
COMPUESTOS NATURALES DE PLANTAS DE LA FAMILIA CLUSIACEAE: INHIBIDORES DEL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1

RICARDO REYES CHILPA y MAIRA HUERTA REYES

RESUMEN

El SIDA es un problema de salud pública mundial, por lo que es necesario coordinar los esfuerzos para combatir esta enfermedad. En esta perspectiva, se revisan las investigaciones tendientes al descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos contra el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) a partir de metabolitos secundarios de origen vegetal aislados de especies de la familia

Clusiaceae. En particular, la revisión se enfoca en las cumarinas tetracíclicas inhibidoras de la transcriptasa reversa del VIH-1, como el (+)-calanólido A. También se presenta una semblanza sobre la biología del VIH y de los estudios llevados a cabo en México referentes a la búsqueda de compuestos antiVIH a partir de la flora local.

En 1981 se dieron a conocer los primeros informes de una nueva enfermedad humana, el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), caracterizada por un severo daño inmunológico (Gottlieb *et al.*, 1981). Dos años después fue identificado el agente causal, el cual fue denominado como Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH; Barré-Sinoussi *et al.*, 1983; Levy *et al.*, 1985; Wong-Staal y Gayo *et al.*, 1985; Coffin *et al.*, 1986). También se identificó que el principal blanco del VIH son los linfocitos CD4⁺, los cuales presentan una disminución progresiva en personas infectadas por este virus (Dalglish *et al.*, 1984). Actualmente se estima que más de 40 millones de personas están infectadas con VIH y que han ocurrido 24 millones de fallecimientos debido a este padecimiento en todo el mundo. Tan solo 2,1 millones de personas murieron durante 2007 y se estima que 7000 personas se infectan

con el virus cada día (ONUSIDA/OMS, 2007). La Administración de Fármacos y Alimentos de EEUU (FDA) ha aprobado hasta el momento 24 fármacos para su uso en pacientes infectados con VIH (Hupfeld y Efferth, 2009). A pesar que estos tratamientos han mostrado efectividad en el control de la infección, estos beneficios son limitados por riesgos asociados con el uso prolongado de los fármacos, como toxicidad hepática y neurológica (De Clercq, 1999, 2000), pero sobretodo por el rápido desarrollo de resistencia a los mismos (Raulin, 2002). Los fármacos que actualmente se utilizan tienen un alto costo por tratamiento individual, el cual se estima en un promedio de USD 6000 anuales en los esquemas iniciales para México (CONASIDA, 2007). En consecuencia, es necesario proseguir con los esfuerzos para descubrir y desarrollar fármacos y fitofármacos que permitan controlar la epidemia del SIDA causada por el VIH.

El Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)

El agente etiológico del SIDA, el VIH, es un retrovirus ubicado en el género *Lentivirus*, los cuales poseen largos períodos de incubación y tienen como blanco diversos linajes de células hematopoiéticas, particularmente linfocitos (Freed y Martin, 2001). Otros virus similares que infectan diversas especies incluyen al virus visna/maedi (oveja), virus de artritis/encefalitis caprina (VAEC), virus de anemia infecciosa equina (VAIE) y los virus de inmunodeficiencia felina (VIF), bovina (VIB), y de simios (VIS). Hasta el momento han sido identificados y caracterizado dos tipos: VIH-1 y VIH-2 (Coffin *et al.*, 1986). El primero de ellos se distribuye ampliamente en el mundo, pero con alta prevalencia en África Central, Europa, Asia y Estados Unidos; aunque las infecciones con VIH-2 están localizadas

PALABRAS CLAVE / *Calophyllum* / Clusiaceae / Cumarinas / SIDA / VIH /

Recibido: 13/06/2008. Modificado: 01/06/2009. Aceptado: 02/06/2009.

Ricardo Reyes Chilpa. Biólogo, Universidad Autónoma Metropolitana, México. Doctor en Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Maestro en Ciencias, Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos (INIREB), México. Investigador, UNAM, México. Dirección: Instituto de Química, UNAM. Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México 04510, D.F., México. e-mail: chilpa@servidor.unam.mx

Maira Estrella Huerta Reyes. Bióloga y Doctora en Ciencias Biomédicas, UNAM, México. Investigadora, Centro de Investigación Biomédica del Sur, Instituto Mexicano del Seguro Social, Xochitepec, Morelos. México. e-mail: chilanguisima@yahoo.com

principalmente en países del oeste de África, también han sido detectados individuos infectados con VIH-2 en Europa, Sudamérica, Estados Unidos, Asia y Australia (Evans y Levy, 1993). La ultraestructura del VIH-1 y VIH-2 es similar; sin embargo, la homología del total de la secuencia de nucleótidos entre ambos tipos es de ~40% (Guyader *et al.*, 1987). Al igual que otros lentivirus, las partículas maduras de VIH presentan un diámetro característico de 100-120nm y están cubiertos por una membrana que rodea a la cápside y a la nucleocápside de forma cónica. Las partículas virales, típicamente esféricas, poseen 2 copias de ARN (de polaridad positiva) y las enzimas transcriptasa reversa, proteasa e integrasa (TR, PR e IN, respectivamente; Evans y Levy, 1993; Freed *et al.*, 2001). El genoma de VIH-1 consta de solo 3 genes que codifican para proteínas estructurales: gag, pol y env. Estas proteínas estructurales son inicialmente sintetizadas como precursores de poliproteínas y subsecuentemente son procesadas por proteasas virales o celulares en partículas maduras. El precursor Gag Pr55 tiene como productos las proteínas de la matriz (MA) p17, cápside (CA) p24, nucleocápside (NC) p7 y p6. Por otra parte, la autocatálisis del precursor Gag-Pol Pr160, da como resultado a PR, TR e IN, mientras que la digestión proteolítica por enzimas celulares convierte el precursor Env gp160 en la proteína de superficie (SU) gp120 y la transmembranal (TM) gp41. Los restantes 6 genes (Vif, Vpr, Tat, Rev, Vpu y Nef) codifican para proteínas accesorias que participan en procesos de regulación de la expresión/replicación viral y son productos de la traducción primaria del procesamiento de ARNm (Luciw y Shacklett, 1993; Levy, 1998).

Ciclo replicativo

La replicación del VIH-1 se lleva a cabo en diez pasos (Cos *et al.*, 2004; Figura 1), que son: 1) La interacción de los viriones libres con la célula. 2) La unión y fusión del virus, mediante las glicoproteínas virales gp120 (SU) y gp41 (TM), con los receptores CD4⁺ (Dalglish *et al.*, 1984; Klatzmann *et al.*, 1984) y los coreceptores de quimiocinas

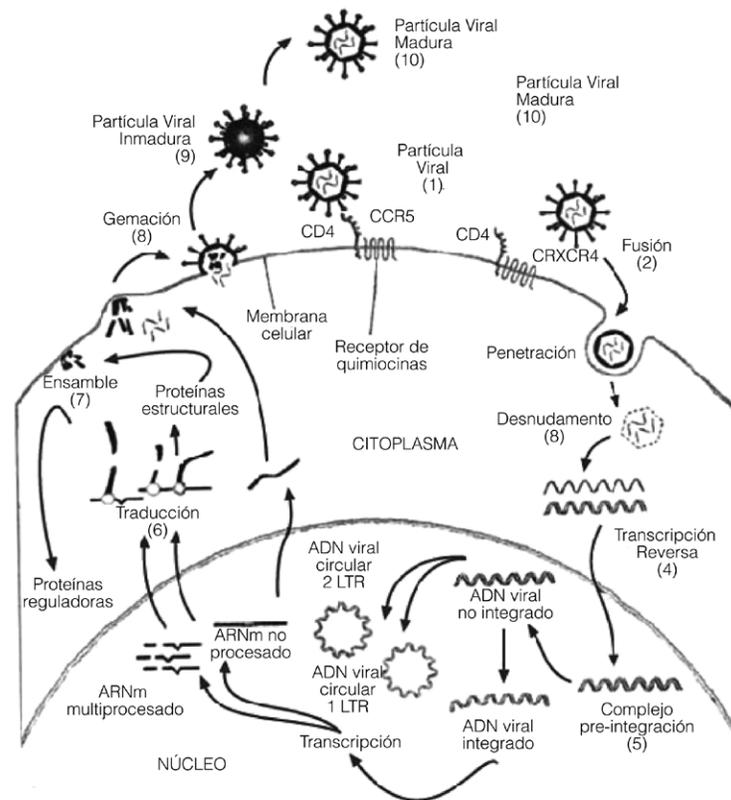


Figura 1. Ciclo replicativo del VIH.

