



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO
**FORMULACIONES MICROBICIDAS
VAGINALES PARA LA PREVENCIÓN DE LA
TRANSMISIÓN DEL SIDA**

Autor: Cepeda Jorge, Carla

Tutor: Ruiz Caro, Roberto

Convocatoria: Febrero 2018

RESUMEN

El VIH/SIDA es una de las enfermedades más devastadoras del mundo debido a su rápida propagación y su creciente tasa de morbilidad. Su incidencia es mayor en los países más desfavorecidos. Las actuales estrategias preventivas no son suficientes para frenar el contagio del VIH, por ello se requiere el desarrollo de nuevas medidas profilácticas. En el África subsahariana casi el 60% de las personas infectadas con VIH son mujeres. Durante más de 25 años, las mujeres han reclamado opciones de prevención que pudieran iniciar bajo decisión propia, fáciles de usar, indetectables durante el sexo y preferiblemente con actividad tanto antiviral como anticonceptiva.

Los microbicidas son productos médicos que se están desarrollando para proteger a las personas de la infección por VIH. Los microbicidas podrían adoptar diferentes formas farmacéuticas; los primeros evaluados fueron formulados como geles de aplicación diaria o previa a la relación sexual, películas y anillos vaginales de uso mensual. Sin embargo, el futuro de los microbicidas vaginales incluirá el uso de formas de dosificación alternativas, como nanosistemas para la liberación de fármacos y probióticos.

INTRODUCCIÓN

Cada día más de 1 millón de personas contraen una enfermedad de transmisión sexual (ETS). Entre los más de 30 virus, bacterias y parásitos que se transmiten por contacto sexual, 8 se han vinculado a la máxima incidencia de enfermedades de transmisión sexual. De esas 8 infecciones, 4 son actualmente curables, como la sífilis, gonorrea, clamidiasis y tricomoniasis. La hepatitis B, virus del herpes simple (VHS), VIH y virus del papiloma humano (VPH) son infecciones virales incurables, aunque existen tratamientos capaces de atenuar los síntomas de la enfermedad.

Las ETS se transmiten fundamentalmente por contacto sexual, incluidos el sexo vaginal, anal y oral, aunque también por transfusiones de sangre o de madre a hijo durante el embarazo o el parto.

Una persona puede padecer una ETS sin manifestar síntomas de enfermedad. Los síntomas clínicos más comunes son anomalías en el flujo vaginal, secreción uretral o ardor en los hombres, úlceras genitales y dolor abdominal.⁽¹⁾

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ayuda a los Estados Miembros en la promoción y desarrollo de políticas y prácticas basadas en los derechos humanos para el control y la prevención de las ETS. Cabe destacar que, según la OMS, las ETS y sus complicaciones se encuentran entre las

cinco principales enfermedades de los países en desarrollo, lo que obliga a los pacientes a buscar asistencia sanitaria.

Nuevos datos recopilados por la OMS ponen de manifiesto que el VIH continúa siendo uno de los mayores problemas para la salud pública mundial. En África sigue siendo la principal causa de defunción ya que en la actualidad más de 35 millones de personas han muerto por VIH. Por tanto, hoy en día, el SIDA se considera una pandemia.⁽²⁾

En 2016, un millón de personas fallecieron en el mundo por causas relacionadas con este virus. A finales de año había aproximadamente 36,7 millones de personas infectadas por el VIH en el mundo, y se produjeron 1,8 millones de nuevas infecciones. De acuerdo con los datos recogidos en 2016 por la OMS, África es el continente más afectado ya que allí se registran casi dos tercios de las nuevas infecciones por el VIH en el mundo.

Según las estimaciones, solo el 70% de las personas infectadas por el VIH conocen su estado serológico. Para alcanzar el objetivo fijado del 90%, otros 7,5 millones de personas necesitan acceder a servicios de diagnóstico de esta infección. A mediados de 2017, 20,9 millones de personas infectadas por el VIH estaban en programas de tratamiento antirretroviral (TAR).

Entre 2000 y 2016, el número de nuevas infecciones por el VIH se redujo en un 39% y 13,1 millones de vidas se salvaron gracias a campañas de concienciación realizadas por los programas nacionales de lucha contra el VIH.⁽³⁾

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) infecta a las células del sistema inmunitario, alterando o anulando su función. La infección produce una debilidad progresiva del sistema inmunitario, con la consiguiente "inmunodeficiencia". Se considera que el sistema inmunitario es deficiente cuando no puede cumplir su función de combatir las infecciones y enfermedades. El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) es un término que se aplica a los estadios más avanzados de la infección por VIH y se define por la presencia de alguna de las más de 20 infecciones oportunistas o de cánceres relacionados con el VIH.⁽⁴⁾

La primoinfección por el VIH es sintomática en más de la mitad de los casos, pero puede pasar desapercibida ya que sus síntomas son los de una viremia común (fiebre, adenopatías, mialgias, exantema, sudoración nocturna y artralgias). Existen dos serotipos del VIH (VIH-1 y VIH-2), cuya principal diferencia a nivel funcional radica en que en el VIH-2 el número de virus circulantes en el organismo es menor, por lo que es de evolución más lenta y su periodo de incubación es más largo. El VIH-2 es responsable de la endemia de África Oriental mientras que el VIH-1 es el causante de la

epidemia a nivel mundial.⁽⁴⁾ A pesar de ello, ambos serotipos acaban causando el SIDA que se corresponde a la etapa más avanzada de la infección. En este momento es cuando aparecerían las llamadas infecciones oportunistas, infecciones que en un individuo inmunocompetente no causarían problema, pero en el caso de un individuo seropositivo, su evolución podría causar la muerte del mismo. Clínicamente, se considera que un paciente tiene SIDA cuando el recuento de linfocitos T CD4⁺ es menor de 200 mm³ o cuando existe una inmunodeficiencia evidenciada por la presencia de una enfermedad grave que amenaza la vida del paciente.

Es posible inhibir el VIH mediante tratamientos en los que se combinan tres o más fármacos antirretrovirales. Aunque el TAR no cura la infección, frena la replicación del virus en el organismo y permite que el sistema inmunitario recupere la capacidad para combatir las infecciones.

