



Mecanismos de acción de compuestos antivirales aislados en plantas: el Virus de la Inmunodeficiencia Humana como modelo.

Manuel Okatami Perera Lecoin ¹.

¹okacom@gmail.com

Correspondencia: Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina - Universidad Central de Venezuela.

Consignado el 15 de Julio del 2007 a la Revista Vitae Academia Biomédica Digital.

RESUMEN

El SIDA causa más de 3 millones de muertes anualmente a nivel mundial, siendo el VIH el agente etiológico de la enfermedad. Actualmente no existe una vacuna efectiva contra el VIH, por lo que las estrategias adoptadas para enfrentar la epidemia están enfocadas hacia la prevención de nuevas infecciones y el desarrollo de fármacos dirigidos contra el virus. Estas drogas han permitido prolongar la esperanza de vida de los pacientes con SIDA, pero su alto costo, escasa disponibilidad y efectos adversos, han motivado el hallazgo de nuevos compuestos de origen natural con actividad anti-VIH que no resulten nocivos, sean accesibles y de bajo costo. La búsqueda se ha concentrado en plantas debido a su amplio registro etnomedicinal, por lo que la

presente revisión bibliográfica pretende describir y analizar los mecanismos de acción de las sustancias anti-VIH obtenidas de plantas. Estos agentes actúan a diferentes niveles de la replicación viral y sobre distintos blancos, permitiendo vislumbrar la posibilidad de generar nuevos tratamientos que permitan combatir eficazmente la enfermedad.

PALABRAS CLAVE: SIDA, IF, INRT, INNRT.

MECHANISM OF ACTION OF ANTIVIRAL COMPOUNDS ISOLATED FROM PLANTS: HIV VIRUS AS A MODEL.

SUMMARY

AIDS is responsible for more than 3 million deaths annually worldwide and the HIV is the etiologic agent of the disease. At the moment, there isn't an efficient vaccine against HIV, thus the strategies adopted to face the epidemic have been focused on the prevention of new infections and to the development of medicaments against the HIV. These drugs have been able to increase the life expectancy of AIDS patients, but their high cost, scarce availability and adverse effects have led to find new compounds with anti-HIV activity which would be harmful, accessible and not expensive. Research has focused in plants because of their extensive ethnomedicinal reports. Therefore, the present review pretends to analyze and describe the mechanisms of action of anti-HIV substances obtained from plants. These agents have different targets and act at different levels of viral replication, suggesting the possibility of new treatments which could deal efficiently with the disease.

KEY WORDS: AIDS, FI, NRTI, NNRTI.

INTRODUCCIÓN

El SIDA (Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida) es hoy en día una de las enfermedades infecciosas que causa mayor número de muertes anualmente. Para el año 2005, 40.3 millones de personas padecían de SIDA y 3.1 millones de individuos fallecieron por enfermedades relacionadas con este síndrome, de los cuales 2.400.000 eran originarios del África sub-sahariana. Esta es la región más afectada, con más de 25 millones de infectados y el mayor número de nuevos casos (3.2 millones en 2005). (Zarocostas, 2005). El agente causal del SIDA es el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el cual fue descubierto en 1983 por un equipo de investigadores del Instituto Pasteur en París, aunque no fue sino hasta 1984 que el hallazgo tomó relevancia tras la confirmación por parte de investigadores estadounidenses de que un retrovirus era el responsable de la enfermedad (Hirsch y Curran, 1996). Éste virus causa una disminución progresiva de los linfocitos T CD4⁺, ya que estos constituyen el principal blanco del virus. Debido a que estas células forman parte importante del mecanismo de defensa del organismo, ello favorece la aparición de infecciones oportunistas que resultan letales (Sierra *et al*, 2005).

El VIH puede ser dividido en dos tipos, VIH-1 y VIH-2, en base a las propiedades serológicas y al análisis de las secuencias del genoma viral (Luciw, 1996). El VIH-1 se subdivide en nueve subtipos o clados (A a I) y es el virus que muestra la mayor prevalencia a escala mundial, siendo predominante en Asia, África, Europa y América. El VIH-2 se subdivide en 5 subtipos (A a E), exhibe un periodo de latencia superior al del VIH-1 y es la forma predominante en algunos países de África occidental, aunque se ha expandido a Europa (particularmente a Portugal) y a la India (Luciw, 1996. Weiss, 2000). El análisis de la secuencia nucleotídica relaciona los genomas del VIH

con virus de la inmunodeficiencia aislados en simios (SIV), por lo que se cree que el VIH se introdujo en las poblaciones humanas por zoonosis (Weiss, 2000).

Debido a que el SIDA representa un problema de salud a escala mundial, muchas investigaciones se han dirigido al estudio de la biología del VIH con la finalidad de determinar posibles blancos terapéuticos o desarrollar medidas preventivas efectivas contra la enfermedad. La elaboración de una vacuna contra el VIH ha sido infructuosa debido a la alta tasa de variabilidad genética del virus, que provoca la aparición continua de formas virales mutantes que logran evadir eficazmente el sistema inmune del hospedador (Esparza, 2005). Esto ha llevado al diseño de estrategias alternativas para combatir la pandemia. Una de ellas consiste en lanzar campañas de educación destinadas a prevenir nuevas infecciones. Según el Programa de las Naciones Unidas para el SIDA, una campaña efectiva de información podría reducir a menos de 2 millones el número de nuevas infecciones anuales, pero esto requeriría una inversión de 15 a 20 billones de dólares anuales en los países en vías de desarrollo, una suma insostenible dada su situación económica (Esparza, 2005).

Por otro lado, se han desarrollado fármacos con el objeto de combatir la infección. En los últimos años han aparecido en el mercado medicamentos (Tabla 1) que si bien no erradican por completo la infección, sí permiten aumentar considerablemente la esperanza de vida de los pacientes que los utilizan. Estos medicamentos se clasifican según su mecanismo de acción en inhibidores de la proteasa, inhibidores de la fusión e inhibidores de la retrotranscriptasa. Éstos últimos se pueden separar a su vez en nucleosídicos y no nucleosídicos (Tabla 1).

No obstante, menos del 7% de la población infectada con VIH tiene acceso a estos tratamientos debido a sus altos costos y escasa disponibilidad (Esparza, 2005). Asimismo, el uso de estos medicamentos puede causar efectos adversos como diarreas, dolores de cabeza, anemia, anorexia, dolores abdominales, erupciones, entre otros (Mullin *et al*, 1999). Debido a que el 80% de las personas que viven en países en vías de desarrollo dependen casi exclusivamente de la medicina tradicional para remediar sus problemas de salud, ha resultado particularmente interesante la búsqueda de terapias anti-VIH basadas en compuestos naturales antivirales presentes en organismos vivos (Cos *et al*, 2004). Este tipo de investigaciones permitiría elaborar tratamientos accesibles y de bajo costo que combatan eficazmente el SIDA en los países que más lo requieren. Ello ha motivado la búsqueda de dichas sustancias principalmente en plantas, debido a que existe un registro extenso de su uso etnomedicinal (Cos *et al*, 2004).

Tabla 1. Lista de las drogas antivirales aprobadas para el tratamiento del VIH.

Droga			Tipo de compuesto	Mecanismo de acción
Zidovudina	ó	AZT,	Inhibidores nucleosídicos de la RT (INRT)	Bloquean la retrotranscripción puesto que son análogos nucleosídicos o nucleotídicos que carecen del grupo hidroxilo en la posición 3' de la ribosa.
Didanosina	ó	ddl,		
Zalcitabina	ó	ddC,		
Stavudina	ó	d4T,		
Lamivudina	ó	3TC,		
Abacavir ó ABC,		Tenofovir.		