CXCR4 o CCR5 de la célula hospedera (Fauci, 1996). 3) Como es característico de los retrovirus, las partículas virales parcialmente desnudas quedan libres en el citoplasma. 4) Se inicia la transcripción del ARN viral en un ADNc de doble cadena (Hu y Temin, 1990), proceso que es regulado por la enzima TR (Freed y Martin, 2001). 5) El ADN producto de la retrotranscripción es transportado a través del citoplasma hacia el interior del núcleo, donde es integrado al ADN cromosomal de la célula hospedera mediante la enzima IN que forma parte del complejo de pre-integración (Pullen y Champoux, 1990). 6) El ADN viral integrado sirve como molde para que la ARN polimerasa dependiente de ADN (Pol II) sintetice los ARNm que son traducidos en proteínas virales en el citoplasma de las células infectadas (Evans y Levy, 1993). 7) El precursor de las glicoproteínas gp160 y las poliproteínas de Gag y Gag/Pol son transportadas por vías independientes hacia la membrana. 8) Éstas participan en la formación de partículas esféricas que contienen las glicoproteínas virales TM y SU. 9) Éstas emergen de la célula como viriones inmaduros (Berman *et al.*, 1988). 10) La proteólisis subsecuente, mediada por la proteasa ubicada en el virión inmaduro, genera partículas que contienen la nucleocápside cónica característica de los viriones maduros (Katoh *et al.*, 1985). La pro-

teólisis puede ocurrir durante o inmediatamente después de que la partícula viral deja la célula (Freed y Martin, 2001; Goff, 2001).

Transcriptasa reversa (TR)

La enzima TR del VIH-1 ha sido un blanco importante en la terapéutica del SIDA. Es un heterodímero de 2 subunidades de 66 (p66) y 51kDa (p51). Esta se deriva de la subunidad p66 como producto de la remoción proteolítica de 15kDa de p66 llevada a cabo por la PR de VIH-1 (Freed y Martin, 2001). La subunidad p66 puede ser visualizada con fines didácticos como una mano derecha (vista con la palma frente a los ojos) que incluye el sitio activo de la polimerasa, conformado como una marcada hendidura formada por los dominios de la "palma", "dedos" y "pulgar" (Jacobsohn *et al.*, 1993). El dominio de la polimerasa está unido a la

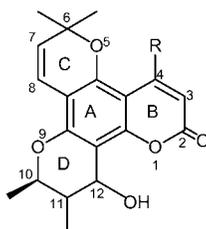
ARNsa por el subdominio de conexión. El sitio activo, localizado en la "palma", contiene tres residuos de ácido aspártico (D) determinantes (D110, D185 y D186) que se localizan muy próximos entre sí y en coordinación con dos iones Mg²⁺ (Huang *et al.*, 1998). Mutaciones de estos residuos de ácido aspártico anulan la actividad de polimerasa de la TR. La subunidad p51 muestra una estructura rígida que no forma parte de la hendidura de polimerización (Arnold *et al.*, 1992; Flint *et al.*, 2000). La TR cataliza la retrotranscripción de una cadena sencilla de ARN en una doble cadena de ADN durante la fase temprana del proceso infeccioso, la cual se lleva a cabo en conjunto con la actividad de RNasaH. La TR de VIH-1 realiza tres funciones enzimáticas: 1) como polimerasa dirige la síntesis de ADN a partir de ARN, para la formación del ADN de polaridad negativa; 2) como RNasaH degrada el iniciador de ARNt y el ARN molde presente en el híbrido intermedio de ADN-ARN; y 3) polimerasa de ADN a partir de ADN ya que polimeriza la cadena positiva de ADN (Flint *et al.*, 2000; Goff, 2001). La TR presenta una alta tasa de mutación durante la replicación, debido a que carece de un dominio de exonucleasa para la reparación (Evans y Levy, 1993; Coffin, 1995). La tasa del total de mutaciones *in vivo* de VIH-1, que comprende sustituciones, cambios en el marco

de lectura, deleciones simples o con inserciones, se calcula en 3×10^{-5} por ciclo replicativo. Las tasas de mutaciones *in vivo* de otros retrovirus, como BLV y MuLV, son entre 2 y 10 veces menores que las del VIH-1 (Mansky y Temin, 1996).

Terapia Antiretroviral

Los fármacos antiVIH que han sido aprobados por la FDA pueden ser clasificados en cuatro grupos con base en sus mecanismos de acción: inhibición de la fusión (IF), de la transcriptasa reversa (ITR), la integrasa (II) o la proteasa (IP). Los IF evitan la fusión virus-célula y, con ello, la infección de células blanco (Kilby *et al.*, 1998). Los ITR se clasifican en 2 tipos: a) análogos a nucleósidos (ITRAN ó NRTI por sus siglas en inglés), que actúan sobre el sitio activo de la enzima o b) no nucleósidos (ITRNN ó NNRTI) que inhiben por interacción específica con un sitio de unión alostérico (De Clercq, 1993). Los II inhiben la acción de la IN y evitan la inserción del material genético del virus en el material genético del hospedero (Markowitz *et al.*, 2006). Los IP se unen al sitio activo de la proteasa viral y evitan el procesamiento de las proteínas virales a enzimas funcionales. Las partículas virales son producidas aún cuando la PR es inhibida, pero no son infecciosas (Wlodawer y Erickson, 1993).

De los 24 fármacos aprobados, 11 son inhibidores de la reversa transcriptasa (7 ITRAN y 4 ITRNN), 10 son inhibidores de proteasa, 2 son inhibidores de fusión y 1 es inhibidor de integrasa (Hupfeld y Efferth, 2009). Actualmente se administran combinaciones de inhibidores de TR y PR que conforman los esquemas denominados "terapia antiretroviral altamente activa" (TARAA o HAART por sus siglas en inglés). El uso de TARAA ofrece beneficios claros en la calidad y expectativa de vida de los pacientes con VIH, mejorando el estado inmunológico general (De Clercq, 1999); además, cambió la perspectiva de una enfermedad mortal a un padecimiento crónico y tratable (CONASIDA, 2007). La TARAA ha probado ser benéfica especialmente en combinaciones triples de fármacos (3ITR, 2ITR + 1IP) sobre monoterapias y combinaciones dobles. En los pacientes con VIH ocasiona la reducción sostenida de carga viral plasmática, incrementa el número de linfocitos CD4 y el retardo de



Configuración 10β	Calanólidos (R: prenilo)	Inofilums (R: fenilo)	Cordatólidos (R: metilo)
<i>trans, trans</i> (11α-Me, 12β-OH)	Calanólido A	Inofilum B	Cordatólido A
<i>trans, cis</i> (11α-Me, 12α-OH)	Calanólido B	Inofilum P	Cordatólido B
<i>cis, trans</i> (11β-Me, 12α-OH)	—	Inofilum D	—
<i>cis, cis</i> 11β-Me, 12β-OH	Calanólido C	Inofilum A	—

Figura 2. Cumarinas aisladas de *Calophyllum* spp. α y β: abajo y arriba del plano del papel, respectivamente.

la progresión a SIDA (Press *et al.*, 2002). Todo esto se manifiesta en incremento de la esperanza de vida y disminución de la tasa de mortalidad. No obstante, estos beneficios se ven limitados por importantes riesgos asociados con el uso prolongado de los tratamientos, tales como trastornos metabólicos y reacciones farmacológicas cruzadas (De Clercq, 2000). La posibilidad de bajo apego de los pacientes a tratamientos permanentes se considera un factor importante en la selección de variantes resistentes. También podría tener efectos graves de toxicidad en el sistema cardiovascular, hígado, riñón, cerebro, páncreas y piel (De Clercq, 2000; Guaraldi *et al.*, 2003; CONASIDA, 2007). La terapia TARAA no erradica el virus de sus reservorios aún después de 30 meses de tratamiento y 15% de los casos presentan resistencia al primer esquema de tratamiento (De Clercq, 1999).