En 2016, la OMS publicó la segunda edición de sus directrices sobre el uso de los antirretrovirales en el tratamiento y la prevención de la infección por el VIH. En ellas se recomienda proporcionar TAR a todas las personas infectadas y durante toda su vida, incluidos los niños, adolescentes y adultos, y las mujeres embarazadas y que amamantan, con independencia de su estado clínico y de su recuento de CD4⁺. Hasta julio de 2017 habían adoptado esta recomendación 122 países, que abarcan el 90% de las personas infectadas por el virus.

La OMS está ayudando a los países a agilizar sus esfuerzos para diagnosticar y tratar a tiempo a estos grupos poblacionales vulnerables. La ampliación del acceso al tratamiento constituye una parte fundamental de una nueva serie de metas para 2020 que tienen por objetivo poner fin a la epidemia de SIDA en 2030.⁽³⁾

El objetivo del TAR es reducir la carga vírica a niveles indetectables para recuperar la inmunocompetencia y evitar el contagio; así como retrasar la progresión clínica, reducir los costes y aumentar la supervivencia del paciente infectado.

Los fármacos antirretrovirales se pueden clasificar en función del momento del ciclo viral en que ejercen su acción. De este modo encontramos:

- Inhibidores de la entrada o de la fusión (IE): Enfuvirtide o Maraviroc
- Inhibidores de la transcriptasa inversa, que a su vez pueden ser:
 - Análogos de nucleótidos/nucleósidos (ITIAN)→ Tenofovir, Adefovir, Zidovudina, Didanosina, Estavudina, Emtricitabina, Abacavir o Lamivudina
 - No análogos de nucleótidos/nucleósidos (ITINAN)→ Dapivirina, Efavirenz, Rilpivirina, Nevirapina o Etravirina

- Inhibidores de la proteasa (IP/r): Ritonavir o Darunavir
- Inhibidores de la integrasa (INI): Dolutegravir o Raltegravir

El inicio del TAR debe valorarse siempre individualmente; en infecciones agudas de manera inmediata, y en el resto de pacientes debe iniciarse lo antes posible, ya que es cuando se puede conseguir el máximo beneficio inmunológico (alcanzar más de 900 linfocitos CD4+/ μ L). Las pautas recomendadas en el momento actual consisten en una combinación de tres fármacos que incluyan dos ITIAN asociado a un INI, o un ITINAN, o un IP potenciado. ⁽⁵⁾

Es crucial decidir el momento en que cada persona debe iniciar el tratamiento, ya que una vez iniciado el TAR debe ser mantenido en el tiempo.

Los últimos datos recogidos por el Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA (ONUSIDA) demuestran que la meta de acabar con la epidemia de SIDA está cada vez más cerca, a través de la eliminación de la transmisión del VIH y las muertes relacionadas con la infección. A lo largo de la última década, se han logrado avances significativos, pero siguen existiendo retos importantes, por lo que es necesario establecer medidas específicas. ⁽⁶⁾ Para ello, se necesita un nuevo objetivo para 2020 que guíe la acción más allá de 2015.

La importancia de acelerar el acceso al diagnóstico, tratamiento y supresión viral llevó al Programa de ONUSIDA a llevar a cabo los objetivos del VIH 90-90-90, un plan ambicioso pero posible de alcanzar:

- Que en 2020 el 90% de las personas que viven con el VIH conozcan su estado serológico respecto al VIH.
- Que en 2020 el 90% de las personas diagnosticadas con el VIH reciban terapia antirretroviral continuada.
- Que en 2020 el 90% de las personas que reciben terapia antirretroviral tengan supresión viral. ⁽⁷⁾

No obstante, el estigma y la discriminación, la violencia contra las mujeres y las niñas, y la existencia de leyes injustas dificultan los esfuerzos para lograr los objetivos 90-90-90.

Uno de los objetivos establecidos por las Naciones Unidas es abordar el problema que existe entre las mujeres y las niñas en los países de ingresos bajos en cuanto a la protección contra el VIH. Se ha observado que la transmisión del VIH de un hombre a una mujer es muy alta. Esto es debido a que los métodos actuales de prevención de ETS, como la abstinencia, los preservativos y la monogamia,

son con frecuencia ineficaces y están fuera del control de las mujeres, pues muchos hombres se niegan a usar el preservativo o las mujeres no pueden negociar su uso con sus parejas masculinas. Es por ello que, hoy en día, las mujeres representan una proporción creciente entre las personas que adquieren el VIH. Los datos de VIH reflejan que, por ejemplo, entre la juventud del África subsahariana de entre 15 y 24 años, por aproximadamente cada tres mujeres seropositivas sólo un varón está infectado.

El desafío clave para reducir el riesgo de VIH en las mujeres es identificar y actuar sobre las vías que vinculan el entorno de riesgo caracterizado por la pobreza de países en vías de desarrollo y la desigualdad de género: falta de acceso a la educación y a la sanidad, la protección social y la violencia de género.

Los expertos creen que si las mujeres tuvieran la opción de usar microbicidas de administración vaginal para protegerse del VIH, sus vidas cambiarían radicalmente. Los microbicidas son reconocidos como un método prometedor y la faceta más importante de dichos productos es que podrían ser controlados por mujeres. En este trabajo trataremos los nuevos avances en formas farmacéuticas vaginales para que la mujer no tenga que depender de su pareja sexual para protegerse de la infección, ya que podrían aplicárselo antes de la relación sexual sin necesidad de la cooperación del hombre.⁽⁸⁾

Un microbicida vaginal se define como un agente químico incluido en una formulación tópica destinada a la prevención de la transmisión de patógenos de tipo sexual, ya sea mediante la inactivación de los mecanismos del patógeno, la formación de una barrera física o la mejora de los mecanismos de protección natural de la vagina y del cuello uterino.⁽⁹⁾

Actualmente existen diferentes formas farmacéuticas en las que se pueden administrar principios activos antirretrovirales. Estudiaremos en orden cronológico las primeras formulaciones evaluadas (geles, anillos vaginales, comprimidos y películas o *films* vaginales) seguidas de las más novedosas aún en investigación, presentando cada una de estas formulaciones ventajas y limitaciones específicas.

Por consiguiente, el descubrimiento de un microbicida vaginal eficaz, seguro, de fácil fabricación, económico, estable en diferentes condiciones ambientales, y de cómoda administración para la mujer, supondría un progreso importante y una estrategia de profilaxis pre-exposición tópica que brindaría mayor capacidad a la mujer para participar en la lucha contra la infección por el VIH.⁽¹⁰⁾

OBJETIVOS

En esta revisión se ha recopilado toda la información relevante a la que se tiene acceso actualmente para dar a conocer las diferentes formas farmacéuticas vaginales que pueden utilizarse como medida preventiva eficaz y segura y con las que las mujeres puedan protegerse del contagio de VIH en casos en que no tengan la suficiente autoridad para imponerse a sus parejas sexuales.