Nevirapina, Delavirdina, Efavirenz.	Inhibidores nucleosídicos de la RT (INNRT)	noSe unen específicamente a la RT de VIH-1 alterando el sitio activo de la enzima y reduciendo la unión de los nucleótidos naturales
Saquinavir, Ritonavir, Indinavir, Nelfinavir, Amprenavir, Lopinavir.	Inhibidor de la proteasa (IP)	Consisten en moléculas que mimetizan los sitios de clivaje del polipéptido Gag-pol y por lo tanto compiten con él por la proteasa. Esto lleva a la producción de partículas virales inmaduras no infecciosas.
Enfurtivida.	Inhibidor de la fusión (IF)	Son péptidos que se unen a la proteínas gp 41y bloquean la fusión de la membrana viral con la membrana celular.

(Adaptado de Sierra et al, 2005).

Asimismo, numerosas investigaciones han demostrado que una amplia gama de agentes virales es susceptible al tratamiento con extractos de plantas. En efecto, ciertos compuestos naturales como los flavonoides, terpenoides, lignanos, alcaloides, y saponinas, entre otros, exhiben una actividad antiviral contra virus como el de la influenza, los de la hepatitis B y C, el del herpes simple, los poliovirus de tipo I y los rotavirus (Jassim y Naji, 2003). Las investigaciones con el VIH han suministrado resultados alentadores con el descubrimiento de ciertos flavonoides, cumarinas, polisacáridos no sulfatados, triterpenos y proteínas que exhiben actividad anti-VIH actuando sobre diferentes etapas del ciclo de replicación. Debido a la importancia que tiene el encontrar tratamientos efectivos contra el SIDA, el objetivo del presente trabajo es realizar una revisión bibliográfica que permita describir y analizar los mecanismos de acción de algunos compuestos naturales aislados en plantas con propiedades anti-VIH, para su potencial uso como agentes antiretrovirales.

MECANISMOS DE REPLICACIÓN DEL VIH

Antes de discutir los trabajos relacionados con las propiedades anti-VIH de algunos compuestos naturales, es importante comprender los pasos del ciclo de multiplicación del virus, ya que ello permitirá entender cómo y donde actúan estas sustancias.

El VIH pertenece al género *lentivirus* de la familia *Retroviridae*. Los viriones maduros miden entre 100 y 120 nm de diámetro y presentan una membrana lipídica que rodea una nucleocápside de forma cónica en la que se encuentra el genoma viral y ciertas proteínas virales (Figura 1): la retrotranscriptasa, la proteasa, la integrasa y las proteínas Vif, Vpr, Nef, Vpu (en el caso del VIH de tipo 1) y Vpx (en el caso del VIH-2) (Luciw, 1996. Sierra *et al*, 2005). También se encuentran ciertos factores celulares, en particular a nivel de la membrana del virión que es adquirida cuando la partícula viral gema a través de la membrana plasmática de la célula durante la última fase de la infección (Sierra *et al*, 2005).

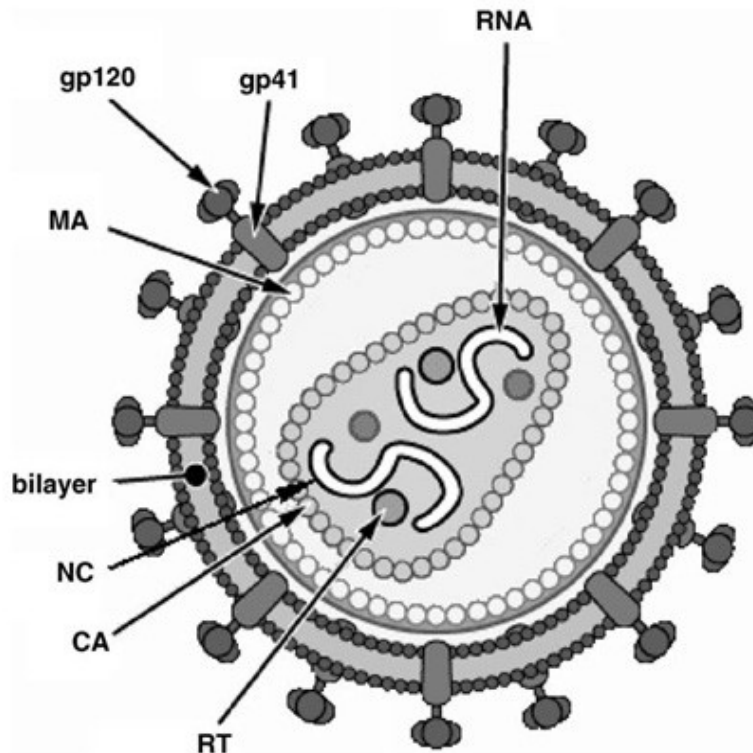


Figura 1: Diagrama de viriones de VIH maduros. Se muestran las proteínas superficiales del virión (gp 120 y gp 41), la bicapa lipídica, las proteínas de la matriz (MA) que forman una cubierta alrededor de la nucleocápside cónica. Esta última está constituida por las proteínas de la cápside (CA) y protege las moléculas de RNA que constituyen el genoma viral. Además contiene numerosas proteínas virales entre las que se encuentran las de la nucleocápside (NC) y las retrotranscriptasas (RT) (Tomado de Sierra *et al*, 2005).

El genoma está constituido por dos moléculas idénticas de RNA de simple cadena de 9.2 kb, con polaridad positiva y que sirven de templado para la retrotranscriptasa viral. Esta enzima transforma el RNA viral de simple cadena en DNA de doble cadena que luego se incorpora al genoma del hospedador. La forma viral integrada y latente se denomina provirus. El genoma proviral presenta una región codificante central en la que se encuentran los genes virales, algunos de los cuales se encuentran solapados (Figura 2) (Luciw, 1996).

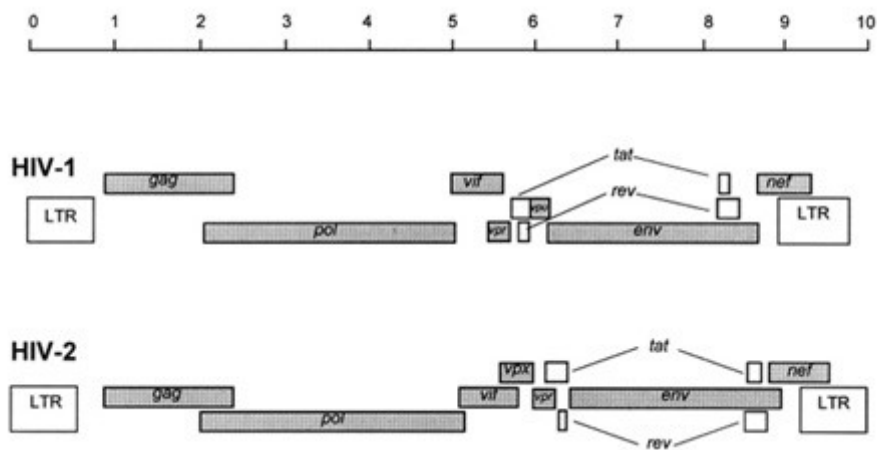


Figura 2: Genomas del VIH-1 y 2. Las regiones codificantes se encuentran flanqueadas por secuencias de DNA redundantes denominadas LTR (Long Terminal Repeats) que intervienen en la regulación de la expresión génica (Tomado de Weiss, 2000).

Flanqueando a la región codificante se encuentran secuencias de DNA redundantes (idénticas tanto en el extremo 3' como en el extremo 5') denominadas LTRs (del inglés ?Long Terminal Repeats?). Las LTRs son regiones reguladoras de la expresión génica y se encuentran divididas en tres dominios con distintas funciones (U3, R y U5) (Coffin, 1996). El dominio U3 contiene elementos promotores de la transcripción y secuencias reconocidas por otros factores celulares que modulan la transcripción al influir en la tasa de iniciación. El dominio R presenta el elemento de respuesta de activación en *trans* (Tar, del inglés ?*trans*-activation response element?). Tar es una secuencia nucleotídica que se encuentra tanto en el RNA como el DNA viral formando un bucle que es reconocido por la proteína viral Tat. Ésta controla la expresión de los genes virales (Luciw, 1996. Coffin, 1996).