Productos Naturales AntiVIH

A la fecha se ha logrado identificar poco más de 120 compuestos naturales, principalmente de plantas, que pueden contrarrestar *in vitro* los efectos citopáticos de células infectadas con VIH e impedir la replicación del virus. Estos presentan una gran diversidad estructural encontrándose, entre otros, alcaloides, cumarinas, flavonoides, lignanos, fenoles, quinonas, saponinas, diterpenos, triterpenos, xantonas y polisacáridos sulfatados (Vlietnick *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2005). Se conoce el mecanismo de acción de algunos de ellos, destacando aquellos que inhiben *in vitro* la entrada/fusión, la formación de sincicios, así como la actividad de la TR, IN y PR (Matthée *et al.*, 1999; Min *et al.*, 1999; Cos *et al.*, 2004). Entre los compuestos extraídos de bacterias, hongos, invertebrados terrestres y marinos, destacan: ciano-

virina-N, una proteína aislada de la cianobacteria *Nostoc ellipsosporum*, que ha sido caracterizada como un inhibidor de la entrada/fusión del virus; la esponjotimidina, obtenida de la esponja *Cryptotethia cripta*, que inhibe la TR; la lamellarina α20-sulfato, un nuevo inhibidor de IN proveniente del molusco *Lamellaria* sp., y los dépsidos y depsidonas inhibidores de IN aislados de líquenes (Vlietnick *et al.*, 1998; Matthée *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2001). De acuerdo a algunos autores, los compuestos que poseen mayor

potencial para convertirse en fármacos antiVIH por encontrarse en etapa de estudios clínicos son el (+)-calanólido A, dos derivados semisintéticos de la suksdorfina, una cumarina originalmente aislada de *Lomatium suksdorfii* (Apiaceae; Singh *et al.*, 2005) y un derivado semisintético del ácido betulínico (Butler, 2005), que es un triterpenoide común en muchas plantas.

Productos Naturales AntiVIH de Clusiaceae

Cumarinas

El (+)-calanólido A (Figura 2) fue aislado por primera vez de brotes y frutos de *Calophyllum lanigerum*, árbol tropical de Malasia, caracterizándolo como un inhibidor potente de la TR del VIH-1 (Kashman *et al.*, 1992). Actualmente se encuentra en la fase II/III de evaluación clínica con pacientes VIH-1 positivos. De superar los ensayos clínicos, podría convertirse en el primer fármaco, originalmente extraído de una especie vegetal y posteriormente producido sintéticamente, que se aprobase para uso clínico en el tratamiento del SIDA (Butler, 2005; Sarawak, 2008). El interés en dicho compuesto ha estimulado los estudios químicos sobre la familia Clusiaceae, constituida por ~36 géneros y 1600 especies, con distribución pantropical y diferentes hábitos de vida: árboles, arbustos, lianas, hierbas anuales o perennes. Los dos géneros más importantes son *Clusia* y *Calophyllum* con cerca de 300 y 200 especies, respectivamente (Kearns *et al.*, 1998). El género *Calophyllum* está constituido por especies arbóreas, la mayoría de ellas localizadas en la zona Indo-Pacífica, sobre todo desde la Península Malaya hasta Nueva Guinea. En selvas tropicales del continente americano se encuentran ocho especies de *Calophyllum* (Stevens, 1980).

TABLA I
CUMARINAS NATURALES Y SINTÉTICAS CON PROPIEDADES ANTIVIH-1

Compuesto	EC50* (μM)	IC50** (μM)	Fuente
(+)-Calanólido A ¹	0,1	20,0	<i>C. lanigerum</i>
(-)-Calanólido B ¹	0,4	15,0	<i>C. lanigerum</i>
Calanólido F ²	2,84	12,7	<i>C. lanigerum</i> var. <i>austroriciaceum</i>
Inofilum B ³	1,40	55,0	<i>C. inophyllum</i>
Inofilum P ³	1,60	25,0	<i>C. inophyllum</i>
Costatólido ⁴ = (-)-Calanólido B			<i>C. teysmannii</i>
Soulatrólido ⁵ = Inofilum B			<i>C. teysmannii</i>
(\pm)12-Oxocalanólido A ⁶	0,40	5,8	Síntesis
(+)-12-Oxocalanólido A ⁶	0,90	>10	Síntesis
(-)-12-Oxocalanólido A ⁶	3,41	>10	Síntesis

* Concentración efectiva que inhibe el 50% de la producción viral, 50% de la infectividad o 50% de los efectos citopáticos inducidos por el virus.

** Concentración efectiva que reduce en 50% el crecimiento celular o la viabilidad de células no infectadas.

Referencias: ¹Kashman *et al.* (1992), ²McKee *et al.* (1996), ³Patil *et al.* (1993), ⁴Fuller *et al.* (1994), ⁵Pengsuparp *et al.* (1996), ⁶Xu *et al.* (1998).

Las propiedades antiVIH-1 del (+)-calanólido A se describieron por primera vez mediante dos ensayos de viabilidad celular *in vitro* con células linfoblásticas T humanas (CEM-SS) infectadas con el virus (Kashman *et al.*, 1992). En el ensayo con XTT tetrazolium-formazan, detuvo la replicación del VIH-1 y confirió 100% de protección contra los efectos citopáticos (EC_{50} = 0,1 μM) del virus. La citotoxicidad del compuesto (*vs* células no infectadas) se manifestó a concentraciones 200 veces mayores (IC_{50} = 20 μM) (Tabla I), para un índice terapéutico ($\text{EC}_{50}/\text{IC}_{50}$) de 200. Resultados similares se obtuvieron con un segundo método, estableciendo además que el (+)-calanólido A inhibía la producción de TR y de la proteína viral gp24. También se demostró que inhibe específicamente la actividad de la TR del VIH-1 mediante ensayos sobre moldes homopoliméricos de poliA y poliT. No obstante, el (+)-calanólido A fue inactivo contra células infectadas con VIH-2. Pronto se sabría que el (+)-calanólido A era el compuesto líder de tres series de dipiranocumarinas tetracíclicas estructuralmente relacionadas (Figura 2), denominadas calanólidos (prenilo en C-4), inofilums (fenilo en C-4) y cordatólidos (metilo en C-4). Además del (+)-calanólido A de *C. lanigerum* fueron aisladas siete dipiranocumarinas, dos de las cuales también fueron activas contra el VIH-1 (Kashman *et al.*, 1992). El (-)-calanólido B presentó actividad antiVIH, pero requirió concentraciones cuatro veces mayores para lograr niveles de citoprotección equivalentes a las del (+)-calanólido A (Tabla I). El 12-acetoxi-calanólido fue aún menos potente, pues presentó una EC_{50} = 2,7 μM , concentración 27 veces mayor que la del compuesto líder. También se estableció la estereoquímica absoluta del (+)-calanólido A y (-)-calanólido B, como 10R, 11R, 12S

y 10R, 11R, 12R, respectivamente. En 1993 se aislaron dos nuevas dipiranocumarinas de las hojas de *C. inophyllum* de Malasia, los inofilums B y P (Figura 2), que también inhibieron la TR del VIH-1 (EC_{50} = 38 y 130nM, respectivamente) y ofrecieron protección contra los efectos citopáticos del VIH-1 en cultivos de células infectadas (Patil *et al.*, 1993; Tabla I). Más adelante, se aislaron los cordatólidos A y B (Figura 2) de las hojas de *C. cordato oblongum* de Sri Lanka. Dichos compuestos inhibieron *in vitro* la actividad de la TR del VIH-1 (EC_{50} = 12,3 y 19 μM , respectivamente); sin embargo, no se ensayó su efecto sobre células infectadas (Dharmaratne *et al.*, 1998).