Se van a analizar los múltiples microbicidas que hoy en día se encuentran en etapas de investigación y los avances y modificaciones sufridas durante su desarrollo.

METODOLOGÍA

Para realizar este trabajo bibliográfico se consultaron varias bases de datos electrónicas donde se puede acceder a una gran cantidad de artículos de investigación: PubMed, Google Scholar así como libros científicos o webs institucionales. Los términos clave más buscados fueron: VIH, SIDA, microbicidas anti-VIH, vaginal, tópico, profilaxis, geles microbicidas anti-VIH, preventivo. Todas estas búsquedas se hicieron tanto en inglés como en español y se excluyeron artículos publicados antes del 1998 debido a la continua renovación en avances investigados sobre el tema y la multitud de artículos existentes, siendo a partir de dicho año mucho más productiva.

El método fue analizar las diferentes fórmulas farmacéuticas vaginales microbicidas desde las más antiguas y sencillas hasta las más actuales y novedosas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la actualidad diversas formas farmacéuticas están siendo evaluadas en ensayos clínicos, aunque todavía no existen microbicidas anti-VIH aprobados en cuanto al perfil de seguridad y eficacia. Los estudios a gran escala se están llevando a cabo principalmente en África, donde se observan las tasas más altas de VIH.

Para poder analizarlos bien, se van a clasificar según la secuencia de aparición en el tiempo. El mecanismo de acción de cada agente microbicida definirá el sistema de administración vaginal de fármacos más apropiado. ⁽¹¹⁾

1. El primer fracaso: surfactantes en geles

Los surfactantes actúan como virucidas dañando las membranas superficiales que recubren los virus al reducir la tensión superficial, incapacitándolos y previniendo que causen infecciones antes de que el patógeno entre en contacto con la mucosa vaginal. También son conocidos como detergentes.

El agente surfactante **Nonoxynol-9 (N-9)** fue considerado el primer microbicida estudiado en ensayos clínicos. El N-9 ha sido utilizado como espermicida durante décadas, desde antes de que apareciera el VIH, en forma de espumas y geles anticonceptivos y para lubricar condones. En las pruebas de laboratorio, el N-9 desactiva rápida y potentemente el VIH y otras ETS. Debido a ello los investigadores esperaban que el N-9 fuera un gel microbicida eficaz. Sin embargo, investigaciones recientes han encontrado que puede provocar lesiones genitales tales como úlceras vaginales, aumentando así el riesgo de infección por ETS. ⁽¹²⁾

Posteriormente, se estudió el **SAVVY gel[®]**, un microbicida surfactante que se difunde a través del moco cervical más rápidamente que el N-9 y, en concentraciones bajas, no es tan tóxico para las células vaginales. Contiene el surfactante C3G1 al 1%, una mezcla de alquildimetil glicina y óxido de alquildimetil amina, que inhiben la adhesión microbiana. Es un antimicrobiano de amplio espectro a la vez que espermicida y anticonceptivo. SAVVY[®] gel ya no se está estudiando como un microbicida vaginal ya que dos ensayos en fase III en Ghana y en Nigeria fueron interrumpidos en 2005 y 2006 respectivamente porque la incidencia de VIH en estos países era demasiado baja. SAVVY[®] no demostró eficacia, es más, en los ensayos clínicos realizados se observó que en los pacientes tratados con placebo, hubo menos infecciones por VIH que en los tratados con SAVVY gel[®]. Aun así, faltan datos y estudios que nos permitan afirmar que dicho gel favorezca la infección. ⁽¹³⁾

2. Búsqueda de sustancias alternativas: acidificantes, polianiones, anticuerpos monoclonales y fármacos inhibidores de la entrada

Después del fracaso de los surfactantes, las nuevas estrategias para desarrollar microbicidas vaginales se volcaron hacia mecanismos que funcionan impidiendo que el patógeno entre a las células hospedadoras. Las formulaciones más básicas simplemente evitan el contacto entre la superficie de la mucosa vaginal y los patógenos. En este apartado describiremos varias formulaciones en gel con diferentes mecanismos de acción.

Carraguard[®] es un gel microbicida en investigación que contiene carragenano, un polisacárido lineal sulfatado extraído de algas marinas, ampliamente utilizado en la industria farmacéutica por sus propiedades gelificantes, espesantes y conservantes. Los estudios han mostrado su uso seguro en mujeres, pero los ensayos de fase III no han logrado demostrar eficacia contra el VIH. Se formuló en gel de manera que crea un revestimiento sobre la mucosa vaginal y se aplica en la hora previa a las relaciones sexuales. También mostró buena aceptación, 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 ETS. Actualmente, se está valorando utilizar el gel como vehículo.⁽¹⁴⁾

Otro gel ensayado para inhibir la entrada del patógeno, es **BufferGel[®]**, que contiene un agente acidificante, siendo este uno de los candidatos a microbicidas más estudiado. La fórmula consiste en una solución tampón a base de Carbopol[®] 974P capaz de mantener una acidez protectora de la vagina durante el coito, aún en presencia de semen eyaculado. Varios estudios han sugerido que el VIH puede ser inactivado fácilmente a pH < 4. Los estudios en fases clínicas I y II/IIb sugieren que la fórmula es segura para el tejido mucoso, pero ineficaz contra el VIH, no provocando ninguna alteración en la transmisión aunque si presentaba eficacia frente a bacterias causantes de vaginosis.⁽¹⁴⁾

PRO 2000[®] es un gel cuyo principio activo es el polímero sintético naftaleno sulfonato, un polianión con carga negativa capaz de interactuar con las cargas positivas de la glicoproteína viral gp120, impidiendo que ésta reconozca la proteína diana CD4+ de las células inmunes, y por lo tanto, inhibe la fusión del virus y bloquea su entrada en las células. Se ha demostrado actividad antiviral contra el VIH-1 *in vitro* y en modelos animales, y un perfil de seguridad favorable. Sin embargo, aunque los ensayos en mujeres han demostrado una alta adherencia y seguridad, no ha demostrado eficacia ninguna en la prevención de la transmisión sexual del VIH. Actualmente PRO2000[®] está siendo investigado en ensayos clínicos de fase II y III.⁽¹⁵⁾

VivaGel[®] es otro polianión en estudio, cuyo principio activo es el SPL7013, un dendrímero expresamente creado utilizando la nanotecnología para mostrar actividad antiviral contra el VIH, formulado en un gel de Carbopol[®] mucoadhesivo. Ha demostrado actividad antiviral contra el VIH *in vitro* y en animales, un perfil de seguridad favorable y buena tolerancia en animales y humanos. Sin embargo, los ensayos clínicos posteriores revelaron efectos adversos asociados con esta formulación, lo que llevó a su rechazo por ser inseguro para su uso continuado en mujeres.