La transcripción se inicia en el límite entre la región U3/R y los transcritos que se producen tienen las modificaciones características de los RNAm eucarióticos: un extremo 5' poliadenilado y una caperuza de 7-metil-guanosina en el extremo 3' (Cann, 2001). Los genes virales y la función de sus respectivos productos aparecen señalados en la Tabla 2. La infección con el VIH comienza cuando los viriones se unen a las células mediante la interacción entre la glicoproteína gp120, presente en la cubierta viral, y el receptor celular CD4 situado en la membrana plasmática de macrófagos y linfocitos T colaboradores, aunque se han encontrado receptores alternativos como la galactosil ceramida en células CD4⁺ (Luciw, 1996. Sierra *et al*, 2005). La unión de la gp120 al receptor CD4 causa un cambio conformacional en la glicoproteína exponiendo una región que se une a los co-receptores celulares CCR5 y CXCR4. Éstos determinan el tropismo de las cepas de VIH: las que utilizan el co-receptor CXCR4 infectan los linfocitos T (T trópicas), mientras que las que interaccionan con CCR5 infectan a macrófagos y monocitos (M-trópicas) (Princen y Schols, 2005). Después de la unión a los co-receptores, la membrana viral se fusiona con la membrana celular y la nucleocápside es liberada al citoplasma (Figura 3) (Luciw, 1996).

Tabla 2. Nomenclatura, función y localización de las proteínas codificadas por el genoma viral

Gen	Proteína	Función	Localización

Gag	Pr55 gag	Dirige el ensamblaje de los viriones; poliproteína precursora de las proteínas de la nucleocápside: matriz (MA o p17), cápside (CA o p24), nucleocápside (NC o p9) y p7	Nucleocápside del virión
Pol	Pr 160 gag-pol	Poliproteína precursora de las enzimas virales: proteasa (PR o p10), retrotranscriptasa o RNasa-H (RT o p51/p66) e integrasa (IN o p32)	Virión
Vif	P23	Interviene en la decapsidación del virión; limita el efecto antiretroviral de la proteína celular APOBEC3G al favorecer su degradación; participa en la decapsidación	Citoplasma celular
Vpx (solo presente en VIH-2)	P16	Permite que el DNA viral llegue al núcleo celular	Virión celular
Vpr	P15	Ayuda a detener el ciclo celular y evitar la proliferación de las células; permite que el DNA viral llegue al núcleo celular	Virión
Tat	P14	Transactivador transcripcional: se une a TAR y a factores celulares promoviendo la elongación y la formación de complejos de iniciación	En el núcleo celular
Rev	P19	Transcativador post-transcripcional: se une a RRE y a factores celulares regulando el ?splicing?, el transporte al citoplasma y la traducción de los transcritos.	En el núcleo celular
Vpu (solo presente en VIH-1)	P16	Induce la degradación de las moléculas de CD4; forma poros transportadores de iones que incrementan la liberación de virus	Proteína de membrana celular
Env	Gp 160	Secuestra las moléculas de CD4 a nivel del retículo endoplasmático; poliproteína	Envoltura del virión y en la

		precursora de las proteínas de la membrana envoltura: • Superficie (SU o gp120): Proteína de unión al receptor CD4 • Transmembrana (TM o gp41): Proteína de fusión a la membrana	membrana plasmática
Nef	P 27	Acelera la endocitosis y subsecuente degradación de las moléculas de CD4 así como las moléculas del MHC de tipo I y II; interviene en la decapsidación; favorece la transcripción mediada por el intensificador celular NF- κ B	Citoplasma, membrana plasmática

(Adaptado de Luciw, 1996 y Sierra et al, 2005).

Una vez en el citoplasma, ocurre la decapsidación de la nucleocápside viral mediante la acción de factores celulares y de las proteínas virales MA, Nef y Vif (Sierra et al, 2005). El RNA viral que se libera se retrotranscribe generando DNA de doble cadena. Este proceso requiere de un cebador constituido por una molécula de tRNA^{lys} que se encuentra ubicada cerca del extremo 5' del RNA viral unida a una secuencia denominada PBS (Primer Binding Site) (Luciw, 1996).

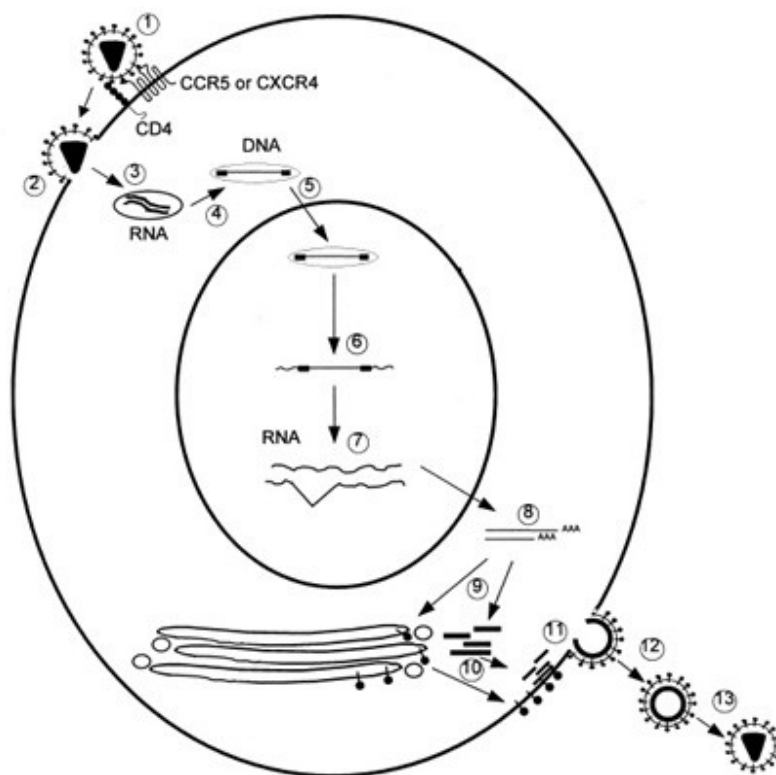


Figura 3. Ciclo de replicación del VIH. Se muestran las diferentes etapas del ciclo. 1) Adsorción, 2) Fusión, 3) Entrada, 4) Transcripción reversa, 5) Transporte al núcleo, 6) Integración cromosomal del genoma proviral, 7) Transcripción del RNA, 8) Exportación nuclear del RNA, 9) Traducción y procesamiento, 10) Transporte a la membrana, 11) Ensamblaje, 12) Gemación, 13) Maduración (Tomado de Weiss, 2000).

La primera cadena de DNA se extiende hacia el extremo 5' del RNA viral generando un pequeño fragmento que es complementario al dominio R del genoma viral (Cann, 2001). La actividad RNasa H de la RT degrada el complejo RNA/DNA y libera el DNA recién sintetizado que se une al dominio R del extremo 3' del RNA viral (Figura 4). Esta es la primera transferencia de hebra y viene seguida por la síntesis integral de la primera cadena de DNA. La segunda hebra de DNA requiere de la presencia de dos cebadores situados en la cadena de DNA que sirve de templado: dos motivos polipurínicos (PPT) situados en el límite del dominio U3 y al final del gen *pol* (cPPT). La síntesis de DNA que se inicia en el límite de U3 genera un fragmento que se une al extremo 3' del DNA molde por complementariedad y que se sigue extendiendo hacia el extremo 5' del mismo por la acción de la RT (Figura 4). Simultáneamente, se lleva a cabo la síntesis de DNA desde cPPT hacia el extremo 5' del DNA molde, de manera tal que se generan dos fragmentos de DNA con una secuencia repetida de alrededor de 100 nucleótidos. Esta secuencia es

desplazada, escindida y los dos fragmentos de DNA son ligados por la acción de enzimas celulares, generando el DNA lineal de doble cadena (Luciw, 1996. Cann, 2001).