El (+)-calanólido A se obtiene en cantidades muy reducidas (<1mg/g extracto) de las hojas de *C. lanigerum*, especie que además es muy escasa (Cardellina *et al.*, 1995), por lo cual se buscaron fuentes y compuestos alternativos. Se determinó que es factible aprovechar el látex de *C. teysmannii* var. *inophylloide*, el cual contiene cantidades apreciables (hasta 48%) de costatólido, compuesto que también se obtuvo en forma abundante (400mg/kg) de las semillas de *C. cerasiferum* (Spino *et al.*, 1998). Otra manera de obtener un suministro adecuado de (+)-calanólido A que permitiera estudiar sus propiedades farmacológicas fue por síntesis. Se ha podido sintetizar la mezcla racémica de calanólido A, logrando la resolución de los enantiómeros (+) y (-) por cromatografía (Flavin *et al.*, 1996). Otros esfuerzos para lograr la síntesis del calanólido A, permitieron obtener la mezcla racémica del 12-oxocalanólido A (Khilevich *et al.*, 1996), logrando separar ambos enantiómeros (Xu *et al.*, 1998). Tanto el (+) como el (-), así como el (\pm)-12-oxocalanólido A, presentaron alta actividad contra el VIH-1. La EC_{50} de

la mezcla racémica fue idéntica a la del (-)-calanólido B, lo cual es importante ya que no se requeriría purificar los enantiómeros para su empleo. Los anteriores compuestos también resultaron activos contra el VIS, pero no así contra el VIH-2. El (+) y (\pm)-12-oxocalanólido A actúan específicamente sobre la TR (IC_{50} = 10-40 μM ; Xu *et al.*, 1998).

Relaciones estructura-actividad. El anillo D (trans-10,11-dimetildihidropirano12-ol) es indispensable para que el (+)-calanólido A presente actividad antiVIH-1. La presencia de un heteroátomo, en especial de un grupo OH, sobre el carbono 12, también es crucial para dicho tipo de actividad (Galiniš *et al.*, 1996; Zembower *et al.*, 1997). El OH-12 debe ser β para obtener máxima actividad, por lo cual algunos resultados contradictorios publicados podrían deberse a que los compuestos estuviesen parcialmente racemizados (Flavin *et al.*, 1996). La presencia de un grupo ceto en la posición 12 (12-oxocalanólido A) no ocasiona una pérdida de la actividad, sino que disminuye a un cuarto la actividad antiVIH-1 comparada con la del (+)-calanólido A (Tabla I). En el caso de la síntesis del 12-oxocalanólido A, la pérdida de potencia es compensada por la actividad de la mezcla racémica (Xu *et al.*, 1998).

El estudio de las series de los calanólidos e inofilums ha permitido concluir que los dos metilos y el hidroxilo sobre el anillo D deben presentar tres orientaciones sucesivas sobre las posiciones 10, 11 y 12 para obtener la máxima inhibición de la TR del VIH-1 (Ischikawa *et al.*, 1997). Así, el (+)-calanólido A con configuración *trans-trans* muestra la máxima actividad (EC_{50} = 0,1 μM) de su serie (Figura 2), seguido por el (-)-calanólido B (*trans-cis*, EC_{50} = 0,4 μM). El inofilum B es el más potente de su serie (*trans-trans*, EC_{50} = 1,40 μM), seguido por inofilum P (*trans-cis*, EC_{50} = 1,60 μM), el inofilum D (*cis-trans*) y finalmente el inofilum A (*cis-cis*). Para estudiar el papel de los grupos sustituyentes sobre el anillo D, se preparó una serie de análogos del (+)-calanólido A y se evaluó su efecto protector contra la citopatoicidad de VIH-1 mediante el ensayo de XTT (Zembower *et al.*, 1997). La remoción del metilo en C-10 ocasionó que solo un epímero (OH β -12) presentara actividad, aunque disminuida. La sustitución del metilo en C-10 por un etilo se tradujo en una disminución a la cuarta parte comparada con la mezcla racémica del calanólido A, pero si el sustituyente era un isopropilo, desaparecía la actividad. La sustitución de los metilos por etilos sobre las posiciones 10 y 11 disminuyó la actividad antiVIH-1. En los

ejemplos anteriores, la relación *cis* entre los alquilos en 10 y 11 implicó inactividad. Sin embargo, los derivados cetónicos en 12, con orientación *cis* o *trans* entre los metilos 10 y 11 sí presentaron actividad.

Propiedades farmacológicas. El primer ensayo de actividad del (+)-calanólido A *in vivo* se realizó con un modelo de células CEM-SS humanas infectadas con VIH-1 IIIb, implantadas dentro de una fibra plástica hueca en ratón. El compuesto, administrado oral o parenteralmente, inhibió la replicación del virus (Xu *et al.*, 1999). Más adelante se examinó su perfil de seguridad en animales, así como su farmacocinética en voluntarios humanos VIH negativos con dosis únicas (Creagh *et al.*, 2001). Continuando con los estudios clínicos de fase I, el (+)-calanólido A fue administrado en dosis de hasta 800mg b.i.d. durante 5 días, encontrándose que era bien tolerado aunque se observaron efectos adversos transitorios de baja intensidad tales como mareo, cefalea, náuseas y mal sabor en boca. Los niveles en plasma fueron variables, pero a las dosis más altas se alcanzaron niveles de posible eficacia terapéutica (Eiznhamer *et al.*, 2002). Los estudios permiten concluir que el (+)-calanólido A es un nuevo tipo de inhibidor no nucleósido de la TR (ITRNN) del VIH-1 (Sarawak, 2008) con características tales como: a) Presenta una actividad selectiva contra VIH-1, así como para subtipos de VIH-1, pero no contra VIH-2. b) Es activo contra cepas de VIH-1 resistentes a AZT y 3TC, los cuales son dos de los fármacos ITRAN más comúnmente prescritos y contra cepas con la mutación Y181C, que confiere resistencia a la mayoría de los ITRNN. Esta es una característica única e importante que distingue al (+)-calanólido A de otros ITRNN, pues al parecer los residuos 100, 103, 188 y una región localizada entre los aminoácidos 225 y 427 son los sitios de unión de este compuesto. Adicionalmente, no se observaron cepas resistentes a ITRNN después de una monoterapia de 14 días en la fase IB en pacientes infectados con VIH, sugiriendo que el (+)-calanólido A puede retardar la emergencia de mutaciones virales. c) En estudios preclínicos el (+)-calanólido A mostró una interacción sinérgica en combinaciones dobles (con AZT, 3TC o d4T), así como en combinación triple que involucra IP+ITRAN como nelfinavir+3TC. Este sinergismo puede tener implicaciones terapéuticas importantes en la terapia TARAA. d) Debido a su naturaleza lipofílica se distribuye rápidamente en el sistema nervioso central y sistema linfático,

penetrando a los reservorios virales. e) Presenta buena tolerancia en humanos, con los únicos efectos adversos de mal sabor en boca y mareo, que ubican a este compuesto como un candidato para terapia a largo plazo. f) La tolerancia favorable y el perfil farmacocinético del (+)-calanólido A, demostrados en las fases IA y IB, sugieren que puede ser desarrollado como un fármaco de ingesta de 1-2 veces al día, lo cual favorecería el apego de los pacientes al tratamiento. g) El (+)-calanólido A es el único agente anti-VIH que también presenta propiedades inhibitorias sobre *Mycobacterium tuberculosis* (Xu *et al.*, 2004), una de las principales infecciones oportunistas en pacientes con SIDA.

