su deposición en las monocapas celulares causa efectos tóxicos que no son vistos en ensayos *in vivo*. La mayoría del Zn^{2+} en el citoplasma se encuentra unido a proteínas, y solo una cantidad excepcionalmente pequeña se encuentra libre [13]. Los incrementos mínimos de Zn^{2+} en el citoplasma, que las células no pueden balancear, resultan en efectos tóxicos que disminuyen la viabilidad celular. Esta es la principal razón de porque no se obtuvieron IS tan altos como los de los NNRTIs cuando se evaluó la actividad antiviral de AZ en PBMC (tabla 8, página 67). Aún así se puede observar que las concentraciones utilizadas para estudiar actividad antiviral coinciden con una viabilidad celular cercana a 100% (figura 6A, página 66). De igual forma en el estudio de la actividad antiviral se encontraron cepas como VIH-1_{97ZA009} que resistieron la actividad antiviral de AZ con un máximo de replicación viral aún en la concentración mayor de AZ estudiada (figura 6C, página 66). Estas dos razones descartan el posible efecto tóxico como responsable de la inhibición viral vista en la figura 6B (página 66).

Un punto interesante fue la necesidad de suministrar AZ en cada cambio de medio que se realiza durante los 7 días del ensayo antiviral para poder obtener una curva de dosis respuesta típica de un proceso de inhibición. Este mismo fenómeno ha sido observado en el modelo de explantes cervico-vaginales (comunicación

personal con la Dr. Teleshova) y en ensayos *in vivo* realizados en monos rhesus macacos [151,156]. El modelo animal ha mostrado que una dosis única de un gel que contiene AZ no reduce significativamente la infección por SHIV-RT como lo hace el suministro de una dosis diaria por 7 días consecutivos antes de inocular los animales con SHIV-RT [188].

Entre las hipótesis que se plantean de su mecanismo de acción antiviral contra VIH-1, está el posible efecto inmunomodulador de AZ como parte de su mecanismo. Esta hipótesis podría explicar la posible necesidad de suministro continuo de AZ para lograr este efecto. Se conoce que zinc juega un papel importante en el sistema inmune. Zinc es crucial para el desarrollo normal y función de células que median la inmunidad innata como es el caso de neutrófilos y células NK [189]. Las deficiencias de zinc también afectan la inmunidad adquirida previniendo la activación de linfocitos T, la producción de citosinas por Th1 y funciones de los linfocitos B que incluye la producción de anticuerpos [189].

En este trabajo se diseñó un experimento para seleccionar cepas resistentes a AZ a través del sub-cultivo de una cepa susceptible a AZ (VIH-1_{92BR014}) en presencia de esta sal de zinc. El objetivo principal de este experimento fue tratar de caracterizar genotípica y fenotípicamente la cepa resistente a AZ para poder acercarme al posible mecanismo de acción de AZ contra el VIH. Teniendo en cuenta la reciente publicación que plantea a RT como el blanco de la acción antiviral de AZ (Fenstermacher y DeStefano, 2011), se secuenció el gen *pol* de las cepas virales aisladas. Se realizó en paralelo la selección de mutantes resistentes a MIV-150 o la combinación de MIV-150 con AZ. Los resultados arrojaron la presencia de las mutaciones K43R y A554S en el gen de la enzima RT, aunque solo A554S fue corroborada en los aislamientos primarios (tabla 8) que mostraron resistencia a AZ. Este resultado concuerda con la hipótesis de la RT viral como blanco de la actividad antiviral de zinc y especialmente apunta hacia el dominio que contiene la ribonucleasa H (52). Actualmente estamos realizando estudios de mutagénesis directa en los laboratorios de Population Council para corroborar que A554S es responsable de la resistencia a AZ.

A su vez, a partir de este estudio, también se aisló un mutante resistente a MIV-150 (V75I, K101E, K103T, Y181C). Se destaca en esta cepa la presencia de una mutación (V75I) no vista antes en los estudios realizados en células MT-4. La mutación V75I no ha sido descrita como una mutación asociada a resistencia contra NNRTIs. Sin embargo ha sido descrita en experimentos de selección de resistencia viral *in vitro* contra el NNRTI HBY097 [190]. La función de esta mutación se piensa esté relacionada con una compensación para aumentar la capacidad replicativa del virus en presencia de mutaciones que debilitan al virus [191].

Uno de los objetivos específicos de esta tesis fue estudiar la combinación del NNRTI más prometedor (MIV-150) con AZ. Se realizó el estudio de la actividad antiviral contra el VIH-1_{92BR014} utilizando cada droga por separado o en combinaciones basadas en los valores de CE₅₀ de cada compuesto. El uso del software Calcsyn nos permitió analizar los resultados de inhibición de la replicación viral y estimar los IC para determinar si la combinación de estos compuestos resulta en antagonismo, sinergia o efecto aditivo. El resultado arrojó valores de IC cercanos a 1 lo cual se corresponde con un efecto aditivo. Este resultado en conjunto con la ausencia de resistencia cruzada entre MIV-150 y AZ y el fallo de aislar un mutante viral resistente en la combinación de MIV-150 y AZ, favorece la formulación de ambos compuestos en un gel microbicida. El beneficio de la combinación de compuestos incluye un incremento en la eficacia y disminución de la dosis a emplear en futuras formulaciones. Esta disminución en la dosis se puede traducir en una disminución del costo y toxicidad, así como menor probabilidad de desarrollo de resistencia viral.

Otro factor que le añade importancia al uso de AZ en nuestra fórmula microbicida es el potencial de inhibir al VHS-2. Varios estudios han sugerido la actividad antiviral *in vitro* e *in vivo* contra cepas de laboratorio y aislamientos primarios del VHS-2. El mecanismo de acción contra VHS-2 se piensa que es virucida, por interacción del zinc con las glicoproteínas virales de la envoltura, lo cual inhibe los pasos tempranos de adsorción y entrada a las células hospederas [192].

Estudios realizados en nuestro laboratorio han demostrado que CG, tiene la capacidad de bloquear la infección vaginal por VHS-2 en ratones [140,193]. Si bien CG no mostró ser eficaz contra el VIH en el ensayo clínico de fase 3, ha mostrado ser un gel seguro y aceptable [16,17,18,19,20,21,22,23,24]. También varios estudios han sugerido una potente actividad antiviral de este polianión contra VPH [25,26,27]. Entre los estudios destaca un análisis en una fracción de voluntarios, de la fase clínica 3 antes mencionada, donde se observó una reducción en la infección por VPH [25]. Todas estas características del gel de CG, además de las propiedades reológicas excelentes, lo convierten en un vehículo ideal para formular compuestos capaces de inhibir ITS.

La tabla 12 (página 72) muestra el profundo efecto sinérgico en la actividad anti-VHS-2 *in vitro* de la combinación de AZ con CG. Un efecto similar fue visto en el modelo animal de ratón donde al emplear una dosis alta de infección (10^6 ufp/ratón) todos los animales fueron infectados en presencia de solo CG o AZ pero un alto porcentaje de los animales fueron protegidos cuando se combinó 3% de CG con más de 0,3% de AZ.

Teniendo estos resultados en consideración, y sabiendo que MIV-150 tiene una CE_{50} contra el VIH-1 de $\sim 0,5$ nM, se formuló un gel de CG con 0,3% de AZ y $50 \mu\text{M}$ de MIV-150 (una concentración 100000 veces mayor que la CE_{50} *in vitro*). Esta dosis óptima de MIV-150 también ha sido avalada por estudios de eficacia en monos macacos rhesus y estudios de estabilidad del gel [151,188,194].