Existen otras formulaciones microbicidas que incluyen **anticuerpos monoclonales neutralizantes** que reconocen la gp120 del virus uniéndose a ella impidiendo la unión del virus a los linfocitos T CD4+. Algunos ejemplos son los anticuerpos monoclonales 2G12 y PRO-140.⁽¹⁴⁾ Los estudios en animales han demostrado eficacia moderada en la protección frente al VIH, sin embargo se trata de una eficacia dosis-dependiente. La principal desventaja de estas moléculas radica en la necesidad de fórmulas con concentraciones altas de anticuerpos. La tecnología actual no permite la producción de estos anticuerpos a gran escala y con bajo costo, como para que puedan ser utilizados como agentes microbicidas. Uno de los campos de experimentación actual respecto a estos anticuerpos es el que

trata de lograr su expresión en plantas transgénicas, lo que supondría una solución al alto coste que supone ahora mismo su producción.⁽¹⁶⁾

Las lectinas son proteínas, de origen no inmunológico, que también son capaces de unirse a la gp120. La **Cianovirina-N** (CV-N) es una proteína procedente de una cianobacteria con mecanismo de acción parecida a los anticuerpos monoclonales al unirse irreversiblemente a la gp120. Ha demostrado ser eficaz en el bloqueo de VIH-1 en tejidos vivos vaginales, y eficacia *in vivo*, en hembras de macacos. En el estudio, las hembras que recibieron el tratamiento con el gel vaginal de Cianovirina-N no mostraron evidencia de contagio en un 83,3%.⁽¹⁷⁾

La **Grifitsina (GFT)** es una proteína aislada en pequeñas cantidades a partir de un alga roja pero se consiguió su producción a partir de una planta transgénica (*Nicotiana benthamiana*) de forma que se abarató su producción. Mostró efectividad a concentraciones mínimas y capacidad de unirse directamente a las glicoproteínas capsulares del virus bloqueando la transmisión de una célula a otra. La actividad antiviral *in vitro* contra VIS-2 es moderada, pero ha mostrado una potente actividad antiviral en un modelo animal murino.⁽¹⁸⁾

Por último, hay que mencionar el **Maraviroc (MVC)**, un fármaco antirretroviral formulado en gel aprobado para el tratamiento del VIH-1 con tropismo hacia el receptor CCR5 en linfocitos T de adultos. Es otro de los microbicidas que inhiben la entrada, pero además es un antagonista de los receptores CCR5, unas proteínas localizadas en los linfocitos T. El Maraviroc se une a estas células impidiendo que el VIH-1 las infecte y se multiplique.⁽¹⁹⁾ Sin embargo, el principal problema es que el MVC no es activo para todos los pacientes, ya que a veces el virus utiliza el receptor CXCR4 para entrar en las células.

Se han realizado varios estudios para evaluar la eficacia del Maraviroc como microbicida. Uno de los ensayos se hizo en cepas de ratón humanizado con gel vaginal tópico de hidroxietil celulosa con un 2'2% de Maraviroc frente a un grupo placebo, demostrándose que ningún ratón se infectó al exponerlos al virus. En otro ensayo en macacos se logró también la protección completa con el gel de MVC al 3'3%, pero sólo si la concentración de MVC en el fluido vaginal era alta y durante un tiempo máximo de 2 horas. Por tanto, en este segundo estudio, se comprobó que la no infección dependía en gran parte del tiempo transcurrido entre la aplicación y el contacto con el virus. Más tarde se buscó aumentar el tiempo de residencia del gel con una propuesta utilizando silicona de MVC, que en comparación con el gel de hidroxietil celulosa de la misma carga de MVC, lograba concentraciones mayores y más sostenidas en el fluido vaginal.⁽¹⁵⁾

3. Inclusión de Inhibidores de enzimas virales. Primeros resultados positivos

Tras evaluar numerosos compuestos en ensayos clínicos sin demasiado éxito, se cambió el enfoque al estudio de microbicidas que incluyeran fármacos para evitar la replicación del virus.

- a) Inhibidores nucleósidos de la transcriptasa inversa (ITIAN): Fueron los primeros en presentar actividad contra el VIH, y por ello, se están investigando como microbicidas. Dentro de este grupo, el antirretroviral más estudiado es el **Tenofovir (TFV)**, el cual inhibe la transcriptasa inversa impidiendo que el virus se replique. Su uso ha sido aprobado para la administración oral, por lo que si se quieren desarrollar formas farmacéuticas vaginales hay que investigar su eficacia y seguridad para su uso por esta vía. Se sabe que los microbicidas con TFV han demostrado eficacia en animales *in vitro*, además, se han evaluado en ensayos clínicos de Fase III y no han presentado citotoxicidad en mujeres. Esto quiere decir que el TFV no es tóxico para la mucosa vaginal en concentraciones comúnmente usadas como microbicida, siendo bien tolerado y aceptado por ellas.⁽¹⁵⁾

El estudio CAPRISA 004 evaluó la efectividad de un gel de TFV al 1% para prevenir la transmisión del VIH en mujeres sudafricanas. Se descubrió que el gel reduce la infección por VIH en un 39% e incluso en un 54% cuando las mujeres tenían una alta adherencia al tratamiento.⁽²⁰⁾

Tras el éxito de CAPRISA 004, se realizaron otros estudios que reproducían el gel de TFV, descubriendo que se podían conseguir mayores concentraciones por vía vaginal que oral pero que evidenciaban la falta de adherencia, sobre todo en el África subsahariana, como factor clave que podía influir en una menor efectividad del tratamiento microbicida. Así, se puso más énfasis en la importancia de analizar los diferentes parámetros que podían influir en su eficacia. Aun así, desde entonces las formulaciones con TFV se consideran un método rentable y efectivo que puede ser controlado por mujeres para prevenir la transmisión sexual del VIH.⁽²¹⁾

- b) Inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa inversa (ITINAN): Estos son inhibidores no competitivos que se unen a un sitio alostérico en la transcriptasa inversa e inducen cambios conformacionales en la enzima. Como microbicidas se han estudiado varios, incluidos **Dapivirina (DPV)** y **Rilpivirina**. Otros son más específicos al unirse a la retrotranscriptasa del VIH-1, como **MIV-150** (derivado de la fenetilazoliltio urea) y **UC78** (tiocarboxanilida).