Benzofenonas y xantonas

Diversas benzofenonas preniladas aisladas de especies pertenecientes a los géneros *Allanblackia*, *Clusia*, *Garcinia*, *Symphonia* y *Vismia* (Clusiaceae) también han presentado actividad anti-VIH-1 *in vitro* (Figura 3). Las guttiferonas A, B, C y D inhibieron parcialmente *in vitro* los efectos citopáticos en células linfoblastoides humanas infectadas con VIH-1 (EC_{50} = 1-10 μ g/ml), pero no así la replicación viral, estimada por la producción de TR, p24 y formación de sincicios; por otra parte, la citotoxicidad de tales compuestos con células no infectadas se manifestó a concentraciones >50 μ g/ml (Gustafson *et al.*, 1992). La guttiferona F y la vismiafenona D presentaron propiedades similares a las ya descritas para las guttiferonas A, B, C, y D, es decir, tampoco alcanzaron el 100% de citoprotección (Fuller *et al.*, 1999a, b). Otras benzofenonas preniladas, como la clusianona, 7-epiclusianona, 18,19-dihidroxiclusianona, nemosona y propolona A, aisladas de especies de *Clusia* americanas, también han mostrado actividad antiviral en el modelo antes señalado. La propolona A fue la mejor de esta serie, pues presentó un EC_{50} = 0,32 μ M y un índice terapéutico de 15,6 (Piccinelly *et al.*, 2005). Las benzofenonas son precursores biogénicos de las xantonas, las cuales también han presentado propiedades anti-VIH. De la Clusiaceae asiática *Cratogeomys arborescens* se obtuvieron 1,3,8-trihidroxi-2,4-dimetoxi-xantona,

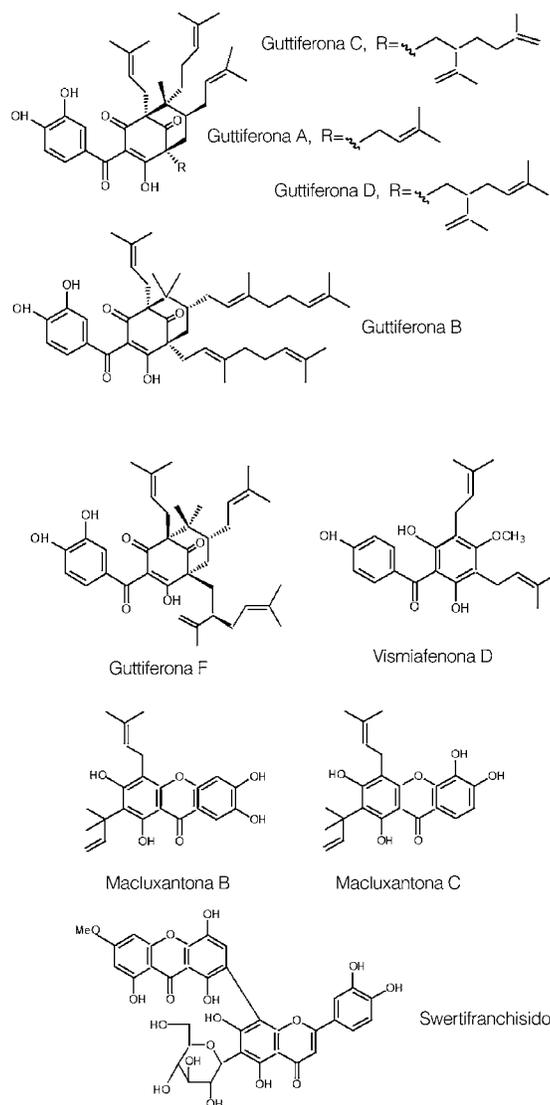


Figura 3. Benzofenonas y xantonas con actividad anti-VIH-1.

euxantona y 1,3,7-trihidroxi-6-metoxi-4,5-disoprenilxantona. Todas mostraron actividad anti-VIH en células infectadas y la última inhibió la TR con un IC_{50} = 8,7 μ g/ml (Reutrakul *et al.*, 2006). La mangostina y el γ -mangostina aisladas de *Garcinia mangostana* inhibieron de manera no competitiva la TR del VIH-1 (Chen *et al.*, 1996). Las macluraxantonas A y B aisladas de la corteza de *Maclura tinctoria* (Moraceae) mostraron actividad anti-VIH-1 *in vitro* con una EC_{50} = 1-2,2 μ g/ml; sin embargo, también presentaron alta toxicidad (IC_{50} = 2,3-3,7 μ g/ml) a las células humanas hospederas CEM-SS (Groweiss *et al.*, 2000). El swertifranchisido (1,5,8-(trihidroxi-3-metoxi-7-(5',7',3'',4''-tetrahidroxi-6'-C- β -D-glucopiranosil-4'-oxi-8'-flavil)-xantona; Figura 3), aislada de *Swertia franchetiana* (Gentianaceae), inhibió la TR del VIH-1 con un IC_{50} = 3 μ g/ml (Wang *et al.*, 1994).

Antiretrovirales de Clusiaceas de México

La familia Clusiaceae en México consta de ~8 géneros y 21 especies. En un estudio bioprospectivo fueron evaluados los posibles efectos inhibitorios de los extractos orgánicos de las hojas de las 21 especies sobre la TR del VIH-1 (Huerta-Reyes *et al.*, 2004a). Cinco especies mostraron una alta actividad inhibitoria ($\geq 70\%$), 7 fueron moderadamente activas (50-70%) y 9 mostraron $< 50\%$ de inhibición. La más activa fue *Calophyllum brasiliense*. Tanto el extracto hexánico (77,9%), como el acetónico (81,3%) y metanólico (83,3%) mostraron actividad anti-TR-VIH-1. Otras especies con alta actividad fueron *Clusia massoniana* y *Vismia mexicana*, cuyos extractos de diclorometano-metanol (1:1) presentaron 72,9% de inhibición, mientras que *Clusia guatemalensis* y *Vismia camparaguey* inhibieron la TR en 70,8%. Como resultado del fraccionamiento biodirigido se aislaron e identificaron 10 compuestos de las hojas de *C. brasiliense*, de los cuales, el (+)-calanólido A, (-)-calanólido B, (+)-calanólido C, y soulatrólido fueron identificados como responsables de las propiedades antiVIH (Huerta-Reyes *et al.*, 2004b). Por otra parte, las cromononas, y los ácidos apétálico, isoapétálico y calolónico, así como los triterpenos, friedelina y canofilol y un biflavonoide, la amentoflavona, fueron inactivos contra la TR VIH-1. En dicho estudio, el extracto de hexano de *C. brasiliense* además inhibió la replicación de VIH-1 en linfocitos CD4⁺ y resultó poco tóxico sobre linfocitos CD4⁺ no infectados (Huerta-Reyes *et al.*, 2004b). Curiosamente, *C. brasiliense* no fue considerada como posible fuente de compuestos antiVIH en un estudio bioprospectivo previo (McKee *et al.*, 1998). Estos autores analizaron un gran número de especies de *Calophyllum* colectadas principalmente en Malasia. Su método incluyó un sondeo por cromatografía en capa fina utilizando (-)-calanólido B y soulatrólido como referencias. La muestra de *C. brasiliense* no presentó dipiranocumarinas y por tanto fue excluida de estudios posteriores. Sin embargo, seis años después se estableció que en México existen dos poblaciones de *C. brasiliense* que difieren en la composición química de las hojas, es decir son quimiotipos. Uno sintetiza calanólidos y cromononas, mientras que otro produce cumarinas tipo mameas. Estas fueron inactivas contra la TR VIH-1, pero presentaron alta actividad citotóxica contra tres líneas tumorales humanas (Reyes-Chilpa *et al.*, 2004). Los dos quimiotipos podrían ser especies diferentes, aunque actualmente solo se reconoce una especie de este género en México.