Los primeros estudios realizados con el gel se enfocaron en la seguridad del mismo y es por eso que varios ensayos de toxicidad fueron realizados. El fallo de la primera generación de microbicidas que entraron en estudios clínicos ha estado relacionado en parte, con efectos tóxicos que sugirieron un incremento en el riesgo de adquisición del VIH [53,195,196]. La evaluación *in vitro* de la viabilidad, integridad e inflamación del epitelio genital ha sido de vital ayuda para demostrar las causas del fracaso de los microbicidas de la primera generación [52]. Estudios realizados con excipientes farmacéuticos y microbicidas discontinuados o en

desarrollo han detectado que la viabilidad celular e integridad del epitelio puede comprometerse en presencia de algunas de estas formulaciones [197,198,199]. Adicionalmente se ha detectado la inducción de interleuquina 8 (marcador de respuesta inflamatoria) en presencia de concentraciones de microbicidas que no afectan la viabilidad celular [200]. El sulfato de celulosa fue un candidato a microbicida que fue suspendido luego de entrar en fase clínica 3 y observarse un posible incremento en el riesgo de adquisición del VIH [64,195,201]. Los estudios en nuevos sistemas *in vitro* han detectado que el sulfato de celulosa destruye las uniones estrechas en el epitelio e incrementa la infección por VIH incluso a concentraciones más bajas de las empleadas en los estudios clínicos [202]. Por otra parte, existen estudios que sugieren que los NNRTIs UC-781 y DPV a una concentración de 100 μ M provocan la inducción de IL-8 [200]. Estos NNRTIs han sido formulados en geles que contienen concentraciones mM altas mientras que nuestro gel contiene sólo 50 μ M de MIV-150. A su vez, estudios realizados en explantes cervicovaginales y en monos macacos rhesus no han demostrado inducción de IL-8 por MIV-150, al menos en las dosis que utilizamos en nuestra fórmula [151].

Continuando con los estudios de seguridad, se valoró la capacidad del gel MIV-150/AZ/CG de inducir disrupción del epitelio cervicovaginal o rectal utilizando diferentes ensayos (figura 7, página 70). El ensayo *in vitro* que mide la resistencia eléctrica transepitelial de monocapas de células Caco-2 no mostró ningún efecto negativo, tampoco se observó daños en la arquitectura de la mucosa cervicoepitelial o rectal de ratones tratados con el gel MIV-150/AZ/CG. La ausencia de fracturas en el epitelio y la no exposición de la lámina propia sugieren que el gel es seguro en este modelo.

El ensayo que mide el incremento de la susceptibilidad a la infección por VHS-2 en ratones, también se utilizó como biomarcador para predecir el incremento del riesgo a la infección por VIH. Se realizó la aplicación sucesiva de varias dosis del gel MIV-150/AZ/CG por vía vaginal, antes de infectar con una dosis sub-óptima del VHS-2. No se detectó un incremento en la infección del VHS-2 lo cual pudiera interpretarse como la ausencia de daños que perjudiquen la integridad de la

mucosa vaginal. Tampoco se observó decrecimiento de la viabilidad celular a valores mayores de $1\log_{10}$ cuando se incubaron lactobacilli con el gel diluido (Figura 9, página 73).

Una vez que los ensayos de toxicidad excluyeron efectos negativos que pudieran afectar la seguridad del gel se realizó el estudio de la actividad *in vivo* contra el VHS-2 (figura 10, página 75). También se comprobó la selectividad de la actividad anti-VIH del gel utilizando los ensayos *in vitro* en células TZM-bl (figura 11, página 76) y PBMC (tabla 13, página 77). El gel redujo significativamente la infección vaginal y rectal por VHS-2 en un modelo bastante riguroso. Este modelo utiliza ratones tratados con Depo-Provera para incrementar la susceptibilidad a VHS-2 y además emplea una dosis viral alta (10^6 ufp/ratón) que representa 1000 DL₅₀. La mayoría de los agentes microbicidas con potencial anti-VHS-2 han sido estudiados en el modelo de ratón utilizando inóculos virales que son 10 y hasta 100 veces menores que el empleado en nuestros estudios [83,203]. CG y AZ han demostrado actividad antiviral en este mismo modelo animal pero empleando solo inóculos virales de 10^4 ufp/ratón [140,193,204]. El efecto protector de cada compuesto desaparece al aumentar la dosis del inóculo viral a 10^6 ufp/ratón y solo se logra proteger a los animales de la infección cuando ambos compuestos se combinan. La concentración de VHS-2 en fluidos anogenitales de adultos inmunocompetentes durante episodios de reactivación del virus es entre 10^3 y 10^4 copias de ADN del VHS-2 por ml de fluido [205]. Estos números reflejan las copias de ADN viral y no el número de partículas infecciosas lo cual convierte a nuestro modelo animal en un ensayo riguroso y estricto al emplear un inóculo viral de 10^6 ufp. / ratón.

El gel MIV-150/AZ/CG mostró una actividad antiviral excelente contra la variedad de cepas, aislamientos y clones virales con valores de CE₅₀ entre 0,00006 y 0,0006 (valores basados en la dilución del gel). El promedio de IS, tomando en consideración la baja citotoxicidad en PBMC (CC₅₀ > 0,0166) y los valores de CE₅₀, fue mayor de 300 (tabla 13, página 77). Al igual que en los estudios realizados con los compuestos activos, no formulados, el aislamiento MDR OL1/4 mostró resistencia a la actividad antiviral del gel. Si bien MDR OL1/4 es resistente a la

actividad antiviral de MIV-150 y AZ en nuestro ensayo *in vitro*, todavía está siendo estudiada la capacidad inmunomoduladora *in vivo* de AZ para dominar virus como OL1/4 con resistencia asociada a mutaciones en la enzima RT.

El gel MIV-150/AZ/CG representa una novedosa combinación de microbicidas con actividad antiviral contra VIH-1, VHS-2 y posiblemente VPH. El gel VivaGel es el único microbicida, descrito en la literatura, con semejante espectro antiviral [66]. No obstante al comparar los estudios preclínicos de VivaGel con el gel MIV-150/AZ/CG, es evidente la superior potencia y duración del efecto antiviral de MIV-150/AZ/CG [151].

Aunque no forman parte de los resultados expuestos en esta tesis, también se han realizado estudios paralelos a través de colaboraciones con otros grupos en Population Council que complementan la investigación realizada en este proyecto. Estos estudios incluyen: (i) cómo funcionan los compuestos en sistemas de explantes humanos y de monos, (ii) el bloqueo de la propagación viral de CDs a células T, (iii) formulaciones en geles y anillos vaginales, y (iv) actividad *in vivo* contra SHIV en monos y contra VPH en ratones.

Tomados en conjunto, los resultados expuestos en esta tesis posicionan al gel MIV-150/AZ/CG como un prometedor gel microbicida para la prevención de la transmisión sexual del VIH-1 y VHS-2.

CONCLUSIONES

1. Los NNRTIs estudiados mostraron altos IS contra la mayoría de cepas y aislamientos del VIH-1. MIV-150 tiene el efecto antiviral más prolongado cuando se compara con el resto de los NNRTIs.
2. AZ mostró índices selectivos modestos en su actividad antiviral *in vitro* contra VIH-1.
3. MIV-150, MIV-160, MIV-170 y ETR exhibieron el mejor perfil de resistencia con una potente actividad antiviral contra la mayoría de los aislamientos o clones multiresistentes a drogas.
4. El ensayo de desarrollo de resistencia viral *in vitro* permitió el aislamiento de mutantes dobles o triples contra MIV-150, MIV-160 y MIV-170. En el caso específico de AZ se identificó una mutación novedosa que puede explicar el mecanismo de acción de esta molécula.
5. La combinación de MIV-150 con AZ resultó en un efecto aditivo contra VIH-1 mientras que la combinación de AZ y CG mostró un efecto sinérgico potente contra VHS-2.
6. El gel microbicida MIV-150/AZ/CG es seguro y tiene una actividad anti-VIH-1 y anti-VHS-2 excelente en todos los ensayos *in vitro* e *in vivo* realizados.
7. MIV-150/AZ/CG es una novedosa y prometedora combinación de microbicidas para la prevención de la transmisión sexual del VIH-1 y VHS-2.

RECOMENDACIONES

1. Profundizar, a través de estudios de mutagénesis directa, en el papel que juegan las mutaciones A554S y K43R en la resistencia del VIH-1 al AZ.
2. Estudiar los posibles efectos inmunomoduladores que puede ejercer AZ *in vivo* y que podrían contribuir a la actividad antiviral contra el VIH-1.
3. Completar la evaluación toxicológica del gel microbicida MIV-150/AZ/CG y considerar el inicio de estudios de fase clínica 1.