Las combinaciones de formas farmacéuticas que incluyen MIV-150 han sido ampliamente investigadas en ensayos con macacos. Anteriormente se dijo que el Carraguard[®] no era eficaz por sí solo, pero podía ser utilizado como vehículo para los fármacos antirretrovirales. El ejemplo de ello es la combinación MIV-150/Carraguard[®] (carragenina) que demostró mayor actividad en asociación que sólo, incluso en presencia de líquido seminal, aunque se descartó su uso en ensayos *in vivo* por el efecto barrera predominante del Carraguard[®]. Otro gel que combinaba MIV-150 y acetato de zinc mostró protección en modelos animales contra el Virus de la Inmunodeficiencia Simia (VIS) durante 24 horas después de la administración vaginal, mejorando la protección lograda cuando el gel contenía solo uno de los agentes. La combinación MIV-150/acetato de zinc/Carraguard[®] (**MZC**) también proporcionaba una protección significativa en macacos con su aplicación pre y poscoital. Los resultados del primer ensayo clínico con gel MZC se han publicado recientemente, lo que demuestra que el gel es seguro y bien tolerado por las mujeres. ⁽²²⁾

Sin embargo, todos los fármacos de esta familia deben ser evaluados en las mujeres en cuanto a efectividad, y especialmente en el uso profiláctico continuo, ya que su principal desventaja es el rápido desarrollo de resistencias.

4. Cambio de tendencia en las formas farmacéuticas de microbicidas en geles. Desarrollo de anillos vaginales

Aunque los resultados obtenidos en los últimos años con geles que contienen inhibidores de la transcriptasa inversa aumentan la esperanza de desarrollar un microbicida que reduzca significativamente la transmisión del VIH, la creación de un microbicida vaginal efectivo también implica conocer las circunstancias de la población del estudio, y en consecuencia, adaptar las estrategias de prevención de la transmisión. Esta es la razón por la cual gran parte del esfuerzo actual se centra en la comprensión de aspectos que rigen la efectividad de los microbicidas, entre los cuales se considera un factor clave la adherencia.⁽²³⁾ Como resultado, se intentan crear formulaciones de liberación sostenida de fármacos antirretrovirales que requieran menos compromiso por parte del usuario y que la aplicación sea menos frecuente para lograr la eficacia del microbicida, como los anillos vaginales. Aunque el costo de estas formulaciones vaginales pueda ser elevado, se vería compensado con la mejora en la adherencia al tratamiento.

Como alternativa se formularon anillos de silicona y poliuretano que contenían Tenofovir disoproxil fumarato (TDF), un profármaco de TFV, que demostró una inhibición de la transcriptasa inversa a concentraciones mucho menores que el TFV en modelos *in vitro* de hembras de macaco. De todos

los monos que estuvieron con administración continua de anillo de TDF, sólo uno de los seis se infectó, mientras que todos los tratados con placebo adquirieron el virus. Este resultado obtenido garantizaba la protección duradera al virus, incluso en exposición repetida.⁽²⁴⁾

Se evaluaron múltiples fármacos antirretrovirales utilizando el anillo vaginal como vehículo microbicida, algunos ejemplos de los más ampliamente estudiados son TFV/Aciclovir, MVC o CMPD167, MIV-150 y DPV.

El fármaco más prometedor en forma de anillo vaginal es la **DPV**. Los ensayos de utilización del anillo en mujeres demostraron buen perfil de seguridad y buena tolerancia, además de liberación controlada de fármaco durante 28 días.

Gracias a estos resultados, el anillo vaginal de DPV llegó a la etapa más alejada de cualquier microbicida que contiene ITINAN, alcanzó la Fase III de ensayos clínicos. Los resultados recientes de un estudio de anillo de matriz de silicona con DPV en mujeres africanas demostraron que reduce la infección por VIH en un 27%, e incluso hasta 37%, excluyendo los datos de los lugares donde la adherencia fue baja.⁽¹⁵⁾

Todo esto lleva a pensar que el anillo vaginal de DPV es una opción factible para la prevención del VIH que merece más estudio, ya que una vez más la adherencia se manifestó como factor clave.

5. Desarrollo de formas de dosificación alternativas

Se han seguido investigando formas farmacéuticas para la creación de microbicidas con la intención de proporcionar un amplio abanico de posibilidades de protección a las mujeres para que seleccionen la que mejor se adapte a sus características. Esta variedad es necesaria porque la eficacia del mismo fármaco antirretroviral varía dependiendo de la forma farmacéutica seleccionada.

- **Comprimidos vaginales:** Tienen la ventaja de ser fáciles y económicos de fabricar a escala industrial, se manejan fácilmente y son estables en diferentes condiciones ambientales. La fabricación de comprimidos de liberación controlada es más interesante para asegurar menos administraciones y favorecer la adhesión al tratamiento. Un ejemplo de esto son los comprimidos hechos a base de polímeros capaces de gelificar en presencia de fluido vaginal. Más tarde también se desarrollaron comprimidos vaginales compuestos por los fármacos antirretrovirales con más éxito en otras formulaciones y la investigación actual está explorando la posibilidad de comprimidos vaginales con TFV de liberación controlada con polímeros mucoadhesivos tales como el carragenano.⁽¹⁵⁾

- **Películas o films vaginales:** Son láminas delgadas de polímeros que se hinchan en agua y que se van disolviendo cuando se colocan en la mucosa vaginal, de manera que se liberaría el principio activo local y progresivamente. Este sistema ofrece una rápida liberación de fármaco, a la vez que un uso discreto, sin pérdida de producto al administrarse, sin necesidad de aplicador y sin interferir con la microflora vaginal. Pero la principal desventaja es que pueden producir irritación durante las relaciones sexuales.⁽²⁵⁾

Los polímeros empleados más frecuentemente en formulaciones mucoadhesivas vaginales son los derivados de celulosa (HPMC, MC, etc) y el polivinil alcohol (PVA). Por otro lado, los plastificantes más usados en la formación del *film* son los polietilenglicoles (PEG). Estos excipientes se emplean con el fin de modular la liberación de agentes microbicidas a nivel vaginal. El resultado de ello, es un *film* transparente y muy flexible para la fácil administración y comodidad para el paciente.