La retrotranscripción es el principal proceso responsable de la diversidad antigénica del virus ya que la retrotranscriptasa carece de la actividad exonucleasa 3'-5', presente en las DNA polimerasas celulares, por lo que la tasa de mutaciones es muy superior a la que se registra en células eucariotas. Se estima que el genoma viral experimenta de una a tres mutaciones por ciclo de replicación (Luciw, 1996).

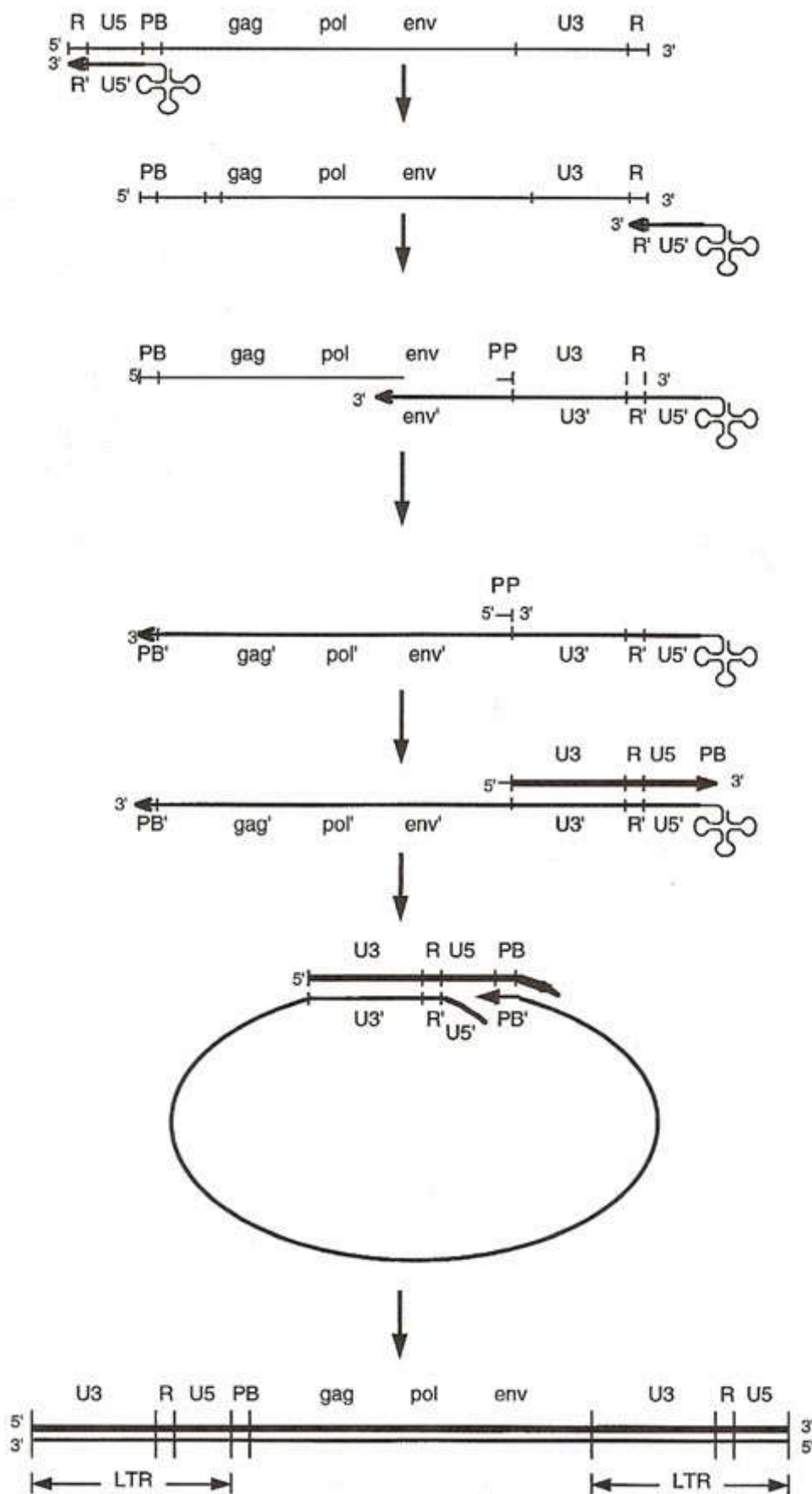


Figura 4: Mecanismo de la retrotranscripción. Ver detalles en el texto (Tomado de Coffin, 1996).

Una vez sintetizado el DNA viral, éste se dirige al núcleo mediante la acción de Vpr, una proteína que ancla el DNA viral a la membrana nuclear permitiendo que penetre al núcleo a través de los poros nucleares (Sierra *et al*, 2005). El DNA es incorporado al genoma del hospedador mediante la acción de la integrasa viral que realiza cortes escalados en los genomas celular y viral, uniéndolos y rellenando los espacios dejados por las bases no pareadas (Cann, 2001). Las primeras rondas de transcripción llevadas a cabo por la RNA polimerasa II celular sobre el DNA viral integrado, generan varios transcritos que migran al citoplasma mediante una vía independiente de Rev. Durante esta fase de replicación temprana se producen múltiples cortes y empalmes de los RNAm y sólo las proteínas regulatorias Tat, Nef y Rev se expresan. Al alcanzar niveles suficientes, Tat se une a Tar y controla la transcripción de los genes virales. Cuando Rev alcanza niveles adecuados, se une a una estructura de los transcritos denominada elemento de respuesta a Rev (RRE) facilitando su paso a través de la membrana nuclear y protegiéndolos del ? splicing?, de manera que se generan RNAm sin cortes o con un único corte que producen las otras proteínas virales y el RNA genómico (Sierra *et al*, 2005). El gen *env*, que codifica para las proteínas de unión a CD4 (gp120) y para las proteínas virales transmembranales (gp41), se expresa inicialmente como una poliproteína precursora denominada gp160. Ésta es glicosilada dentro del retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, en donde una endoproteasa escinde la proteína para generar gp120 y gp41 (Luciw, 1996). Estas proteínas son transportadas por vesículas celulares hasta la membrana plasmática. Los genes *gag-pol* se traducen para generar la poliproteínas Gag y Gag-pol que son las precursoras de las 6 proteínas estructurales codificadas por *gag* y las proteasas, integrasas y retrotranscriptasas codificadas por *pol*. Estas poliproteínas son procesadas proteolíticamente durante la maduración (Sierra *et al*, 2005). Después de la traducción, las proteínas Gag y Gag-pol migran hacia la membrana celular y empiezan a ensamblarse dirigidas por Gag. Debido a que las proteínas virales se expresan sobre la superficie celular, se puede producir la fusión entre células infectadas y células sanas que expresen el receptor CD4 generando células gigantes multinucleadas (sincitios). La formación de sincitios constituye uno de los mecanismos de propagación del virus y es parcialmente responsable de la disminución progresiva del número de linfocitos T característico del SIDA (Geleziunas y Greene, 2000). Durante el ensamblaje de las partículas virales se asocian las enzimas virales, el genoma viral, el cebador celular RNAt^{lys} y otros compuestos celulares. Los viriones inmaduros geman a través de la membrana plasmática, lo que activa la proteasa viral que escinde las poliproteínas Gag y Gag-pol, liberando las proteínas estructurales y las enzimas (Sierra *et al*, 2005). Todas ellas interactúan con las proteínas de la cápside (CA) y de la nucleocápside (NC) para generar los viriones maduros. El proceso de ensamblaje y gemación requiere de la disminución del número de moléculas CD4 celulares para evitar su interacción con las proteínas gp120 recién sintetizadas. En este proceso intervienen las proteínas Env, Nef y Vpu. La primera se une a las moléculas de CD4 que pasan por el retículo endoplasmático durante su maduración, mientras que la segunda acelera la endocitosis y la degradación subsecuente de CD4. La proteína Vpu produce canales iónicos en la membrana plasmática que incrementan la tasa de liberación de virus (Luciw, 1996. Sierra *et al*, 2005).