ANEXOS

ANEXO 1

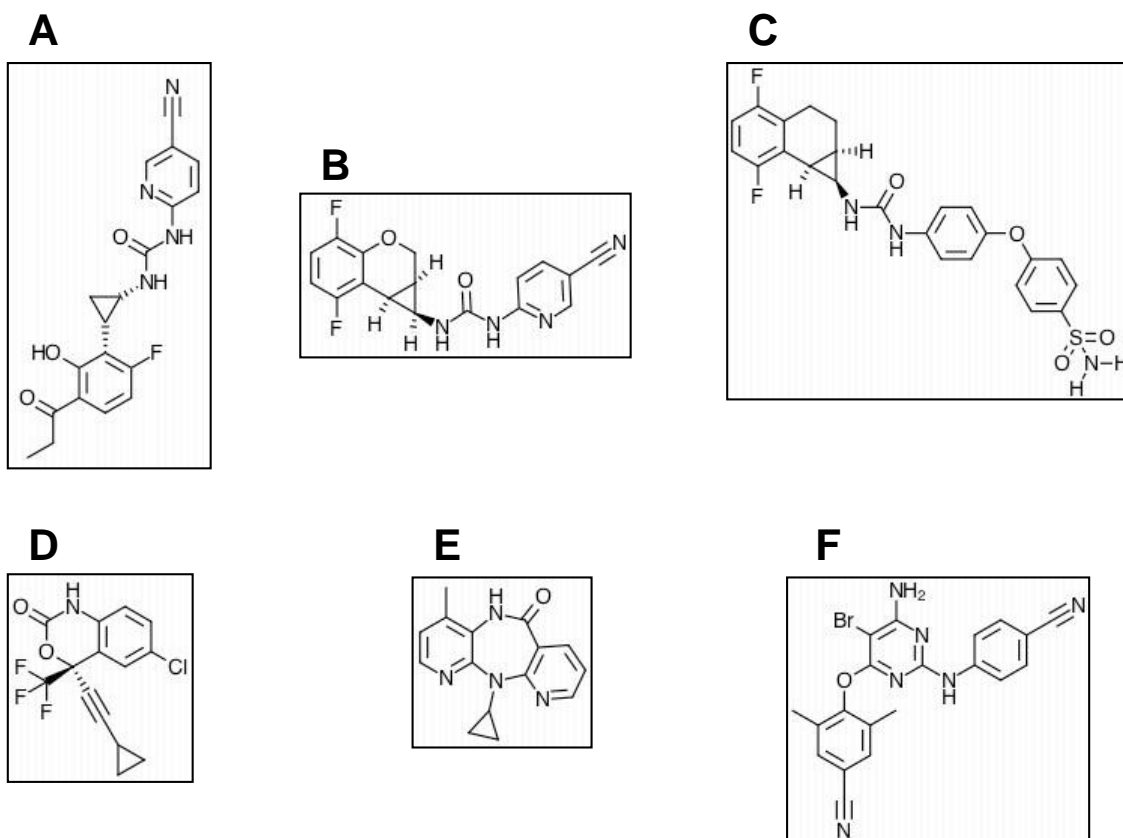
Atributos de los geles evaluados

Propiedades	Geles		
	CG	AZ/CG	MIV-150/AZ/CG
CG	3,0%	3,0%	3,1%
Tampón	Acetato de sodio 10mM	Acetato de sodio 10mM	Acetato de sodio 10mM
MIV-150	N/A	N/A	50 µM
Co-solvente	Propilenglicol 2%	Propilenglicol 2%	Propilenglicol 2%
AZ	N/A	1,4 – 46,7 mM	14 mM
Methyl paraben	0,2%	0,2%	0,2%
pH	6,6	5,9-7,0	6,9
Osmolality	428 mOsmol/kg	350-500 mOsmol/kg	447 mOsmol/kg
Viscosidad	28800 cP	23500-35000 cP	29900 cP

N/A= No aplicable

ANEXO 2

Estructura química de los NNRTIs evaluados



	NNRTI	Fórmula	Peso Molecular (g/mol)
A	MIV-150	$C_{19}H_{17}FN_4O_3$	368,4
B	MIV-160	$C_{17}H_{12}F_2N_4O_2$	342,3
C	MIV-170	$C_{24}H_{21}F_2N_3O_4S$	485,5
D	EFV	$C_{14}H_9ClF_3NO_2$	315,7
E	NVP	$C_{15}H_{14}N_4O$	266,3
F	ETR	$C_{20}H_{15}BrN_6O$	435,3

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fichorova R (2009) Microbicides: Molecular Strategies for Prevention of Sexually Transmitted Viral Diseases. In: LaFemina R, editor. Antiviral Research Strategies in Antiviral Drug Discovery. Washington, DC: ASM Press. pp. 265-282.
2. Hladik F, Sakchalathorn P, Ballweber L, Lentz G, Fialkow M, et al. (2007) Initial events in establishing vaginal entry and infection by human immunodeficiency virus type-1. *Immunity* 26: 257-270.
3. Bobardt MD, Chatterji U, Selvarajah S, Van der Schueren B, David G, et al. (2007) Cell-free human immunodeficiency virus type 1 transcytosis through primary genital epithelial cells. *Journal of virology* 81: 395-405.
4. Turville SG, Aravantinou M, Stossel H, Romani N, Robbiani M (2008) Resolution of de novo HIV production and trafficking in immature dendritic cells. *Nature methods* 5: 75-85.
5. Rosenberg ZF, Devlin B (2012) Future strategies in microbicide development. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology* 26: 503-513.
6. de Bethune MP (2010) Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs), their discovery, development, and use in the treatment of HIV-1 infection: a review of the last 20 years (1989-2009). *Antiviral research* 85: 75-90.
7. Arens M, Travis S (2000) Zinc salts inactivate clinical isolates of herpes simplex virus in vitro. *Journal of clinical microbiology* 38: 1758-1762.
8. Lazarczyk M, Favre M (2008) Role of Zn²⁺ ions in host-virus interactions. *Journal of virology* 82: 11486-11494.
9. Haraguchi Y, Sakurai H, Hussain S, Anner BM, Hoshino H (1999) Inhibition of HIV-1 infection by zinc group metal compounds. *Antiviral research* 43: 123-133.
10. Geist FC, Bateman JA, Hayden FG (1987) In vitro activity of zinc salts against human rhinoviruses. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 31: 622-624.

11. Fernández-Romero JA, Abraham CJ, Rodriguez A, Kizima L, Jean-Pierre N, et al. (2012) Zinc acetate/carrageenan gels exhibit potent activity in vivo against high-dose herpes simplex virus 2 vaginal and rectal challenge. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 56: 358-368.
12. Fenstermacher KJ, DeStefano JJ (2011) Mechanism of HIV reverse transcriptase inhibition by zinc: formation of a highly stable enzyme-(primer-template) complex with profoundly diminished catalytic activity. *The Journal of biological chemistry* 286: 40433-40442.
13. Berg JM, Shi Y (1996) The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc. *Science* 271: 1081-1085.
14. Hirano T, Murakami M, Fukada T, Nishida K, Yamasaki S, et al. (2008) Roles of zinc and zinc signaling in immunity: zinc as an intracellular signaling molecule. *Advances in immunology* 97: 149-176.
15. Hoogenraad TU, Van den Hamer CJ, Van Hattum J (1984) Effective treatment of Wilson's disease with oral zinc sulphate: two case reports. *British medical journal* 289: 273-276.
16. Whitehead SJ, McLean C, Chaikummao S, Braunstein S, Utaivoravit W, et al. (2011) Acceptability of Carraguard vaginal microbicide gel among HIV-infected women in Chiang Rai, Thailand. *PloS one* 6: e14831.
17. Martin S, Blanchard K, Manopaiboon C, Chaikummao S, Schaffer K, et al. (2010) Carraguard acceptability among men and women in a couples study in Thailand. *Journal of women's health* 19: 1561-1567.
18. McLean CA, van de Wijgert JH, Jones HE, Karon JM, McNicoll JM, et al. (2010) HIV genital shedding and safety of Carraguard use by HIV-infected women: a crossover trial in Thailand. *AIDS* 24: 717-722.
19. Skoler-Karpoff S, Ramjee G, Ahmed K, Altini L, Plagianos MG, et al. (2008) Efficacy of Carraguard for prevention of HIV infection in women in South Africa: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 372: 1977-1987.