En los últimos años ha crecido el interés por el desarrollo de microbicidas en películas vaginales que incluyen fármacos antirretrovirales. Se incorporan ITIAN, tales como películas de hidroxipropilmetil celulosa (HPMC) que contienen Abacavir. Esta y otras formulaciones similares corroboran la potencia inhibidora de la transmisión del VIH y la no irritación de la vagina. También se han hecho películas con ITINAN, de las cuales DPV es la más estudiada y se siguen haciendo estudios de efectividad de dicha formulación.⁽¹⁵⁾

6. El futuro de los microbicidas. El creciente interés en nanosistemas

En la última década, el estudio y la aplicación de nanopartículas se ha extendido notablemente en la industria y particularmente en la biomedicina, desarrollando la nanotecnología, con gran relevancia por su versatilidad, biodisponibilidad y efectos antimicrobianos.

Estas nanopartículas se pueden crear usando polímeros biodegradables y compatibles y materiales inorgánicos. Gracias a su pequeño tamaño son capaces de internarse en las células y soltar directamente en el citosol el principio activo. También se pueden unir a dianas específicas. El mayor problema es el alto coste que supone la complejidad de los equipos necesarios para obtenerlas.⁽²⁶⁾

Los materiales más utilizados para recubrirlas son la plata y la polivinil pirrolidona (PVP), compuestos que han demostrado una buena adhesión viral. Se han estudiado múltiples opciones de nanopartículas, las más desarrolladas son las que se cargan con fármacos antirretrovirales como el TFV y la DPV. Una vez se ha obtenido un nanogel que puede retener el fármaco durante la carga y

después liberarlo de manera sostenida, es necesario adaptarse a otro conjunto de parámetros para modificar el tiempo de permanencia de las nanopartículas. Por esta razón, se hacen modificaciones en su superficie con el objetivo de mejorar la mucoadhesión, la entrada en las células de la mucosa vaginal y la concentración en el sitio de acción. Se usan formas de dosificación o materiales vulnerables a estímulos sensibles para optimizar la aplicación y el mantenimiento de las nanopartículas en contacto con la mucosa durante más tiempo.

Tras la fabricación de las nanopartículas hay que buscar formas galénicas adecuadas para desarrollar microbicidas vaginales fáciles de usar para las mujeres. Al principio se usaron geles como la forma más común, pero más adelante se evaluó la inclusión de nanopartículas en películas de polímero, aprovechando las ventajas que proporcionaba esta forma. Un ejemplo de esto, son películas de HPC que incorporan nanopartículas cargadas de TFV o Efavirenz.⁽²⁷⁾

Por todas estas razones, a pesar de los pocos microbicidas basados en nanosistemas que existen actualmente para la prevención del VIH, en los próximos años se producirá un auge en la investigación de este campo, ya que las nanopartículas proporcionan una estrategia de administración dirigida y controlada de fármacos en la vagina.

7. Formas de dosificación novedosas: Fibras electrohiladas

Estas nuevas formas farmacéuticas no han sido muy estudiadas hasta la fecha, suponen una alternativa terapéutica que está ganando importancia. Se trata de fibras cargadas de fármaco producidas por *electrospinning*, una técnica que aplica fuerzas electrostáticas para formar fibras poliméricas.⁽²⁸⁾

A diferencia de las nanopartículas, que pueden adentrarse en las células, estas fibras electrohiladas sólo pueden liberar el principio activo si el polímero se va erosionando y degradando hasta que el fármaco incorporado difunde. Pueden proporcionar una protección inmediata al liberarse el principio activo en menos de 15 minutos, incluso menos tiempo si se incluye un agente humectante (como el Tween[®] 20) o protección sostenida si el material utilizado es un polímero que requiere más tiempo en degradarse. Al igual que las nanopartículas requieren una importante inversión financiera para adquirir el equipo necesario para su fabricación.

Algunos ejemplos de fibras electrohiladas son: nanofibras de PVA cargadas con TFV o sobre una base de ácido hialurónico tiolado (para liberar el fármaco solo en presencia de semen) y dispersiones sólidas de MVC con PVP o con polioxido de etileno.

Estos microbicidas en forma de fibras dan la posibilidad de protegerse frente al virus de manera dependiente al coito, administrándose justo antes de la relación sexual; o formulaciones de liberación sostenida independientes del coito, no teniendo que aplicarlo diariamente, lo que supondría un avance terapéutico en términos de adherencia.⁽²⁹⁾

8. **Microorganismos genéticamente modificados: Probióticos microbicidas**

Los probióticos microbicidas poco a poco se van ganando la aceptación, pero su uso es aún controvertido. La idea es provocar la colonización vaginal mediante microorganismos modificados genéticamente capaces de expresar moléculas que inhiben el VIH. Aunque esto supondría una inversión inicial alta, a la larga se compensaría por obtener una protección duradera.

Las bacterias más comunes de la flora vaginal humana son *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Se estudió la cepa de *Lactobacillus jensenii* y se vio que era capaz de colonizar vaginas de ratones y que producía altos niveles de CV-N durante largos periodos de tiempo. La misma cepa se estudió en macacos, demostrándose que su uso no sólo es seguro y no tóxico, sino que también podría tener un impacto beneficioso para el medio vaginal. Aun así todavía se requieren más estudios sobre probióticos microbicidas.⁽³⁰⁾

9. **La ampliación del espectro de microbicidas: combinaciones de fármacos con diferentes mecanismos de acción**

Tras el éxito del tratamiento antirretroviral del VIH combinando varios fármacos, se comenzó a investigar la asociación de varios de ellos con distintos mecanismos de acción que sean liberados al mismo tiempo con el fin de aumentar la eficacia de la protección.