La presencia de calanólidos en uno de los quimiotipos de *C. brasiliense*, así como la abundancia y amplia distribución geográfica de esta especie desde Brasil hasta México (Stevens, 1980), permiten plantear la posibilidad de aprovechar estos compuestos mediante la cosecha sustentable de hojas para elaborar un fitofármaco (extracto normalizado química y farmacológicamente) de bajo costo, elaborado y distribuido por los sistemas de salud públicos de la región para coadyuvar en el combate de la epidemia de SIDA. Sin embargo, esta propuesta también debe examinarse en el contexto legal y económico, considerando que las aplicaciones medicinales de los calanólidos están protegidas por patentes internacionales otorgadas a compañías farmacéuticas. En todo caso, este capítulo ilustra la necesidad de que los países latinoamericanos cuenten con políticas públicas y programas nacionales de investigación con el fin de aprovechar su biodiversidad en la solución de sus problemas de salud. Un ejemplo es el Programa de Investigación de Plantas Medicinales del Brasil (1982-1997), desafortunadamente suspendido (Sant'Ana y Assad, 2004).

Conclusiones

Las dipiranocumarinas tetracíclicas obtenidas de la familia Clusiaceae, en especial el (+)-calanólido A, son potentes inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa reversa del VIH-1. Las propiedades farmacológicas y toxicológicas de este compuesto lo hacen un fuerte candidato para incorporarse al cuadro de medicamentos antiVIH-1. Por otra parte, dichas cumarinas podrían eventualmente permitir el desarrollo de fitofármacos antiVIH a partir de extractos vegetales normalizados.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Carmen Soler Claudín por permitir el uso de la Figura 1, y a la DGAPA-UNAM por el financiamiento del proyecto Búsqueda de Compuestos de Origen Vegetal con Posible Actividad Inhibitoria de la Transcriptasa Reversa del VIH-1 (PAPIIT-IN207301).

REFERENCIAS

- Arnold E, Jacobo-Molina A, Nanni RG, Williams RL, Lu X, Ding J, Clark ADJR, Zhang A, Ferris AL, Clark P, Hizi A, Hughes SH (1992) Structure of HIV-1 reverse/transcriptase/DNA complex at 7 Å resolution showing active site locations. *Nature* 357: 85-89.
- Barré-Sinoussi F, Cherman JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vézinet-Brun F, Rouzioux C, Ro-

- zenbaum W, Montagnier L (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). *Science* 220: 868-871.
- Berman PW, Nunes WM, Haffar OK (1988) Expression of membrane-associated and secreted variants of gp160 of human immunodeficiency virus type *in vitro* and in continuous cell lines. *J. Virol.* 62: 3135-3142.
- Butler MS (2005) Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. *Nat. Prod. Rep.* 22: 162-195.
- Cardellina JHII, Bokesch HR, McKee TC, Boyd MR (1995) Resolution and comparative anti-HIV evaluation of the enantiomers of calanolides A and B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 5: 1011-1014.
- Chen SX, Wan M, Loh BN (1996) Active constituents against HIV-1 protease from *Garcinia mangostana*. *Planta Med.* 62: 381-382.
- Coffin JM (1995) HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* 267: 483-489.
- Coffin J, Haase A, Levy JA, Montagnier L, Oroszlan S, Teich N, Temin H, Toyoshima K, Varmus H, Vogt P, Weiss R (1986) Human immunodeficiency viruses. *Science* 232: 697.
- CONASIDA (2007) *Guía de Manejo Antirretroviral de las Personas que Viven con el VIH/SIDA*. www.salud.gob.mx/conasida/medicos/guias/arv/guiademanejo2007final.pdf (Cons. 23/05/2008).
- Cos P, Maes L, Berghe DV, Hermans N, Pieters L, Vlietnick A (2004) Plant substances as anti-HIV agents selected according to their putative mechanism of action. *J. Nat. Prod.* 67: 284-293.
- Creagh T, Ruckle J, Tolbert DW, Giltner J, Eiznhamer DA, Dutta B, Flavin MT, Xu ZQ (2001) Safety and pharmacokinetics of single doses of (+)-calanolide A, a novel, naturally occurring non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor, in healthy, human immunodeficiency virus-negative human subjects. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 1379-1386.
- Dalgleish AG, Beverly PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA (1984) The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 312: 763-767.
- De Clercq E (1993) Anti-HIV agents interfering with the initial stages of the HIV replicative cycle. En Morrow WJW, Haigwood NL (Eds) *HIV. Molecular Organization, Pathogenicity and Treatment*. Elsevier. Holanda. pp. 267-292.
- De Clercq E (1999) Perspectives of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) in the therapy of HIV-1 infection. *Il Farmaco* 54: 26-45.
- De Clercq E (2000) Reverse transcriptase inhibitors as anti-HIV Drugs. En Unger RE, Kreuter J, Rübsamen-Waigmann H (Eds.) *Antivirals Against AIDS*. Dekker. Nueva York, EEUU. pp. 107-150.
- Dharmaratne HRW, Wanigasekera WMA, Mata-Greenwood E, Pezzuto JM (1998) Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase activity by cordatolides isolated from *Calophyllum cordatoblomum*. *Planta Med.* 64: 460-461.
- Eiznhamer DA, Creagh T, Ruckle JL, Tolbert DT, Giltner J, Dutta B, Flavin MT, Jenta T, Xu