20. Kilmarx PH, Blanchard K, Chaikummao S, Friedland BA, Srivirojana N, et al. (2008) A randomized, placebo-controlled trial to assess the safety and acceptability of use of carraguard vaginal gel by heterosexual couples in Thailand. *Sexually transmitted diseases* 35: 226-232.
21. van de Wijgert JH, Braunstein SL, Morar NS, Jones HE, Madurai L, et al. (2007) Carraguard Vaginal Gel Safety in HIV-Positive Women and Men in South Africa. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* 46: 538-546.
22. Ramjee G, Morar NS, Braunstein S, Friedland B, Jones H, et al. (2007) Acceptability of Carraguard, a candidate microbicide and methyl cellulose placebo vaginal gels among HIV-positive women and men in Durban, South Africa. *AIDS research and therapy* 4: 20.
23. Whitehead SJ, Kilmarx PH, Blanchard K, Manopaiboon C, Chaikummao S, et al. (2006) Acceptability of Carraguard vaginal gel use among Thai couples. *AIDS* 20: 2141-2148.
24. Kilmarx PH, van de Wijgert JH, Chaikummao S, Jones HE, Limpakarnjanarat K, et al. (2006) Safety and acceptability of the candidate microbicide Carraguard in Thai Women: findings from a Phase II Clinical Trial. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* 43: 327-334.
25. Marais D, Gawarecki D, Allan B, Ahmed K, Altini L, et al. (2011) The effectiveness of Carraguard, a vaginal microbicide, in protecting women against high-risk human papillomavirus infection. *Antiviral therapy* 16: 1219-1226.
26. Buck CB, Thompson CD, Roberts JN, Muller M, Lowy DR, et al. (2006) Carrageenan is a potent inhibitor of papillomavirus infection. *PLoS pathogens* 2: e69.
27. Roberts JN, Buck CB, Thompson CD, Kines R, Bernardo M, et al. (2007) Genital transmission of HPV in a mouse model is potentiated by nonoxynol-9 and inhibited by carrageenan. *Nature medicine* 13: 857-861.
28. Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, et al. (1981) *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy

homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *The New England journal of medicine* 305: 1425-1431.

29. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, et al. (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220: 868-871.

30. Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, et al. (1984) Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 224: 500-503.

31. CDC (1985) Acquired immunodeficiency syndrome: meeting of the WHO Collaborating Centres on AIDS. *MMWR Morbidity and mortality weekly report* 34: 678-679.

32. Kuritzkes D, Walter B (2007) HIV-1 Pathogenesis, Clinical Manifestations and Treatments. In: Knipe D, Howley P, editors. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins. pp. 2187-2214.

33. Fox J, Fidler S (2010) Sexual transmission of HIV-1. *Antiviral research* 85: 276-285.

34. Freed E, Martin M (2007) HIVs and Their Replication. In: Knipe D, Howley P, editors. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins. pp. 2107-2186.

35. Arthos J, Cicala C, Martinelli E, Macleod K, Van Ryk D, et al. (2008) HIV-1 envelope protein binds to and signals through integrin $\alpha 4\beta 7$, the gut mucosal homing receptor for peripheral T cells. *Nature immunology* 9: 301-309.

36. Lederman MM, Offord RE, Hartley O (2006) Microbicides and other topical strategies to prevent vaginal transmission of HIV. *Nature reviews Immunology* 6: 371-382.

37. Gray RH, Wawer MJ, Brookmeyer R, Sewankambo NK, Serwadda D, et al. (2001) Probability of HIV-1 transmission per coital act in monogamous,

- heterosexual, HIV-1-discordant couples in Rakai, Uganda. *Lancet* 357: 1149-1153.
38. Munch J, Rucker E, Standker L, Adermann K, Goffinet C, et al. (2007) Semen-derived amyloid fibrils drastically enhance HIV infection. *Cell* 131: 1059-1071.
39. Wawer MJ, Sewankambo NK, Serwadda D, Quinn TC, Paxton LA, et al. (1999) Control of sexually transmitted diseases for AIDS prevention in Uganda: a randomised community trial. Rakai Project Study Group. *Lancet* 353: 525-535.
40. Nahmias AJ, Dowdle WR (1968) Antigenic and biologic differences in herpesvirus hominis. *Progress in medical virology Fortschritte der medizinischen Virusforschung Progres en virologie medicale* 10: 110-159.
41. Roizman B, Knipe D, Whitley R (2007) Herpes Simplex Viruses. In: Knipe D, Howley P, editors. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins. pp. 2501-2602.
42. Gupta R, Warren T, Wald A (2007) Genital herpes. *Lancet* 370: 2127-2137.
43. Freeman EE, Weiss HA, Glynn JR, Cross PL, Whitworth JA, et al. (2006) Herpes simplex virus 2 infection increases HIV acquisition in men and women: systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *AIDS* 20: 73-83.
44. Barnabas RV, Celum C (2012) Infectious co-factors in HIV-1 transmission herpes simplex virus type-2 and HIV-1: new insights and interventions. *Current HIV research* 10: 228-237.
45. Sartori E, Calistri A, Salata C, Del Vecchio C, Palu G, et al. (2011) Herpes simplex virus type 2 infection increases human immunodeficiency virus type 1 entry into human primary macrophages. *Virology journal* 8: 166.
46. Martinelli E, Tharinger H, Frank I, Arthos J, Piatak M, Jr., et al. (2011) HSV-2 infection of dendritic cells amplifies a highly susceptible HIV-1 cell target. *PLoS pathogens* 7: e1002109.
47. Baeten JM, Strick LB, Lucchetti A, Whittington WL, Sanchez J, et al. (2008) Herpes simplex virus (HSV)-suppressive therapy decreases plasma and genital

HIV-1 levels in HSV-2/HIV-1 coinfecting women: a randomized, placebo-controlled, cross-over trial. *The Journal of infectious diseases* 198: 1804-1808.

48. Zuckerman RA, Lucchetti A, Whittington WL, Sanchez J, Coombs RW, et al. (2009) HSV suppression reduces seminal HIV-1 levels in HIV-1/HSV-2 co-infected men who have sex with men. *AIDS* 23: 479-483.

49. Perti T, Saracino M, Baeten JM, Johnston C, Diem K, et al. (2013) High-Dose Valacyclovir Decreases Plasma HIV-1 RNA More Than Standard-Dose Acyclovir in Persons Coinfected with HIV-1 and HSV-2: A Randomized Crossover Trial. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* 63: 201-208.

50. Zuckerman RA, Lucchetti A, Whittington WL, Sanchez J, Coombs RW, et al. (2007) Herpes simplex virus (HSV) suppression with valacyclovir reduces rectal and blood plasma HIV-1 levels in HIV-1/HSV-2-seropositive men: a randomized, double-blind, placebo-controlled crossover trial. *The Journal of infectious diseases* 196: 1500-1508.

51. Houlihan CF, Larke NL, Watson-Jones D, Smith-McCune KK, Shiboski S, et al. (2012) Human papillomavirus infection and increased risk of HIV acquisition. A systematic review and meta-analysis. *AIDS* 26: 2211-2222.

52. Romano JW, Robbiani M, Doncel GF, Moench T (2012) Non-specific microbicide product development: then and now. *Current HIV research* 10: 9-18.

53. Hillier SL, Moench T, Shattock R, Black R, Reichelderfer P, et al. (2005) In vitro and in vivo: the story of nonoxynol 9. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* 39: 1-8.

54. Wilkinson D, Tholandi M, Ramjee G, Rutherford GW (2002) Nonoxynol-9 spermicide for prevention of vaginally acquired HIV and other sexually transmitted infections: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials including more than 5000 women. *The Lancet infectious diseases* 2: 613-617.

55. Feldblum PJ, Adeiga A, Bakare R, Wevill S, Lendvay A, et al. (2008) SAVVY vaginal gel (C31G) for prevention of HIV infection: a randomized controlled trial in

Nigeria. PloS one 3: e1474.

56. Fichorova RN, Bajpai M, Chandra N, Hsiu JG, Spangler M, et al. (2004) Interleukin (IL)-1, IL-6, and IL-8 predict mucosal toxicity of vaginal microbicide contraceptives. *Biology of reproduction* 71: 761-769.

57. Scordi-Bello IA, Mosoian A, He C, Chen Y, Cheng Y, et al. (2005) Candidate sulfonated and sulfated topical microbicides: comparison of anti-human immunodeficiency virus activities and mechanisms of action. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49: 3607-3615.

58. Shaunak S, Thornton M, Teo I, Chandler B, Jones M, et al. (2003) Optimisation of the degree of sulfation of a polymer based construct to block the entry of HIV-1 into cells. *Journal of drug targeting* 11: 443-448.