A continuación se detallan los hallazgos de combinaciones estudiadas:

- a) Tenofovir y Dapivirina: La coadministración de ambos fármacos en películas de polímero causó en estudios *ex vivo* una mayor concentración de DPV en el tejido vaginal, mientras que la de TFV no se vio afectada. En el caso de anillos vaginales se ensayaron *in vitro* para ser administrados ambos fármacos durante 30 días.
- b) Dapivirina y Maraviroc: Esta combinación se ha estudiado principalmente para su uso en anillo vaginal. Dado que la DPV había mostrado buenos resultados en anillo, se ensayó asociándolo a diferentes concentraciones de Maraviroc. Los ensayos de Fase I demostraron seguridad y buena tolerancia de estos anillos, incluso obteniendo una mayor concentración de DPV en plasma cuando el anillo contenía ambos fármacos que cuando solo incluye DPV.

- c) Combinaciones alternativas de otras sustancias activas menos frecuentes: Nanopartículas de PLGA cargadas con Raltegravir y Efavirenz, que posteriormente se incluyen en un gel de etilcelulosa termosensible.

Los estudios demuestran que estas combinaciones de antirretrovirales tienen potencial como estrategias de prevención contra la transmisión sexual del virus.

El objetivo final es lograr un microbicida vaginal que sea de acción duradera, seguro, altamente eficiente y económico, con el fin de garantizar la protección de las mujeres frente al contagio del VIH.

CONCLUSIÓN

El VIH/SIDA sigue expandiéndose a nivel mundial y en los últimos años ha tenido un gran impacto en el número de mujeres que padecen la enfermedad. Tras lo expuesto en esta revisión bibliográfica se puede concluir que los microbicidas suponen un método efectivo de prevención y se ha demostrado que presentan una alta aceptabilidad en la población femenina, sin embargo la mayoría de los candidatos a microbicidas aún se encuentran en estudios clínicos, necesitando una mayor evaluación para que su uso en humanos sea seguro y eficaz.

Recientemente, La División sobre el SIDA (DAIDS) del Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas de EEUU (NIAID) ha manifestado que la investigación de microbicidas para prevenir la infección por el VIH ya no es una de sus prioridades. Este hecho es particularmente importante, ya que DAIDS financió más del 80% de la investigación de microbicidas contra el VIH en 2016.

El anillo vaginal con Dapivirina es el dispositivo microbicida cuya investigación se encuentra más avanzada; en menor medida, el gel de Tenofovir. En la actualidad, se está estudiando un anillo con Dapivirina y el principio activo Levonorgestrel para lograr la actividad anticonceptiva además de antiviral durante tres meses, herramienta de mucho mayor calado para las mujeres africanas.

Aunque es posible que los anillos con Dapivirina lleguen a la comercialización en los próximos años, el desarrollo de nuevos anillos con otros fármacos que logren mejoras en la eficacia podría ahora verse amenazado si finalmente DAIDS interrumpe la financiación de los proyectos con microbicidas.

A largo plazo se podrían valorar otro tipo de microbicidas que actualmente están lejos de su aplicación clínica, bien porque se encuentran en fases tempranas de desarrollo, tales como los inhibidores de la proteasa, los productos creados por nanotecnología, las fibras electrohiladas o microorganismos modificados genéticamente; o bien porque han surgido barreras que se deben

superar como el coste elevado, la falta de adherencia o la dificultad para mantener concentraciones sostenidas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sexually transmitted infections. OMS. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs110/es/> [Consultado 8 de enero de 2018]
2. Fauci AS, Folkers GK, Dieffenbach CW. HIV-AIDS: much accomplished, much to do. *Nat Immunol.* 2013; 14(11): 1104-1107.
3. VIH/sida. OMS. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/es/> [Consultado 8 de enero de 2018].
4. Campuzano RV. Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). Universidad nacional autónoma de México. 2016. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/virologia/sida-vih.html> [Consultado 9 de enero de 2018].
5. Documento de consenso de GeSIDA/Plan Nacional sobre el SIDA respecto al tratamiento antirretroviral en adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana. Panel de expertos GeSIDA y Plan Nacional sobre el SIDA. 2012. Disponible en: <http://gesida-seimc.org/wp-content/uploads/2017/02/gesida-guiasclinicas-2017-TAR.pdf> [Consultado 9 de enero de 2018].
6. La prevalencia mundial del VIH se ha estabilizado. OMS. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2007/pr61/es/> [Consultado 9 de enero de 2018].
7. 90-90-90 Un ambicioso objetivo de tratamiento para contribuir al fin de la epidemia de SIDA. UNAIDS. 2016. Disponible en: http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/90_90_90_es.pdf [Consultado 9 de enero de 2018].
8. Montgomery CM. «HIV has a woman's face»: vaginal microbicides and a case of ambiguous failure. *Anthropol Med.* 2015; 22(3): 250-262.
9. The Gap Report. UNAIDS. 2014. Disponible en: http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/UNAIDS_Gap_report_en.pdf [Consultado 9 de enero de 2018].
10. Microbidas para la prevención de VIH. ONUSIDA.1998. Disponible en: <http://www.sidastudi.org/resources/inmagic-img/dd0069.pdf> [Consultado 9 de enero de 2018].
11. Microbidas. The AIDS InfoNet. Disponible en: http://www.aidsinfonet.org/fact_sheets/view/157?lang=spa#_C_MO_ACT_AN_LOS_MICROBIDAS [Consultado 8 de enero de 2018]
12. Wilkinson D, Tholandi M, Ramjee G, Rutherford GW. 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. *Lancet Infect Dis.* 2002; 2(10): 613-617.