Una vez conocido en detalle el mecanismo molecular mediante el cual el virus lleva a cabo su multiplicación, muchos investigadores se han enfocado en desarrollar terapias que bloqueen algunos de los pasos antes descritos. En particular, ciertos grupos de investigación han centralizado su interés en estudiar como actúan los diferentes compuestos naturales con propiedades anti-VIH aislados de plantas.

COMPUESTOS NATURALES DE PLANTAS CON ACTIVIDAD ANTI-VIH

En los últimos años se han descubierto en las plantas una amplia gama de moléculas que inhiben la infección por VIH, al actuar sobre diferentes etapas del ciclo de replicación viral, desde fases tempranas hasta fases más tardías.

Sustancias que actúan en etapas tempranas del ciclo de replicación viral.

Se considera que la adsorción de la partícula viral y la fusión a la célula diana constituyen las etapas tempranas del ciclo de replicación viral. Se han identificado compuestos que son capaces de actuar solamente sobre dichas fases, inhibiendo así la entrada del virus a la célula hospedadora.

Los inhibidores de la adsorción: la fracción polisacárida de *Rhizophora apiculata*.

Los manglares del género *Rhizophora* se encuentran distribuidos a lo largo de las costas orientales de África, así como en el sureste de Asia y en Oceanía. Las hojas y la corteza de estas plantas han sido tradicionalmente utilizadas en esas regiones como antisépticos y para tratar diarreas, fiebres, disentería, lepra y malaria (Duke, 2005). En tal sentido, un grupo de investigadores tomó la iniciativa de estudiar el efecto antiviral de esta planta sobre la infección por VIH. Estudios previos habían demostrado que los polisacáridos sulfatados son inhibidores de la multiplicación *in vitro* del VIH 1 y 2, siendo la heparina, el pentosan polisulfato y los sulfatos de dextrina y dextrano los de mayor efecto. Estos compuestos inhiben la adsorción viral al interferir en la unión de la proteína gp120 al receptor CD4 (Cos *et al*, 2004). Así, Premanathan *et al*. (1999) decidieron investigar si se obtenía el mismo efecto sobre el VIH con las fracciones polisacáridas obtenidas de las hojas de *Rhizophora apiculata* (RAP). Para ello, los autores realizaron la purificación previa de los polisacáridos de la hoja de la planta y luego elaboraron ensayos de inhibición de la citopatogenicidad y replicación del virus.

Para estimar la inhibición de la citopatogenicidad, Premanathan *et al*. (1999) investigaron el efecto de RAP sobre la viabilidad celular y la formación de sincitios en células infectadas con VIH. La disminución de la viabilidad celular fue determinada a través de la disminución de la actividad de una deshidrogenasa mitocondrial, medida por la acción de esta enzima sobre el sustrato MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio), el cual es oxidado originando un producto cristalino azul que puede solubilizarse en medio ácido y cuya absorbancia se mide a 540 nm (Pauwels *et al*, 1988). La inhibición de la formación de sincitios fue determinada mediante el método de exclusión de azul de tripano. Este último es un colorante que sólo penetra en las células que han perdido la integridad de su membrana plasmática (Pauwels *et al*, 1988), así que aquellas que formen sincitios incorporarán el compuesto. Por otro lado, Premanathan *et al*. (1999) estimaron la inhibición de la replicación mediante la producción de antígenos virales y la Activación Multinuclear del Indicador de la Galactosidasa (en inglés, MAGI). La medición de antígenos virales se realizó mediante el método de inmunofluorescencia indirecta, mientras que la detección específica de la proteína p24 se hizo por el método de ELISA. El ensayo MAGI permite determinar el número de partículas infecciosas de VIH en una muestra particular y se basa en la expresión de la enzima β -galactosidasa en células transfectadas con el gen *lacZ* (células MAGI). Este se encuentra asociado al promotor viral Tar, por lo que su transcripción sólo se inicia cuando el virus penetra a las células e inicia su replicación, produciendo la proteína Tat que controla la transcripción genética al unirse a Tar. El número de

células infectadas se puede calcular contando todas aquellas que se tornan azules en presencia de un sustrato adecuado de la β -galactosidasa (Kimpton y Emerman, 1992). En todos los ensayos anteriores, los autores demostraron que las fracciones RAP inhibían la replicación viral y la citopatogenicidad causada por cepas de VIH-1 y 2 en diversas células de cultivo (Premanathan *et al*, 1999). En efecto, a concentraciones relativamente bajas, los compuestos ensayados disminuyeron a la mitad el número de células azules en ensayos MAGI (ver en la Tabla 3 la EC₅₀, definida como la concentración efectiva de polisacáridos necesaria para reducir en un 50% la citopatogenicidad inducida por el virus o la replicación viral). Al evaluar la citotoxicidad de los compuestos sobre células no infectadas, se registró un daño celular considerable a concentraciones altas de los polisacáridos (ver la CC₅₀ en la Tabla 3, que representa la concentración de RAP necesaria para disminuir en un 50% la viabilidad de células sanas), generando un índice de selectividad alto (SI = CC₅₀/EC₅₀) que reflejó cuan aptos eran los compuestos para disminuir la replicación viral sin causar daño a las células. En células T MT-4 infectadas con diferentes cepas de VIH 1 y 2, los polisacáridos inhibieron efectivamente (índice de selectividad > 100) la citopatogenicidad y la producción de antígenos virales asociadas a las infecciones virales (ver Tabla 3). No obstante, tuvieron un menor efecto inhibitorio sobre cepas resistentes a dos INNRT como la nevirapina (HE-NEV) y la emivirina (IIB-R), sugiriendo la posibilidad de que RAP actúe sobre la RT viral de forma similar a estos inhibidores. La prevención de la formación de sincitios entre células T infectadas con VIH-1 y células T sanas, fue directamente proporcional a la cantidad de RAP, pero la concentración necesaria para obtener una inhibición del 50% fue 4 veces mayor a la de sulfato de dextrano.

La EC₅₀ representó la concentración de compuesto necesaria para disminuir en un 50% el número de células MAGI azules y la cantidad de antígenos virales con relación a los controles no tratados con el extracto. En el caso de los ensayos colorimétricos con MTT, la EC₅₀ se definió como la cantidad de RAP requerida para aumentar en un 50% la absorbancia de las células con relación a células no expuestas a RAP. La CC₅₀ fue la concentración de extracto que disminuyó en un 50% la viabilidad celular con respecto a células sanas no expuestas a los compuestos. El índice de selectividad (SI) representa cociente CC₅₀/EC₅₀ (Premanathan *et al*, 1999). Los ensayos de detección de p24 realizados en células periféricas mononucleares de la sangre (PBMC) mostraron un EC₅₀ relativamente alto en relación con el CC₅₀, obteniendo un SI bastante bajo (44), lo que reflejó una menor eficiencia de RAP a la hora de inhibir la infección en células mononucleares aisladas de pacientes sanos (Premanathan *et al*, 1999).

Tabla 3. Actividad anti-VIH de RAP sobre diversas líneas celulares infectadas con diferentes cepas virales.