59. Fletcher PS, Wallace GS, Mesquita PM, Shattock RJ (2006) Candidate polyanion microbicides inhibit HIV-1 infection and dissemination pathways in human cervical explants. *Retrovirology* 3: 46.

60. Briggs DR, Tuttle DL, Sleasman JW, Goodenow MM (2000) Envelope V3 amino acid sequence predicts HIV-1 phenotype (co-receptor usage and tropism for macrophages). *AIDS* 14: 2937-2939.

61. Swanstrom R, Coffin J (2012) HIV-1 pathogenesis: the virus. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2: a007443.

62. Herold BC, Mesquita PM, Madan RP, Keller MJ (2011) Female genital tract secretions and semen impact the development of microbicides for the prevention of HIV and other sexually transmitted infections. *American journal of reproductive immunology* 65: 325-333.

63. Keller MJ, Mesquita PM, Torres NM, Cho S, Shust G, et al. (2010) Postcoital bioavailability and antiviral activity of 0.5% PRO 2000 gel: implications for future microbicide clinical trials. *PloS one* 5: e8781.

64. Segarra TJ, Fakioglu E, Cheshenko N, Wilson SS, Mesquita PM, et al. (2011) Bridging the gap between preclinical and clinical microbicide trials: blind evaluation

of candidate gels in murine models of efficacy and safety. *PloS one* 6: e27675.

65. McCormack S, Ramjee G, Kamali A, Rees H, Crook AM, et al. (2010) PRO2000 vaginal gel for prevention of HIV-1 infection (Microbicides Development Programme 301): a phase 3, randomised, double-blind, parallel-group trial. *Lancet* 376: 1329-1337.

66. Rupp R, Rosenthal SL, Stanberry LR (2007) VivaGel (SPL7013 Gel): a candidate dendrimer--microbicide for the prevention of HIV and HSV infection. *International journal of nanomedicine* 2: 561-566.

67. Abdool Karim SS, Richardson BA, Ramjee G, Hoffman IF, Chirenje ZM, et al. (2011) Safety and effectiveness of BufferGel and 0.5% PRO2000 gel for the prevention of HIV infection in women. *AIDS* 25: 957-966.

68. Veazey RS, Shattock RJ, Pope M, Kirijan JC, Jones J, et al. (2003) Prevention of virus transmission to macaque monkeys by a vaginally applied monoclonal antibody to HIV-1 gp120. *Nature medicine* 9: 343-346.

69. Sexton A, Harman S, Shattock RJ, Ma JK (2009) Design, expression, and characterization of a multivalent, combination HIV microbicide. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23: 3590-3600.

70. Rademacher T, Sack M, Arcalis E, Stadlmann J, Balzer S, et al. (2008) Recombinant antibody 2G12 produced in maize endosperm efficiently neutralizes HIV-1 and contains predominantly single-GlcNAc N-glycans. *Plant biotechnology journal* 6: 189-201.

71. Murga JD, Franti M, Pevear DC, Maddon PJ, Olson WC (2006) Potent antiviral synergy between monoclonal antibody and small-molecule CCR5 inhibitors of human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 50: 3289-3296.

72. Tsai CC, Emau P, Jiang Y, Agy MB, Shattock RJ, et al. (2004) Cyanovirin-N inhibits AIDS virus infections in vaginal transmission models. *AIDS research and*

human retroviruses 20: 11-18.

73. Tsai CC, Emau P, Jiang Y, Tian B, Morton WR, et al. (2003) Cyanovirin-N gel as a topical microbicide prevents rectal transmission of SHIV89.6P in macaques. *AIDS research and human retroviruses* 19: 535-541.

74. O'Keefe BR, Vojdani F, Buffa V, Shattock RJ, Montefiori DC, et al. (2009) Scaleable manufacture of HIV-1 entry inhibitor griffithsin and validation of its safety and efficacy as a topical microbicide component. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 6099-6104.

75. Nixon B, Stefanidou M, Mesquita PM, Fakioglu E, Segarra T, et al. (2013) Griffithsin Protects Mice from Genital Herpes by Preventing Cell-to-Cell Spread. *Journal of virology* 87: 6257-6269.

76. Liu S, Wu S, Jiang S (2007) HIV entry inhibitors targeting gp41: from polypeptides to small-molecule compounds. *Current pharmaceutical design* 13: 143-162.

77. Veazey RS, Ketas TA, Klasse PJ, Davison DK, Singletary M, et al. (2008) Tropism-independent protection of macaques against vaginal transmission of three SHIVs by the HIV-1 fusion inhibitor T-1249. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 10531-10536.

78. Veazey RS, Klasse PJ, Schader SM, Hu Q, Ketas TJ, et al. (2005) Protection of macaques from vaginal SHIV challenge by vaginally delivered inhibitors of virus-cell fusion. *Nature* 438: 99-102.

79. Kish-Catalone T, Pal R, Parrish J, Rose N, Hocker L, et al. (2007) Evaluation of -2 RANTES vaginal microbicide formulations in a nonhuman primate simian/human immunodeficiency virus (SHIV) challenge model. *AIDS research and human retroviruses* 23: 33-42.

80. Leonard JT, Roy K (2006) The HIV entry inhibitors revisited. *Current medicinal chemistry* 13: 911-934.

81. Cihlar T, Ray AS (2010) Nucleoside and nucleotide HIV reverse transcriptase

inhibitors: 25 years after zidovudine. *Antiviral research* 85: 39-58.

82. Abdool Karim Q, Abdool Karim SS, Frohlich JA, Grobler AC, Baxter C, et al. (2010) Effectiveness and safety of tenofovir gel, an antiretroviral microbicide, for the prevention of HIV infection in women. *Science* 329: 1168-1174.

83. Andrei G, Lisco A, Vanpouille C, Introini A, Balestra E, et al. (2011) Topical tenofovir, a microbicide effective against HIV, inhibits herpes simplex virus-2 replication. *Cell host & microbe* 10: 379-389.

84. Celum C, Baeten JM (2012) Tenofovir-based pre-exposure prophylaxis for HIV prevention: evolving evidence. *Current opinion in infectious diseases* 25: 51-57.

85. Van Damme L, Corneli A, Ahmed K, Agot K, Lombaard J, et al. (2012) Preexposure prophylaxis for HIV infection among African women. *The New England journal of medicine* 367: 411-422.

86. van der Straten A, Van Damme L, Haberer JE, Bangsberg DR (2012) Unraveling the divergent results of pre-exposure prophylaxis trials for HIV prevention. *AIDS* 26: F13-19.

87. De Clercq E (1999) Perspectives of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) in the therapy of HIV-1 infection. *Farmaco* 54: 26-45.

88. Hopkins AL, Ren J, Tanaka H, Baba M, Okamoto M, et al. (1999) Design of MKC-442 (emivirine) analogues with improved activity against drug-resistant HIV mutants. *Journal of medicinal chemistry* 42: 4500-4505.

89. Skoog MT, Hargrave KD, Miglietta JJ, Kopp EB, Merluzzi VJ (1992) Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase and virus replication by a non-nucleoside dipyridodiazepinone BI-RG-587 (Nevirapine). *Medicinal research reviews* 12: 27-40.

90. Kilby JM, Saag MS (1996) Clinical experience with non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors: L-697,661 and nevirapine. *Advances in experimental medicine and biology* 394: 291-298.

91. Dueweke TJ, Poppe SM, Romero DL, Swaney SM, So AG, et al. (1993) U-

90152, a potent inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 replication. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 37: 1127-1131.

92. Alvarez R, Jimeno ML, Gago F, Balzarini J, Perez-Perez MJ, et al. (1998) Novel 3'-spiro nucleoside analogues of TSAO-T. Part II. A comparative study based on NMR conformational analysis in solution and theoretical calculations. *Antiviral chemistry & chemotherapy* 9: 333-340.

93. Pauwels R, Andries K, Debyser Z, Van Daele P, Schols D, et al. (1993) Potent and highly selective human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) inhibition by a series of alpha-anilinophenylacetamide derivatives targeted at HIV-1 reverse transcriptase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 1711-1715.

94. Zhang H, Vrang L, Backbro K, Lind P, Sahlberg C, et al. (1995) Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 wild-type and mutant reverse transcriptases by the phenyl ethyl thiazolyl thiourea derivatives trovirdine and MSC-127. *Antiviral research* 28: 331-342.