13. Feldblum PJ, Adeiga A, Bakare R, Wevill S, Lendvay A, Obadaki F, et al. SAVVY vaginal gel (C31G) for prevention of HIV infection: a randomized controlled trial in Nigeria. *PloS One* 2008; 3(1): e1474.
14. Fernández-Romero JA, Gil PI, Ré V, Robbiani M, Paglini G. Microbidas para la prevención de infecciones de transmisión sexual: estado actual y estrategias para la evaluación preclínica de nuevos candidatos. *Rev. Argent. Microbiol.* 2014; 46(3): 256-268.
15. Notario-Pérez F, Ruiz-Caro R, Veiga-Ochoa M-D. Historical development of vaginal microbidas to prevent sexual transmission of HIV in women: from past failures to future hopes. *Drug Des Devel Ther.* 2017; 11: 1767-1787.
16. Veazey RS, Shattock RJ, Pope M, Kirijan JC, Jones J, Hu Q, et al. Prevention of virus transmission to macaque monkeys by a vaginally applied monoclonal antibody to HIV-1 gp120. *Nat Med.* 2003; 9(3): 343-346.
17. Tsai C-C, Emau P, Jiang Y, Tian B, Morton WR, Gustafson KR, et al. Cyanovirin-N gel as a topical microbicide prevents rectal transmission of SHIV89.6P in macaques. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2003; 19(7): 535-541.
18. O'Keefe BR, Vojdani F, Buffa V, Shattock RJ, Montefiori DC, Bakke J, et al. Scaleable manufacture of HIV-1 entry inhibitor griffithsin and validation of its safety and efficacy as a topical microbicide component. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106(15): 6099-6104.
19. Pre-exposure (PrEP). Cairns G. 2016. Disponible en: <http://www.hivandhepatitis.com/hiv-prevention/hiv-prep/5629-croi-2016-maraviroc-may-work-as-prep-in-a-combination-but-probably-not-alone> [Consultado 9 de enero de 2019].
20. La FDA aplica el trámite de revisión «acelerada» del gel microbicida con Tenofovir. GTt-VIH. 2010. Disponible en: http://gtt-vih.org/actualizate/la_noticia_del_dia/04-11-10 [Consultado 9 de enero de 2018].
21. Abdool-Karim Q, Abdool-Karim SS, Frohlich JA, Grobler AC, Baxter C, Mansoor LE, et al. Effectiveness and safety of Tenofovir gel, an antiretroviral microbicide, for the prevention of HIV infection in women. *Science* 2010; 329(5996): 1168-1174.
22. Singer R, Mawson P, Derby N, Rodriguez A, Kizima L, Menon R, et al. An Intravaginal Ring That Releases the NNRTI MIV-150 Reduces SHIV Transmission in Macaques. *Sci Transl Med.* 2012; 4(150): 150ra23.
23. Thomson KA, Baeten JM, Mugo NR, Bekker L-G, Celum CL, Heffron R. Tenofovir-based Oral PrEP Prevents HIV Infection among Women. *Curr Opin HIV AIDS* 2016; 11(1): 18-26.
24. Smith JM, Srinivasan P, Teller RS, Lo Y, Dinh CT, Kiser PF, et al. Tenofovir disoproxil fumarate intravaginal ring protects high-dose depot medroxyprogesterone acetate-treated macaques from multiple SHIV exposures. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2015; 68(1) :1-5.
25. Machado RM, Palmeira-de-Oliveira A, Martinez-De-Oliveira J, Palmeira-de-Oliveira R. Vaginal films for drug delivery. *J Pharm Sci.* 2013; 102(7): 2069-2081.
26. Singh L, Kruger HG, Maguire GEM, Govender T, Parboosing R. The role of nanotechnology in the treatment of viral infections. *The Adv Infect Dis.* 2017; 4(4): 105-131.

27. Machado A, Cunha-Reis C, Araújo F, Nunes R, Seabra V, Ferreira D, et al. Development and in vivo safety assessment of tenofovir-loaded nanoparticles-in-film as a novel vaginal microbicide delivery system. *Acta Biomater.* 2016; 44: 332-340.
28. Blakney AK, Ball C, Krogstad EA, Woodrow KA. Electrospun fibers for vaginal anti-HIV drug delivery. *Antiviral Res.* 2013; 100: S9-S16.
29. Blakney AK, Jiang Y, Woodrow KA. Application of electrospun fibers for female reproductive health. *Drug Deliv Transl Res.* 2017; 7(6): 796-804.
30. Yamamoto HS, Xu Q, Fichorova RN. Homeostatic properties of *Lactobacillus jensenii* engineered as a live vaginal anti-HIV microbicide. *BMC Microbiol.* 2013; 13: 4.
31. Las mujeres y la necesidad de los microbicidas. International Partnership for Microbicides. 2011. Disponible en: https://assets.publishing.service.gov.uk/media/57a08ae1ed915d622c00096f/WomenNeedforMicrobicides_SPANISH_Jan2011.pdf [Consultado 8 de enero de 2018]
32. Se pone en marcha un ensayo de fase I para probar un anillo vaginal de acción microbicida y anticonceptiva. GTt-VIH. 2017. Disponible en: http://gtt-vih.org/actualizate/la_noticia_del_dia/08-05-17 [Consultado 8 de enero de 2018]
33. Ruiz C, Torres V, Cianelli R, Ferrer L. Microbicidas Metodo de Prevencion en VIH/SIDA Controlado por Mujeres. *Hisp Health Care Int Off J Natl Assoc Hisp Nurses* 2009; 7(1): 35-48.
34. Freno a la investigación de microbicidas contra el VIH. GTt-VIH.2017. Disponible en: http://gtt-vih.org/actualizate/la_noticia_del_dia/13-11-17 [Consultado 8 de enero de 2018].
35. Skoler-Karpoff S, Ramjee G, Ahmed K, Altini L, Plagianos MG, Friedland B, et al. Efficacy of Carraguard for prevention of HIV infection in women in South Africa: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2008; 372(9654): 1977-1987.
36. Fletcher PS, Wallace GS, Mesquita PM, Shattock RJ. Candidate polyanion microbicides inhibit HIV-1 infection and dissemination pathways in human cervical explants. *Retrovirology* 2006; 3: 46.
37. Malcolm RK, Forbes CJ, Geer L, Veazey RS, Goldman L, Klasse PJ, et al. Pharmacokinetics and efficacy of a vaginally administered maraviroc gel in rhesus macaques. *J Antimicrob Chemother.* 2013; 68(3): 678-683.
38. Das Neves J, Sarmiento B. Precise engineering of dapivirine-loaded nanoparticles for the development of anti-HIV vaginal microbicides. *Acta Biomater.* 2015; 18: 77-87.
39. Cunha-Reis C, Machado A, Barreiros L, Araújo F, Nunes R, Seabra V, et al. Nanoparticles-in-film for the combined vaginal delivery of anti-HIV microbicide drugs. *J Controlled Release* 2016; 243: 43-53.
40. Lagenaur LA, Sanders-Ber BE, Brichacek B, Pal R, Liu X, Liu Y, et al. Prevention of vaginal SHIV transmission in macaques by a live recombinant *Lactobacillus*. *Mucosal Immunol.* 2011; 4(6): 648-657.