Virus strain	Cells	Assay	Day of analysis	EC ₅₀ (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)	SI
HIV-1						
IIB	MT-4	MTT	5	6.5 ± 2.0	1545.7 ± 272.3	237.8
IIB	MT-4	Ag expression	3	10.7 ± 3.9		144.5
IIB	PBMC	p24	16	25.9 ± 4.2	1136.9 ± 180.3	44.0
IIB-R ^b	MT-4	MTT	5	28.6 ± 2.6		54.0
HE-NEV ^c	MT-4	MTT	5	40.6 ± 6.4		38.1
JR-FL ^d	MAGI-CCR5	MAGI	3	16.6 ± 2.6	1427.1 ± 336.1	86.0
HIV-2						
ROD	MT-4	MTT	5	10.2 ± 4.6		151.5
SIV						
MAC	MT-4	MTT	5	24.3 ± 3.7		63.6

La EC50 representó la concentración de compuesto necesaria para disminuir en un 50% el número de células MAGI azules y la cantidad de antígenos virales con relación a los controles no tratados con el extracto. En el caso de los ensayos colorimétricos con MTT, la EC50 se definió como la cantidad de RAP requerida para aumentar en un 50% la absorbancia de las células con relación a células no expuestas a RAP. La CC50 fue la concentración de extracto que disminuyó en un 50% la viabilidad celular con respecto a células sanas no expuestas a los compuestos. El índice de selectividad (SI) representa cociente CC50/EC50 (Premanathan *et al*, 1999)

Debido a que los polisacáridos sulfatados con actividad antiviral actúan al nivel de la adsorción del virus, los mismos autores decidieron estudiar si el efecto antiviral de RAP se debía a su interacción sobre la unión de los viriones a células T. Para tal fin, las células MT-4 se infectaron con una cepa de VIH-1 en presencia o ausencia de RAP y se incubaron con un anticuerpo policlonal aislado de un paciente infectado con VIH. Posteriormente se agregó un anticuerpo de conejo dirigido contra las inmunoglobulinas humanas y conjugado a fluoresceína, una molécula que fluoresce a determinada longitud de onda. Las células marcadas de este modo se analizaron en un citómetro de flujo (Schols *et al*, 1989). En las células infectadas tratadas con el extracto, los dos picos de fluorescencia se solaparon (Figura 5), indicando un bloqueo en la unión de los anticuerpos primarios anti-VIH a los viriones. Por lo tanto concluyeron que RAP actuaba inhibiendo la adsorción viral, lo que se vio confirmado al medir la expresión del RNAm viral mediante ensayos cuantitativos de RT-PCR. En este último ensayo, al tratar las células con los polisacáridos durante la adsorción viral se redujo significativamente la cantidad de RNAm viral, mientras que al tratar las células después de la fase de adsorción no se observó efecto.

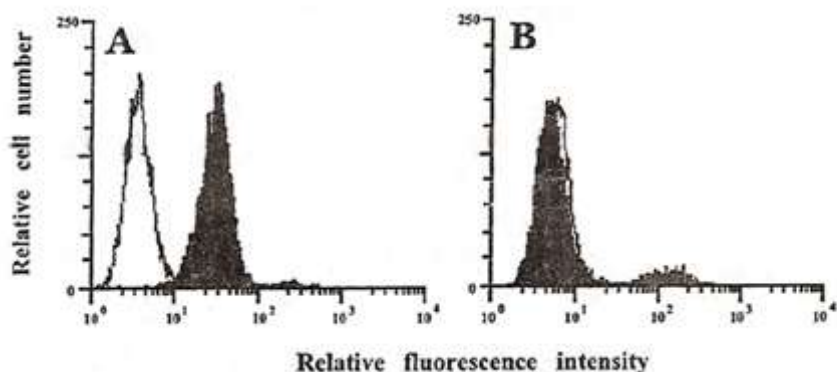


Figura 5. Efecto de RAP sobre la unión del VIH-1 a células MT4. El pico de área blanca representa la fluorescencia resultante de la unión inespecífica de los anticuerpos anti-VIH-1 a las células sin infectar, mientras que el pico de color negro representa la fluorescencia provocada por la unión específica de los anticuerpos a las células infectadas con el VIH-1 en ausencia (A) y en presencia de 100 µg/mL de RAP (B) (Premanathan *et al*, 1999).

Por otro lado, Premanathan *et al*. (1999) observaron que RAP previno la formación de sincitios sin afectar la unión de anticuerpos dirigidos contra CD4, CXCR4 y CCR5, indicando que la inhibición de la adsorción podría deberse a la interacción de RAP con la proteína gp120. Los grupos sulfato de muchos polisacáridos son los responsables de este efecto. Sin embargo, no se detectaron grupos sulfatados en las fracciones RAP, representando una categoría novedosa de polisacáridos con propiedades anti-VIH (Premanathan *et al*, 1999). En la prevención de la adsorción podrían estar interviniendo los grupos carboxilados de los ácidos urónicos detectados en las fracciones

RAP. Estos, al igual que los grupos sulfatados, tienen un carácter aniónico y podrían interactuar con los residuos básicos de gp120.

OTROS INHIBIDORES DE LA ADSORCIÓN: EL ÁCIDO REPANDUSÍNICO DE PHYLLANTHUS NIRURI.

Existen otros compuestos que actúan al nivel de la adsorción. Tal es el caso del ácido repandusínico (AR) aislado de *Phyllanthus niruri*. Ésta es una hierba medicinal que se ha empleado como diurético y para el tratamiento de la ictericia. En experimentos previos se reportó que el extracto acuoso de la planta presentaba un efecto antiviral al actuar sobre la DNA polimerasa del virus de la hepatitis B y sobre la RNA polimerasa del virus de la mieloblastosis aviar (Ogata *et al*, 1992). Aunque se ha encontrado que el AR es un inhibidor de la actividad de la RT del VIH-1, como se describirá más adelante, Ogata *et al*. (1992) observaron que el compuesto también podía operar sinérgicamente con el AZT (un INRT de actividad anti-VIH conocida), probablemente debido a su capacidad para inhibir la adsorción viral. En efecto, al realizar ensayos de viabilidad celular sobre células T infectadas en presencia de AR y sulfato de dextrano (DXS), se observó un antagonismo entre los dos compuestos, indicando que actuaban del mismo modo (Figura 6). Los ensayos de viabilidad celular se basaron en el mismo principio descrito anteriormente para el MTT, pero el sustrato utilizado fue el 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolium-5-carboxanilido (XTT), un compuesto que permite generar un producto cromogénico soluble en presencia de un transferidor de electrones adecuado (Riss y Moravec, 1996).