- ZQ (2002) Safety and pharmacokinetic profile of multiple escalating doses of (+)-Calanolide A, a naturally occurring nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor, in healthy HIV-negative volunteers. *HIV Clin. Trials* 3: 435-450.
- Evans LA, Levy JA (1993) The heterogeneity and pathogenicity of HIV. En Morrow WJW, Haigwood NL (Eds.) *HIV. Molecular Organization, Pathogenicity and Treatment*. Elsevier. Holanda. pp. 29-74.
- Fauci AS (1996) Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease. *Nature* 384: 529-533.
- Flavin MT, Rizzo JD, Khilevich A, Kucherenko A, Sheinkam AK, Vilaychack V, Lin L, Chen W, Greenwood EM, Pengsuparp T, Pezzuto JM, Hughes SH, Flavin TM, Cibulski M, Boulanger WA, Shones RL, Xu ZQ (1996) Synthesis, chromatographic resolution, and anti-human immunodeficiency virus activity of (\pm)-calanolide A and its enantiomers. *J. Med. Chem.* 39: 1303-1313.
- Flint SJ, Enquist LW, Krug RM, Racaniello VR, Skalka AM (2000) *Principles of Virology. Molecular Biology, Pathogenesis, and Control*. ASM. Washington, EEUU. 804 pp.
- Freed EO, Martin MA (2001) HIVs and Their Replication. En Knipe DM, Howley PM, (Comps.) *Fields Virology*. 4^a ed. Lippincott Williams & Wilkins. Filadelfia, EEUU. pp. 1971-2041.
- Fuller RW, Bokesch HR, Gustafson KR, McKee TC, Cardellina JHII, McMahon JB, Cragg GM, Soejarto DD, Boyd MR (1994) HIV-inhibitory coumarins from latex of the tropical rainforest tree *Calophyllum teysmannii* var. *inophylloide*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 4: 1961-1964.
- Fuller RW, Westergaard CK, Collins JW, Cardellina JHII, Boyd MR (1999a) Vismiaphenones D-G, new prenylated benzophenones from *Vismia cayennensis*. *J. Nat. Prod.* 62: 67-69.
- Fuller RW, Blunt JW, Boswell JL, Cardellina JHII, Boyd MR (1999b) Guttiferone F, the first prenylated benzophenone from *Allanblackia stuhlmannii*. *J. Nat. Prod.* 62: 130-132.
- Galanis DL, Fuller RW, McKee TC, Cardellina JHII, Gulankowski RJ, McMahon JB, Boyd MR (1996) Structure-Activity modifications of the HIV-1 inhibitors (+)-Calanolide A and (-)-Calanolide B. *J. Med. Chem.* 39: 4507-4510.
- Goff SP (2001) Retroviridae: the Retroviruses and their replication. En Knipe DM, Howley PM *Fields Virology*. 4^a ed. Lippincott Williams & Wilkins. Filadelfia, PA. EEUU. pp. 1987-1939.
- Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, Saxon A (1981) Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N. Eng. J. Med.* 305: 1425-1431.
- Groweiss A, Cardellina JHII, Boyd MR (2000) HIV-Inhibitory prenylated xanthenes and flavones from *Maclura tinctoria*. *J. Nat. Prod.* 63: 1537-1539.
- Guaraldi G, Murri R, Orlando G, Orlandi E, Sterrantino G, Borderi M, Grosso C, Cattelani AM, Nardini G, Beghetto B, Antinori A, Esposito R, Wu AW (2003) Morphological alterations in HIV-infected people with lipodystrophy are associated with good adherence to HAART. *HIV Clin. Trials* 4: 99-106.
- Gustafson KR, Blunt JW, Munro MHG, Fuller RW, McKee TC, Cardellina JHII, McMahon JB, Cragg GM, Boyd MR (1992) The Guttiferones, HIV-inhibitory benzophenones from *Symphonia globulifera*, *Garcinia livingstonei*, *Garcinia ovalia* and *Clusia rosea*. *Tetrahedron* 48: 10093-10102.
- Guyader M, Emerman M, Sonigo P, Clavel F, Montagnier L, Alizon M (1987) Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature* 326: 662-669.
- Hu WS, Temin HM (1990) Retroviral recombination and reverse transcription. *Science* 250: 1227-1233.
- 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.
- Huerta-Reyes M, Basualdo MC, Lozada L, Jiménez-Estrada M, Soler C, Reyes-Chilpa R (2004a) HIV-1 inhibition by extracts of Clusiaceae species from Mexico. *Biol. Pharm. Bull.* 27: 916-920.
- Huerta-Reyes M, Basualdo MC, Abe F, Jiménez-Estrada M, Soler C, Reyes-Chilpa R. (2004b) HIV-1 inhibitory compounds from *Calophyllum brasiliense* leaves. *Biol. Pharm. Bull.* 27: 1471-1475.
- Hupfeld J, Efferth T (2009) Drug resistance of human immunodeficiency virus and overcoming it by natural products. *In vivo* 23: 1-6.
- Ishikawa T, Oku Y, Kotake K (1997) Diastereoselective preparation of a trans, trans 2,3-dimethylchroman-4-ol skeleton: a model synthetic approach to anti-HIV-1 active *Calophyllum* coumarins. *Tetrahedron* 53: 14915-14928.
- Jacobo-Molina A, Ding J, Nanni RG, Clark AD Jr, Lu X, Tantillo C, Williams RL, Karver G, Ferris AL, Clark P, Hizi A, Hughes SH, Arnold E (1993) Crystal structure of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase complex with double-stranded DNA at 3.0 Å resolution shows bent DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90: 6320-6324.
- Kashman Y, Gustafson KR, Fuller RW, Cardellina JHII, McMahon JB, Currens MJ, Buckheit RWJr, Hughes SH, Cragg GM, Boyd MR (1992) The Calanolides, a novel HIV-inhibitory class of coumarin derivatives from the tropical rainforest tree, *Calophyllum lanigerum*. *J. Med. Chem.* 35: 2735-2743.
- Katoh I, Yoshinaka Y, Rein A, Shibuya M, Odaoka T, Oroszlan S (1985) Murine leukemia virus maturation: protease region required for conversion from "immature" to "mature" core form and for virus infectivity. *Virology* 145: 280-292.
- Kearns DM, Berry PE, Stevens PF, Cuello NL, Pipoly JJJII, Robson NKB, Holst BK, Kubitzki K, Weitzman AL (1998) Vol.4. Caesalpiniaceae-Ericaceae. En Steyermark JA, Berry PE, Holst BK. *Flora of the Venezuelan Guayana*. Missouri Botanical Garden Press. St. Louis, MI, EEUU. 799 pp.
- Khilevich A, Aye M, Flavin MT, Rizzo JD, Lin L, Dzekhtser S, Brankovic D, Zhang H, Chen W, Liao S, Zembower DE, Xu ZQ (1996) Synthesis of (+)-calanolide A, an anti-HIV agent, via enzyme-catalyzed resolution of the aldol products. *Tetrahed. Asymm.* 7: 3315-3326.
- Kilby JM, Hopkins S, Venetta TM, DiMassimo B, Cloud GA, Lee JY, Alldredge L, Hunter E, Lambert D, Bolognesi D, Matthews T, Johnson M, Nowak M A, Shaw GM, Saag MS (1998) Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41 mediated virus entry. *Nature Med.* 4: 1302-1307.
- Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, Gruest J, Guetard D, Hercend T, Gluckman JC, Montagnier L (1984) T-lymphocyte T4 molecule behaves as receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 312: 767-771.
- Levy JA (1998) *HIV and the Pathogenesis of AIDS*. 2^a ed. ASM. Washington, EEUU. 588 pp.
- Levy JA, Kaminsky LS, Morrow WJW, Steimer K, Luciw P, Dina D, Hoxie J, Oshiro L (1985) Infection by the retrovirus associated with the acquired immunodeficiency syndrome: clinical, biological and molecular features. *Ann. Intern. Med.* 103: 694-699.
- Luciw PA, Shacklett BL (1993) Molecular biology of the Human and Simian Immunodeficiency Viruses. En Morrow WJW, Haigwood NL (Eds.) *HIV. Molecular Organization, Pathogenicity and Treatment*. Elsevier. Holanda. pp. 123-220.
- Mansky LM, Temin HM (1996) Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J. Virol.* 69: 5087-5094.
- Markowitz M, Morales-Ramírez JO, Nguyen BY, Kovacs CM, Steigbigel RT, Cooper DA, Liporace R, Schwartz R, Isaacs R, Gilde LR, Wenning L, Zhao J, Teppler H (2006) Antiretroviral activity, pharmacokinetics, and tolerability of MK-0518, a novel inhibitor of HIV-1 integrase, dosed as monotherapy for 10 days in treatment-naïve HIV-1-infected individuals. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 43: 507-508.
- Mathée G, Wroight AD, Köning GM (1999) HIV Reverse Transcriptase inhibitors of natural origin. *Planta Med.* 65: 493-506.
- McKee TC, Fuller RW, Covington CD, Cardellina JHII, Gulankowski RJ, Krepps BL, McMahon JB, Boyd MR (1996) New pyranocoumarins isolated from *Calophyllum lanigerum* and *Calophyllum teysmannii*. *J. Nat. Prod.* 59: 754-758.
- McKee TC, Covington CD, Fuller RW, Bokesch HR, Young S, Cardellina JHII, Kadushin MR, Soejarto DD, Stevens PF, Cragg GM, Boyd MR (1998) Pyranocoumarins from tropical species of the genus *Calophyllum*: a chemotaxonomic study of extracts in the National Cancer Institute Collection. *J. Nat. Prod.* 61: 1252-1256.
- Min BS, Jung HJ, Lee JS, Kim YH, Bok SH, Ma CM, Nakamura N, Hattori M, Bae K (1999) Inhibitory effect of triterpens from *Crataegus pinnatifida* on HIV-1 protease. *Planta Med.* 65: 374-375.
- ONUSIDA/OMS (2007) *Situación de la Epidemia de SIDA: Informe Especial sobre la Prevención del VIH: Diciembre de 2007*. ONUSIDA/OMS. Ginebra, Suiza. 50 pp.
- Patil AD, Freyer AJ, Eggleston DS, Haltiwanger RC, Bean MF, Taylor PB, Caranfa MJ, Breen AL, Bartus HR, Johnson RK, Hertzberg RP, Westley JW (1993) The Inophyllins, Novel Inhibitors of HIV-1 Reverse Transcriptase isolated from the Malaysian Tree, *Calophyllum inophyllum* Linn. *J. Med. Chem.* 36: 4131-4138.