95. Balzarini J, Pelemans H, Aquaro S, Perno CF, Witvrouw M, et al. (1996) Highly favorable antiviral activity and resistance profile of the novel thiocarboxanilide pentenyloxy ether derivatives UC-781 and UC-82 as inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 replication. *Molecular pharmacology* 50: 394-401.

96. Kleim JP, Bender R, Kirsch R, Meichsner C, Paessens A, et al. (1995) Preclinical evaluation of HBY 097, a new nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 replication. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 39: 2253-2257.

97. el Dareer SM, Tillery KF, Rose LM, Posey CF, Struck RF, et al. (1993) Metabolism and disposition of a thiazolobenzimidazole active against human immunodeficiency virus-1. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 21: 231-235.

98. Prajapati DG, Ramajayam R, Yadav MR, Giridhar R (2009) The search for potent, small molecule NNRTIs: A review. *Bioorganic & medicinal chemistry* 17:

5744-5762.

99. Silvestri R, Artico M, Bruno B, Massa S, Novellino E, et al. (1998) Synthesis and biological evaluation of 5H-indolo [3,2-b][1,5]benzothiazepine derivatives, designed as conformationally constrained analogues of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase inhibitor L-737,126. *Antiviral chemistry & chemotherapy* 9: 139-148.

100. Buckheit RW, Jr., Fliakas-Boltz V, Decker WD, Roberson JL, Pyle CA, et al. (1994) Biological and biochemical anti-HIV activity of the benzothiadiazine class of nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Antiviral research* 25: 43-56.

101. Corbett JW, Rodgers JD (2002) Discovery of second generation quinazolinone non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors of HIV-1. *Progress in medicinal chemistry* 40: 63-105.

102. Adkins JC, Noble S (1998) Efavirenz. *Drugs* 56: 1055-1064; discussion 1065-1056.

103. Xu ZQ, Flavin MT, Jenta TR (2000) Calanolides, the naturally occurring anti-HIV agents. *Current opinion in drug discovery & development* 3: 155-166.

104. D'Cruz OJ, Uckun FM (2006) Novel tight binding PETT, HEPT and DABO-based non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* 21: 329-350.

105. Chen X, Zhan P, Li D, De Clercq E, Liu X (2011) Recent advances in DAPYs and related analogues as HIV-1 NNRTIs. *Current medicinal chemistry* 18: 359-376.

106. Croxtall JD (2012) Etravirine: a review of its use in the management of treatment-experienced patients with HIV-1 infection. *Drugs* 72: 847-869.

107. Sharma M, Saravolatz LD (2013) Rilpivirine: a new non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 68: 250-256.

108. Ren J, Stammers DK (2008) Structural basis for drug resistance mechanisms for non-nucleoside inhibitors of HIV reverse transcriptase. *Virus research* 134: 157-

170.

109. Motakis D, Parniak MA (2002) A tight-binding mode of inhibition is essential for anti-human immunodeficiency virus type 1 virucidal activity of nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 46: 1851-1856.

110. van 't Klooster G, Hoeben E, Borghys H, Looszova A, Bouche MP, et al. (2010) Pharmacokinetics and disposition of rilpivirine (TMC278) nanosuspension as a long-acting injectable antiretroviral formulation. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54: 2042-2050.

111. Delelis O, Carayon K, Saib A, Deprez E, Mouscadet JF (2008) Integrase and integration: biochemical activities of HIV-1 integrase. *Retrovirology* 5: 114.

112. Hicks C, Gulick RM (2009) Raltegravir: the first HIV type 1 integrase inhibitor. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 48: 931-939.

113. Karmon SL, Markowitz M (2013) Next-generation integrase inhibitors : where to after raltegravir? *Drugs* 73: 213-228.

114. Liu X, Lagenaur LA, Simpson DA, Essenmacher KP, Frazier-Parker CL, et al. (2006) Engineered vaginal lactobacillus strain for mucosal delivery of the human immunodeficiency virus inhibitor cyanovirin-N. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 50: 3250-3259.

115. Pusch O, Kalyanaraman R, Tucker LD, Wells JM, Ramratnam B, et al. (2006) An anti-HIV microbicide engineered in commensal bacteria: secretion of HIV-1 fusion inhibitors by lactobacilli. *AIDS* 20: 1917-1922.

116. Szajewska H (2007) Probiotics and prebiotics in pediatrics: where are we now? *The Turkish journal of pediatrics* 49: 231-244.

117. Doncel GF, Clark MR (2010) Preclinical evaluation of anti-HIV microbicide products: New models and biomarkers. *Antiviral research* 88 Suppl 1: S10-18.

118. Malcolm RK, Woolfson AD, Toner CF, Morrow RJ, McCullagh SD (2005) Long-term, controlled release of the HIV microbicide TMC120 from silicone elastomer vaginal rings. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 56: 954-956.
119. Rohan LC, Moncla BJ, Kunjara Na Ayudhya RP, Cost M, Huang Y, et al. (2010) In vitro and ex vivo testing of tenofovir shows it is effective as an HIV-1 microbicide. *PLoS one* 5: e9310.
120. Ashley R (1995) Herpes simplex viruses. In: Schmidt N, Emmons R, editors. *Diagnostic procedures for viral, rickettsial, and chlamydial infections*. 7th ed. Washington, DC: American Public Health Association. pp. 375-395.
121. Menendez-Arias L (2002) Molecular basis of fidelity of DNA synthesis and nucleotide specificity of retroviral reverse transcriptases. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* 71: 91-147.
122. Meyerhans A, Cheynier R, Albert J, Seth M, Kwok S, et al. (1989) Temporal fluctuations in HIV quasispecies in vivo are not reflected by sequential HIV isolations. *Cell* 58: 901-910.
123. Maltez F, Doroana M, Branco T, Valente C (2011) Recent advances in antiretroviral treatment and prevention in HIV-infected patients. *Current opinion in HIV and AIDS* 6 Suppl 1: S21-30.
124. Patton DL, Sweeney YT, Paul KJ (2009) A summary of preclinical topical microbicide rectal safety and efficacy evaluations in a pigtailed macaque model. *Sexually transmitted diseases* 36: 350-356.
125. Patton DL, Cosgrove Sweeney YT, Paul KJ (2008) A summary of preclinical topical microbicide vaginal safety and chlamydial efficacy evaluations in a pigtailed macaque model. *Sexually transmitted diseases* 35: 889-897.
126. Adams JL, Kashuba AD (2012) Formulation, pharmacokinetics and pharmacodynamics of topical microbicides. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology* 26: 451-462.
127. Richardson-Harman N, Mauck C, McGowan I, Anton P (2012) Dose-response

relationship between tissue concentrations of UC781 and explant infectibility with HIV type 1 in the RMP-01 rectal safety study. *AIDS research and human retroviruses* 28: 1422-1433.

128. Catalone BJ, Kish-Catalone TM, Budgeon LR, Neely EB, Ferguson M, et al. (2004) Mouse model of cervicovaginal toxicity and inflammation for preclinical evaluation of topical vaginal microbicides. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48: 1837-1847.

129. D'Cruz OJ, Erbeck D, Uckun FM (2005) A study of the potential of the pig as a model for the vaginal irritancy of benzalkonium chloride in comparison to the nonirritant microbicide PHI-443 and the spermicide vanadocene dithiocarbamate. *Toxicologic pathology* 33: 465-476.

130. Eckstein P, Jackson MC, Millman N, Sobrero AJ (1969) Comparison of vaginal tolerance tests of spermicidal preparations in rabbits and monkeys. *Journal of reproduction and fertility* 20: 85-93.

131. Wilson SS, Cheshenko N, Fakioglu E, Mesquita PM, Keller MJ, et al. (2009) Susceptibility to genital herpes as a biomarker predictive of increased HIV risk: expansion of a murine model of microbicide safety. *Antiviral therapy* 14: 1113-1124.

132. Garcia-Lerma JG, Heneine W (2012) Animal models of antiretroviral prophylaxis for HIV prevention. *Current opinion in HIV and AIDS* 7: 505-513.

133. Veazey RS, Shattock RJ, Klasse PJ, Moore JP (2012) Animal models for microbicide studies. *Current HIV research* 10: 79-87.

134. Subbarao S, Otten RA, Ramos A, Kim C, Jackson E, et al. (2006) Chemoprophylaxis with tenofovir disoproxil fumarate provided partial protection against infection with simian human immunodeficiency virus in macaques given multiple virus challenges. *The Journal of infectious diseases* 194: 904-911.