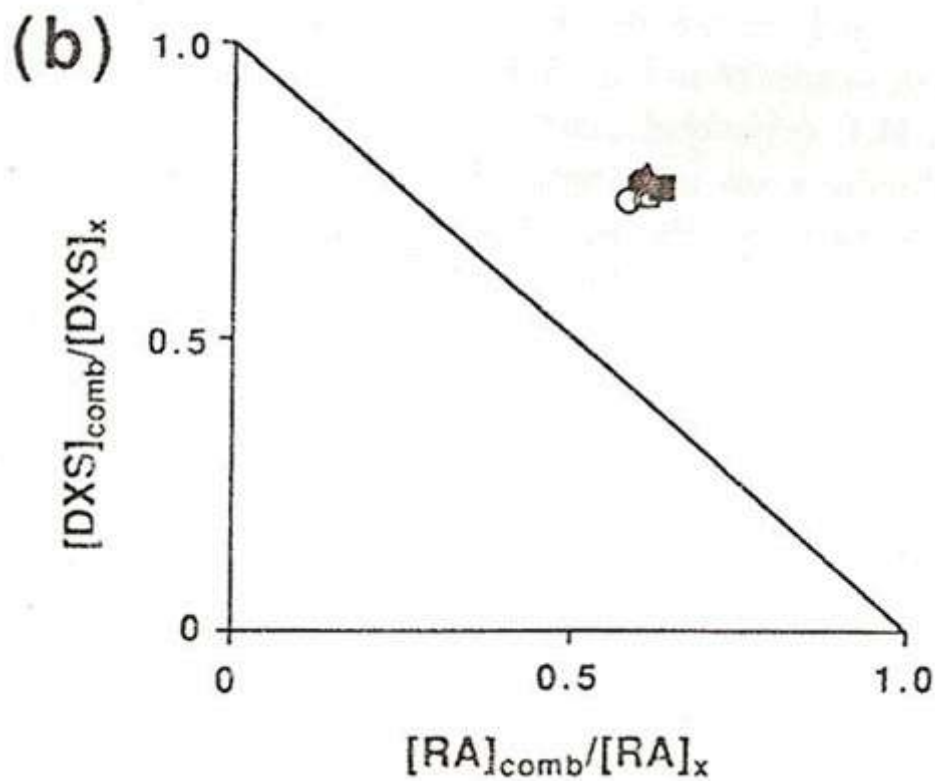
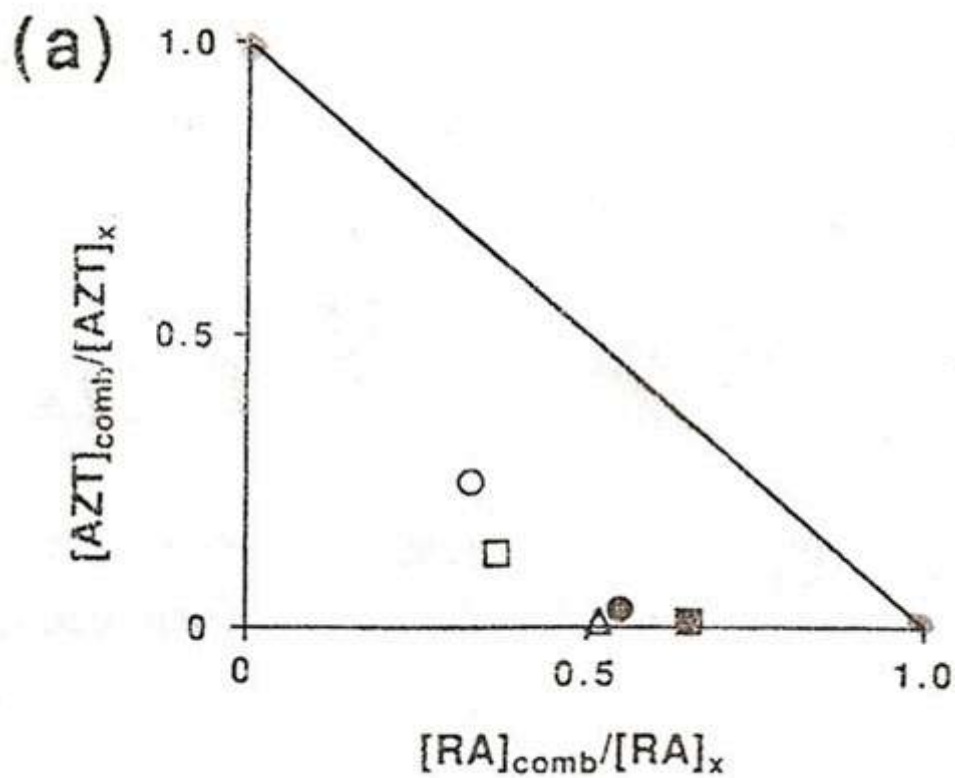


Figura 6. Efecto inhibitorio de AR en presencia de AZT (a) o DSX (b). $[RA]_x$, $[AZT]_x$ y $[DSX]_x$ indican las concentraciones de RA, AZT y DSX que causaron un % de inhibición x cuando cada droga se probó por separado. $[RA]_{comb}$, $[AZT]_{comb}$ y $[DSX]_{comb}$ representan las concentraciones de RA,

AZT y DXS que causaron un % de inhibición x cuando se combinaron las drogas. Los puntos por debajo de la diagonal indican sinergismo mientras que los que se sitúan por arriba señalan antagonismo (Ogata *et al*, 1992).

Los inhibidores de la fusión: la baicalina de *Scutellaria baicalensis*.

La baicalina es un flavonoide aislado de las raíces de *Scutellaria baicalensis*, una planta empleada en la medicina tradicional China para tratar bronquitis, nefritis, hepatitis, asma y dermatitis (Li, *et al*, 2000). Los flavonoides son compuestos comunes en plantas y presentan actividades biológicas interesantes como vasodilatadores, anti-inflamatorios, anti-alérgicos y antivirales entre otros (Lin *et al*, 1999). Son compuestos polifenólicos de 15 carbonos con estructuras sumamente diversas que se organizan alrededor de un núcleo común, constituido por 2 anillos de benceno unidos por una cadena de tres carbonos. Se ha determinado que las propiedades anti-inflamatorias de la baicalina parecen deberse a su capacidad para bloquear la interacción de ciertas quimiocinas con los receptores CCR5 y CXCR4, que también juegan un papel clave en la infección por VIH (Li, *et al*, 2000). Basado en lo anterior, Li y colaboradores estudiaron el efecto de este compuesto sobre la fusión del VIH con células diana. Para tal fin, emplearon dos líneas celulares: una co-expresaba el receptor CD4 y el co-receptor CCR5 (R5) y la otra el receptor CD4 y el co-receptor CXCR4 (X4). Ambas fueron además infectadas con un vaccinia virus recombinante que llevaba el gen que codifica para la RNA polimerasa del bacteriófago T7, el cual se encontraba bajo el control de un promotor del vaccinia virus que se expresa constitutivamente (Hruby, 1990). Paralelamente, se coinfectaron células Hela con dos vaccinia virus recombinantes: uno de ellos contenía el gen *env* de cepas M-trópicas y el otro contenía el gen reportero *lacZ* unido al promotor de la RNA polimerasa T7. Por otro lado, introdujeron un vaccinia virus con el gen reportero antes mencionado a una línea celular que ya poseía el gen *env* con tropismo hacia células T. De esta manera se logró generar un sistema de células capaces de fusionarse entre sí y de recrear el proceso de entrada del VIH-1, pudiendo monitorear y cuantificar la fusión celular gracias a la actividad de la enzima β -galactosidasa, que sólo podía expresarse a partir del promotor de la RNA polimerasa de T7 tras ocurrir la fusión.

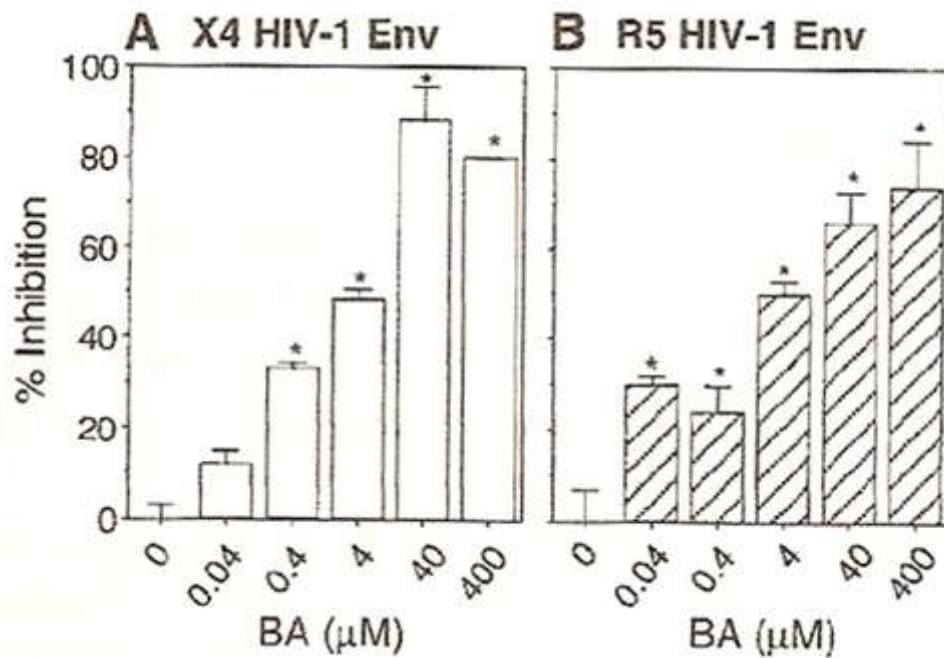


Figura 7. Efecto de la baicalina sobre la fusión celular. Co-cultivos de las distintas células se incubaron en ausencia o presencia de varias concentraciones de baicalina. Posteriormente las células se lisaron y los lisados se mezclaron con rojo clorofenol galactopiranosido, un sustrato de la β -galactosidasa que genera un producto rojo cuya absorbancia se puede medir a 570 nm (Li *et al*, 2000; Nussbaum *et al*, 1994).