- Pengsuparp T, Serit M, Hughes SH, Soejarto DD, Pezzuto JM (1996) Specific inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase mediated by Soulatrolide, a coumarin isolated from the latex of *Calophyllum teysmanii*. *J. Nat. Prod.* 59: 839-842.
- Piccinelli AL, Cuesta-Rubio O, Barrios Chica M, Mahmood N, Pagano B, Pavone M, Baronee V, Rastrelli L (2005) Structural revision of clusianone and 7-epi-clusianone and anti-HIV activity of polyisoprenylated benzophenones. *Tetrahedron* 61: 8206-8211.
- Press N, Tyndall MW, Wood E, Hogg RS, Montaner JS (2002) Virologic and immunologic response, clinical progression, and highly active antiretroviral therapy adherence. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 31: S112-S117.
- Pullen KA, Champoux JJ (1990) Plus-strand origin for human immunodeficiency virus type 1: implications for integration. *J. Virol.* 64: 6274-6277.
- Raulin J (2002) Human immunodeficiency virus and host cell lipids. Interesting pathways in research for a new HIV therapy. *Prog. Lipid Res.* 41: 27-65.
- Reutrakul V, Chanakul W, Pohmakotr M, Jai-etch T, Yoosook C, Kasisit J, Napaswat C, Santisuk T, Prabpai S, Kongsaree P, Tuchinda P (2006) Anti-HIV-1 Constituents from Leaves and Twigs of *Cratoxylum arborescens*. *Planta Med.* 72: 1433-1435.
- Reyes-Chilpa R, Estrada-Muñiz E, Ramírez-Apan T, Amekraz B, Aumelas A, Jankowsky C, Vázquez Torres M (2004) Cytotoxic effects of mammea type coumarins from *Calophyllum brasiliense*. *Life Sci.* 75: 1635-1647.
- Sant'Ana PJP, Assad ALD (2004) Programa de pesquisa em produtos naturais: a experiência da Ceme. *Quim. Nova* 27: 508-512.
- Singh IP, Bharate S, Bhutani KK (2005) Anti-HIV natural products. *Curr. Sci.* 89: 269-290.
- Sarawak (2008) www.aidsmeds.com/drugs/calanolide-A.htm. Sarawak MediChem Pharmaceuticals Inc. Lemont, IL, EEUU. (Cons. 23/05/2008).
- Spino C, Dodier M, Sotheeswaran S (1998) Anti-HIV coumarins from *Calophyllum* seed oil. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8: 3475-3478.
- Stevens PF (1980) A revision of the old world species of *Calophyllum* (Guttiferae). *J. Arnold Arbor* 61: 117-171.
- Vlietnick AJ, De Bruyne T, Apers S, Pieters LA (1998) Plant-derived leading compounds for chemotherapy of Human Immunodeficiency Virus (HIV) infection. *Planta Med.* 64: 97-109.
- Wang JN, Hou CY, Liu LZ, Gil RR, Cordell GA (1994) Swertifrancheside, an HIV-reverse transcriptase inhibitor and the first flavone-xanthone dimer, from *Swertia franchetiana*. *J. Nat. Prod.* 57: 211-217.
- Wlodawer A, Erickson JW (1993) Structure-based inhibitors of HIV-1 protease. *Annu. Rev. Biochem.* 62: 543-585.
- Wong-Staal F, Gallo RC (1985) Human T-lymphotropic retroviruses. *Nature* 317: 395-403.
- Xu ZQ, Bukheit RW, Stup TL, Flavin MT, Khilevich A, Rizzo JD, Lin L, Zembower DE (1998) In vitro anti-human immunodeficiency virus (HIV) activity of the chromanone derivative, 12-oxocalanolide A, a novel NNRTI. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8: 2179-2184.
- Xu ZQ, Hollingshead MG, Borgel S, Elder C, Khilevich A, Flavin MT (1999) In vivo anti-HIV activity of (+)-calanolide A in the hollow fiber mouse model. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9: 133-138.
- Xu ZQ, Barrow WW, Suling WJ, Westbrook L, Barrow E, Lin YM, Flavin MT (2004) AntiHIV natural product (+)-calanolide A is active against both drug-susceptible and drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorg. Med. Chem.* 12: 1199-1207.
- Yang SS, Cragg GM, Newman DJ, Bader JP (2001) Natural Product-Based anti-HIV drug discovery and development facilitated by the NCI developmental therapeutics program. *J. Nat. Prod.* 64: 265-277.
- Zembower DE, Liao S, Flavin MT, Xu ZQ, Stup TL, Buckheit RWJr, Khilevich A, Mar AA, Sheinkman AK (1997) Structural analogues of the calanolide anti-HIV agents. Modification of the trans-10, 11-dimethyldihydropyran-12-ol ring (ring C). *J. Med. Chem.* 40: 1005-1017.

NATURAL COMPOUNDS FROM PLANTS OF THE CLUSIACEAE FAMILY: TYPE 1 HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS INHIBITORS

Ricardo Reyes Chilpa and Maira Huerta Reyes

SUMMARY

AIDS being a worldwide public health problem, it is necessary to coordinate efforts to fight the disease. Under this viewpoint, we review research aiming at the discovery and development of new drugs against the human immunodeficiency virus (HIV) from secondary metabolites of vegetal origin, isolated from species of

the clusiaceae family. Particularly, the review centers on tetracyclic coumarines that inhibit the HIV-1 reverse transcriptase, such as the (+)-calanolide A. A summary of HIV biology and the studies carried out in Mexico concerning the search of anti-HIV compounds from the local flora is also presented.

COMPOSTOS NATURAIS DE PLANTAS DA FAMÍLIA CLUSIACEAE: INIBIDORES DO VIRUS DE IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA TIPO 1

Ricardo Reyes Chilpa e Maira Huerta Reyes

RESUMO

A AIDS é um problema de saúde pública mundial, pelo qual é necessário coordenar os esforços para combater esta enfermidade. Nesta perspectiva, se revisam as investigações tendentes ao descobrimento e desenvolvimento de novos fármacos contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV) a partir de metabólitos secundários de origem vegetal isolados de espécies da família

Clusiaceae. Em particular, a revisão é focada nas cumarinas tetracíclicas inibidoras da transcriptase reversa do HIV-1, como o (+)-calanolide A. Também é apresentado um esboço sobre a biologia do HIV e dos estudos levados a efeito no México referentes à procura de compostos anti-HIV a partir da flora local.