135. Garcia-Lerma JG, Otten RA, Qari SH, Jackson E, Cong ME, et al. (2008) Prevention of rectal SHIV transmission in macaques by daily or intermittent prophylaxis with emtricitabine and tenofovir. *PLoS medicine* 5: e28.

136. Parikh UM, Dobard C, Sharma S, Cong ME, Jia H, et al. (2009) Complete protection from repeated vaginal simian-human immunodeficiency virus exposures in macaques by a topical gel containing tenofovir alone or with emtricitabine. *Journal of virology* 83: 10358-10365.
137. Denton PW, Garcia JV (2012) Mucosal HIV-1 transmission and prevention strategies in BLT humanized mice. *Trends in microbiology* 20: 268-274.
138. Denton PW, Othieno F, Martinez-Torres F, Zou W, Krisko JF, et al. (2011) One percent tenofovir applied topically to humanized BLT mice and used according to the CAPRISA 004 experimental design demonstrates partial protection from vaginal HIV infection, validating the BLT model for evaluation of new microbicide candidates. *Journal of virology* 85: 7582-7593.
139. Phillips DM, Zacharopoulos VR (1998) Nonoxynol-9 enhances rectal infection by herpes simplex virus in mice. *Contraception* 57: 341-348.
140. Zacharopoulos VR, Phillips DM (1997) Vaginal formulations of carrageenan protect mice from herpes simplex virus infection. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 4: 465-468.
141. Bright H, Perez DL, Christy C, Cockle P, Eyles JE, et al. (2012) The efficacy of HSV-2 vaccines based on gD and gB is enhanced by the addition of ICP27. *Vaccine* 30: 7529-7535.
142. Bournsnel ME, Entwisle C, Blakeley D, Roberts C, Duncan IA, et al. (1997) A genetically inactivated herpes simplex virus type 2 (HSV-2) vaccine provides effective protection against primary and recurrent HSV-2 disease. *The Journal of infectious diseases* 175: 16-25.
143. Yim KC, Carroll CJ, Tuyama A, Cheshenko N, Carlucci MJ, et al. (2005) The cotton rat provides a novel model to study genital herpes infection and to evaluate preventive strategies. *Journal of virology* 79: 14632-14639.
144. Meignier B, Jourdir TM, Norrild B, Pereira L, Roizman B (1987) Immunization of experimental animals with reconstituted glycoprotein mixtures of herpes simplex

virus 1 and 2: protection against challenge with virulent virus. *The Journal of infectious diseases* 155: 921-930.

145. Crostarosa F, Aravantinou M, Akpogheneta OJ, Jasny E, Shaw A, et al. (2009) A macaque model to study vaginal HSV-2/immunodeficiency virus co-infection and the impact of HSV-2 on microbicide efficacy. *PloS one* 4: e8060.

146. Fernández-Romero JA, Thorn M, Turville SG, Titchen K, Sudol K, et al. (2007) Carrageenan/MIV-150 (PC-815), a combination microbicide. *Sexually transmitted diseases* 34: 9-14.

147. Lackman-Smith C, Osterling C, Luckenbaugh K, Mankowski M, Snyder B, et al. (2008) Development of a comprehensive human immunodeficiency virus type 1 screening algorithm for discovery and preclinical testing of topical microbicides. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 52: 1768-1781.

148. Trkola A, Matthews J, Gordon C, Ketas T, Moore JP (1999) A cell line-based neutralization assay for primary human immunodeficiency virus type 1 isolates that use either the CCR5 or the CXCR4 coreceptor. *Journal of virology* 73: 8966-8974.

149. Reed L, Muench H (1938) A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Epidemiol* 27: 493-497.

150. Schader SM, Oliveira M, Ibanescu RI, Moisi D, Colby-Germinario SP, et al. (2012) In vitro resistance profile of the candidate HIV-1 microbicide drug dapivirine. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 56: 751-756.

151. Kenney J, Aravantinou M, Singer R, Hsu M, Rodriguez A, et al. (2011) An antiretroviral/zinc combination gel provides 24 hours of complete protection against vaginal SHIV infection in macaques. *PloS one* 6: e15835.

152. Chou TC (2006) Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological reviews* 58: 621-681.

153. Moncla BJ, Pryke K, Rohan LC, Yang H (2012) Testing of viscous anti-HIV

- microbicides using *Lactobacillus*. *Journal of microbiological methods* 88: 292-296.
154. National (2010) *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Washington, DC: National Academies Press.
155. Code (2001) *Animal Welfare Act and Regulation* chapter 1, subchapter A: animals and animal products. Beltsville, MD: U.S. Department of Agriculture.
156. Kenney J, Rodriguez A, Kizima L, Seidor S, Menon R, et al. (2013) A Potential Non-ARV Microbicide -- A Modified Zinc Acetate Gel is Safe and Effective Against SHIV-RT and HSV-2 infection In Vivo. *Antimicrobial agents and chemotherapy*.
157. Kohlstaedt LA, Wang J, Friedman JM, Rice PA, Steitz TA (1992) Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* 256: 1783-1790.
158. Huang H, Chopra R, Verdine GL, Harrison SC (1998) Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance. *Science* 282: 1669-1675.
159. Smerdon SJ, Jager J, Wang J, Kohlstaedt LA, Chirino AJ, et al. (1994) Structure of the binding site for nonnucleoside inhibitors of the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 3911-3915.
160. Esnouf R, Ren J, Ross C, Jones Y, Stammers D, et al. (1995) Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by non-nucleoside inhibitors. *Nature structural biology* 2: 303-308.
161. Rodgers DW, Gamblin SJ, Harris BA, Ray S, Culp JS, et al. (1995) The structure of unliganded reverse transcriptase from the human immunodeficiency virus type 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 1222-1226.
162. Das K, Sarafianos SG, Clark AD, Jr., Boyer PL, Hughes SH, et al. (2007) Crystal structures of clinically relevant Lys103Asn/Tyr181Cys double mutant HIV-1 reverse transcriptase in complexes with ATP and non-nucleoside inhibitor HBY 097.

Journal of molecular biology 365: 77-89.

163. Spence RA, Kati WM, Anderson KS, Johnson KA (1995) Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by nonnucleoside inhibitors. *Science* 267: 988-993.

164. Xia Q, Radzio J, Anderson KS, Sluis-Cremer N (2007) Probing nonnucleoside inhibitor-induced active-site distortion in HIV-1 reverse transcriptase by transient kinetic analyses. *Protein science : a publication of the Protein Society* 16: 1728-1737.

165. Van Herrewege Y, Michiels J, Van Roey J, Fransen K, Kestens L, et al. (2004) In vitro evaluation of nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors UC-781 and TMC120-R147681 as human immunodeficiency virus microbicides. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48: 337-339.

166. Fletcher P, Harman S, Azijn H, Armanasco N, Manlow P, et al. (2009) Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 infection by the candidate microbicide dapivirine, a nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53: 487-495.

167. Neurath AR, Strick N, Li YY (2006) Role of seminal plasma in the anti-HIV-1 activity of candidate microbicides. *BMC infectious diseases* 6: 150.

168. Hillier SL (1998) The vaginal microbial ecosystem and resistance to HIV. *AIDS research and human retroviruses* 14 Suppl 1: S17-21.

169. Milinkovic A, Martinez E (2004) Nevirapine in the treatment of HIV. *Expert review of anti-infective therapy* 2: 367-373.

170. Maggiolo F (2009) Efavirenz: a decade of clinical experience in the treatment of HIV. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 64: 910-928.

171. Esnouf RM, Ren J, Hopkins AL, Ross CK, Jones EY, et al. (1997) Unique features in the structure of the complex between HIV-1 reverse transcriptase and the bis(heteroaryl)piperazine (BHAP) U-90152 explain resistance mutations for this nonnucleoside inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

United States of America 94: 3984-3989.

172. Maga G, Amacker M, Ruel N, Hubscher U, Spadari S (1997) Resistance to nevirapine of HIV-1 reverse transcriptase mutants: loss of stabilizing interactions and thermodynamic or steric barriers are induced by different single amino acid substitutions. *Journal of molecular biology* 274: 738-747.

173. Ren J, Nichols CE, Chamberlain PP, Weaver KL, Short SA, et al. (2004) Crystal structures of HIV-1 reverse transcriptases mutated at codons 100, 106 and 108 and mechanisms of resistance to non-nucleoside inhibitors. *Journal of molecular biology* 336: 569-578.

174. Das K, Ding J, Hsiou Y, Clark AD, Jr., Moereels H, et al. (1996) Crystal structures of 8-Cl and 9-Cl TIBO complexed with wild-type HIV-1 RT and 8-Cl TIBO complexed with the Tyr181Cys HIV-1 RT drug-resistant mutant. *Journal of molecular biology* 264: 1085-1100.

175. Hsiou Y, Das K, Ding J, Clark AD, Jr., Kleim JP, et al. (1998) Structures of Tyr188Leu mutant and wild-type HIV-1 reverse transcriptase complexed with the non-nucleoside inhibitor HBY 097: inhibitor flexibility is a useful design feature for reducing drug resistance. *Journal of molecular biology* 284: 313-323.

176. Ren J, Nichols C, Bird L, Chamberlain P, Weaver K, et al. (2001) Structural mechanisms of drug resistance for mutations at codons 181 and 188 in HIV-1 reverse transcriptase and the improved resilience of second generation non-nucleoside inhibitors. *Journal of molecular biology* 312: 795-805.

177. Sluis-Cremer N, Dmitrienko GI, Balzarini J, Camarasa MJ, Parniak MA (2000) Human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase dimer destabilization by 1-[Spiro[4"-amino-2",2" -dioxo-1",2" -oxathiole-5",3'-[2', 5'-bis-O-(tert-butyl(dimethylsilyl)-beta-D-ribofuranosyl)]]]-3-ethylthymine. *Biochemistry* 39: 1427-1433.

178. Xu HT, Quan Y, Schader SM, Oliveira M, Bar-Magen T, et al. (2010) The M230L nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance mutation in HIV-1 reverse transcriptase impairs enzymatic function and viral replicative capacity.

Antimicrobial agents and chemotherapy 54: 2401-2408.

179. Althaus IW, Chou KC, Lemay RJ, Franks KM, Deibel MR, et al. (1996) The benzylthio-pyrimidine U-31,355, a potent inhibitor of HIV-1 reverse transcriptase. *Biochemical pharmacology* 51: 743-750.

180. Barth B, Dierich M, Heinisch G, Matuszczak B, Mereiter K, et al. (1996) *Pyridazines* 79. Novel oxazolo[3',2':1,2]pyrrolo[3,4-d]pyridazines and imidazolo[1'2':1,2]pyrrolo[3,4-d]pyridazines: synthesis and biological evaluation. *Archiv der Pharmazie* 329: 403-407.

181. Ren J, Esnouf RM, Hopkins AL, Warren J, Balzarini J, et al. (1998) Crystal structures of HIV-1 reverse transcriptase in complex with carboxanilide derivatives. *Biochemistry* 37: 14394-14403.

182. Ren J, Esnouf R, Garman E, Somers D, Ross C, et al. (1995) High resolution structures of HIV-1 RT from four RT-inhibitor complexes. *Nature structural biology* 2: 293-302.

183. Ren J, Nichols CE, Stamp A, Chamberlain PP, Ferris R, et al. (2006) Structural insights into mechanisms of non-nucleoside drug resistance for HIV-1 reverse transcriptases mutated at codons 101 or 138. *The FEBS journal* 273: 3850-3860.

184. Hulisz D (2004) Efficacy of zinc against common cold viruses: an overview. *Journal of the American Pharmacists Association : JAPhA* 44: 594-603.

185. Hotz C (2007) Dietary indicators for assessing the adequacy of population zinc intakes. *Food and nutrition bulletin* 28: S430-453.

186. Lim JH, Davis GE, Wang Z, Li V, Wu Y, et al. (2009) Zicam-induced damage to mouse and human nasal tissue. *PloS one* 4: e7647.

187. Nations SP, Boyer PJ, Love LA, Burritt MF, Butz JA, et al. (2008) Denture cream: an unusual source of excess zinc, leading to hypocupremia and neurologic disease. *Neurology* 71: 639-643.

188. Kenney J, Singer R, Derby N, Aravantinou M, Abraham CJ, et al. (2012) A

single dose of a MIV-150/Zinc acetate gel provides 24 h of protection against vaginal simian human immunodeficiency virus reverse transcriptase infection, with more limited protection rectally 8-24 h after gel use. *AIDS research and human retroviruses* 28: 1476-1484.

189. Shankar AH, Prasad AS (1998) Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *The American journal of clinical nutrition* 68: 447S-463S.

190. Kleim JP, Rosner M, Winkler I, Paessens A, Kirsch R, et al. (1996) Selective pressure of a quinoxaline nonnucleoside inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase (RT) on HIV-1 replication results in the emergence of nucleoside RT-inhibitor-specific (RT Leu-74-->Val or Ile and Val-75-->Leu or Ile) HIV-1 mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 34-38.

191. Boyer PL, Gao HQ, Hughes SH (1998) A mutation at position 190 of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase interacts with mutations at positions 74 and 75 via the template primer. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 42: 447-452.

192. Kumel G, Schrader S, Zentgraf H, Daus H, Brendel M (1990) The mechanism of the antiherpetic activity of zinc sulphate. *The Journal of general virology* 71 (Pt 12): 2989-2997.

193. Maguire RA, Zacharopoulos VR, Phillips DM (1998) Carrageenan-based nonoxynol-9 spermicides for prevention of sexually transmitted infections. *Sexually transmitted diseases* 25: 494-500.

194. Turville SG, Aravantinou M, Miller T, Kenney J, Teitelbaum A, et al. (2008) Efficacy of Carraguard-based microbicides in vivo despite variable in vitro activity. *PloS one* 3: e3162.

195. Ravel J, Gajer P, Fu L, Mauck CK, Koenig SS, et al. (2012) Twice-daily application of HIV microbicides alter the vaginal microbiota. *mBio* 3.

196. Stafford MK, Ward H, Flanagan A, Rosenstein IJ, Taylor-Robinson D, et al. (1998) Safety study of nonoxynol-9 as a vaginal microbicide: evidence of adverse effects. *Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology : official publication of the International Retrovirology Association* 17: 327-331.
197. Moench TR, Mumper RJ, Hoen TE, Sun M, Cone RA (2010) Microbicide excipients can greatly increase susceptibility to genital herpes transmission in the mouse. *BMC infectious diseases* 10: 331.
198. Cone RA, Hoen T, Wong X, Abusuwwa R, Anderson DJ, et al. (2006) Vaginal microbicides: detecting toxicities in vivo that paradoxically increase pathogen transmission. *BMC infectious diseases* 6: 90.
199. Phillips DM, Sudol KM, Taylor CL, Guichard L, Elsen R, et al. (2004) Lubricants containing N-9 may enhance rectal transmission of HIV and other STIs. *Contraception* 70: 107-110.
200. Gali Y, Delezay O, Brouwers J, Addad N, Augustijns P, et al. (2010) In vitro evaluation of viability, integrity, and inflammation in genital epithelia upon exposure to pharmaceutical excipients and candidate microbicides. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54: 5105-5114.
201. Van Damme L, Govinden R, Mirembe FM, Guedou F, Solomon S, et al. (2008) Lack of effectiveness of cellulose sulfate gel for the prevention of vaginal HIV transmission. *The New England journal of medicine* 359: 463-472.
202. Mesquita PM, Cheshenko N, Wilson SS, Mhatre M, Guzman E, et al. (2009) Disruption of tight junctions by cellulose sulfate facilitates HIV infection: model of microbicide safety. *The Journal of infectious diseases* 200: 599-608.
203. Bernstein DI, Stanberry LR, Sacks S, Ayisi NK, Gong YH, et al. (2003) Evaluations of unformulated and formulated dendrimer-based microbicide candidates in mouse and guinea pig models of genital herpes. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 47: 3784-3788.
204. Tennican P, Carl G, Frey J, Thies C, Chvapil M (1980) Topical zinc in the treatment of mice infected intravaginally with herpes genitalis virus. *Proceedings of*

the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine 164: 593-597.

205. Tronstein E, Johnston C, Huang ML, Selke S, Magaret A, et al. (2011) Genital shedding of herpes simplex virus among symptomatic and asymptomatic persons with HSV-2 infection. JAMA : the journal of the American Medical Association 305: 1441-1449.