Midiendo los niveles de β -galactosidasa expresada como consecuencia de la fusión (Figura 7), Li y colaboradores (2000) obtuvieron que la baicalina inhibía la fusión mediada tanto por CXCR4 como por CCR5. El grado de inhibición fue proporcional a la concentración de baicalina y la concentración de compuesto necesaria para inhibir en un 50 % la fusión fue similar para ambos tipos de co-receptores (4 μ M), por lo que el efecto de la sustancia no dependió del tropismo del VIH-1. Estos resultados se vieron confirmados por la ausencia de células multinucleadas gigantes (sincitios) en los co-cultivos celulares realizados con baicalina. En los sistemas no tratados con el compuesto sí se observó este fenómeno causado por la fusión celular. Los investigadores sugirieron que ciertamente la baicalina inhibía eficientemente la fusión de los viriones de VIH-1 a las células, posiblemente al actuar en etapas tempranas del ciclo de replicación viral. No obstante, para descartar la posibilidad de que el extracto actuara en etapas tardías del ciclo, es decir, a nivel de la formación de sincitios que se producen una vez que las proteínas virales se expresan en la membrana de las células infectadas, los mismos autores realizaron un ensayo de detección del DNA viral durante la fase temprana de la infección viral. Para ello infectaron células con cepas de VIH-1 M y T-trópicas en presencia o ausencia de baicalina. Dejaron transcurrir el tiempo suficiente para que ocurriera la replicación e integración viral, aislaron el DNA celular total y realizaron un PCR anidado en presencia de cebadores específicos para la región R/U5 del LTR del VIH. No se detectaron fragmentos del DNA amplificado en las células tratadas con el compuesto, mientras que en las células no tratadas sí. Esto confirmó la hipótesis de una actuación temprana del compuesto sobre el ciclo viral. Hay que resaltar que, si bien los resultados obtenidos en esta investigación con la baicalina son alentadores, no se realizaron en ningún momento ensayos control para evaluar la citotoxicidad del compuesto, por lo que no se puede excluir la posibilidad de que la baicalina tenga efectos nocivos sobre células sanas.

COMPUESTOS QUE ACTÚAN A NIVEL DE LA REPLICACIÓN INTRACELULAR

Se han aislado compuestos de plantas que actúan sobre fases de la infección viral más tardías. Estas sustancias pueden inhibir etapas de la replicación posteriores a la entrada del virus en la célula hospedadora. Entre los blancos de tales compuestos se tienen las enzimas virales tales como las retrotranscriptasas y las proteasas, así como factores que intervienen en el proceso de translocación de los transcritos de RNA al citoplasma. También existen algunos de estos compuestos que pueden interferir en el proceso de integración del genoma viral.

Los inhibidores de la retrotranscriptasa viral: las cumarinas aisladas en las plantas del género *Calophyllum*.

Los compuestos naturales de plantas que actúan a nivel de la replicación intracelular del virus son diversos y sus blancos variados. Las cumarinas, por ejemplo, han demostrado tener una actividad anti-VIH muy específica inhibiendo efectivamente la acción de la retrotranscriptasa del VIH-1 (Pengsuparp *et al*, 1996; Buckheit *et al*, 1999). Estas moléculas no son análogos nucleosídicos, por lo que entran en la categoría de inhibidores de la retrotranscriptasa no nucleosídicos. Todas ellas comparten una estructura común de benzo-2 pirona. Existen diversas cumarinas que exhiben propiedades anti-RT del VIH-1, las cuales han sido aisladas de árboles de selvas tropicales pertenecientes al género *Calophyllum*. Uno de estos compuestos es el ?soulattrolide?, que representa el 29% de los extractos del látex de *Calophyllum teysmanii* (Pengsuparp *et al*, 1996). Estudios llevados a cabo por Pengsuparp y colaboradores (1996), mostraron una inhibición selectiva del compuesto sobre la actividad dependiente de DNA y RNA de la RT del VIH-1, mediante ensayos con la enzima incubada en presencia de timidina trifosfato marcada y de templados adecuados. Independientemente del sustrato (secuencias de poli -rA o DNA de timo de becerro), en presencia de 200 µg/mL (o 495 µM) de ?soulattrolide? la actividad de la RT se inhibió en más de un 80% con relación a los controles no expuestos al compuesto (Tabla 4). Las concentraciones necesarias para inhibir en un 50% la actividad retrotranscriptasa (IC50) dependiente de DNA y RNA (Tabla 4), fueron superiores a las obtenidas con AZT (IC50= 0,051 µM), un análogo nucleosídico inhibidor de la RT, pero similares a los de otras cumarinas aisladas en *Calophyllum* tales como la calanolida A (IC50=0,32 µM) (Pengsuparp *et al*, 1996). Asimismo, Pengsuparp y colaboradores (1996) también encontraron que el compuesto era capaz de inhibir en más de 80% la actividad RNAsa de *E. coli*, una enzima que comparte una estructura muy similar a la RNAsa viral (Luciw, 1996).

Inhibitory Effects of Soulattrolide (1) on Nucleic Acid Polymerases and Ribonuclease H

enzyme	% inhibition at 200 $\mu\text{g/mL}$ (495 μM)	IC ₅₀ (μM)
HIV-1 RT ^a (DDDP activity)	87.2	0.73 ^b
HIV-1 RT ^a (RDDP activity)	96.2	0.34 ^b
<i>E. coli</i> RNase H	86.5	69.5 ^b
HIV-2 RT	0.7	inactive
TIBO-resistant (Tyr181) HIV-1 RT	31.0	inactive
AMV RT ^c	20.2	inactive
DNA polymerase α	28.1	inactive
DNA polymerase β	49.6	> 495
RNA polymerase	29.7	inactive

Tabla 4. Efecto inhibitorio del "soulattrolide" sobre Polimerasas de Ácidos Nucleicos y la Ribonucleasa H.

DDDP: actividad DNA Polimerasa Dependiente de DNA; RDDP: actividad RNA Polimerasa dependiente de RNA. El compuesto se consideró inactivo cuando su porcentaje de inhibición fue cercano o inferior a 30% (Pengsuparp et al, 1996). La inhibición de la actividad de la RNasa fue medida como la cantidad de polímeros sintéticos de RNA que no eran degradados. Para ello, se empleó una mezcla de reacción suplementada con un sustrato sintético de [³H]poli (rA).poli(dT) y ácido tricloroacético (ATC), una solución que permite precipitar los polímeros de ácidos nucleicos superiores o iguales a 20 nucleótidos (Ambion, <http://www.ambion.com/techlib/misc/tcapptn.html>). De tal manera, la cantidad de productos marcados precipitados obtenida en las mezclas de reacción era indicativa de la inhibición por parte del compuesto. Estos autores encontraron que la cantidad de producto marcado obtenida en mezclas expuestas a una concentración de 495 μM de "soulattrolide", fue casi 100 veces menor a la registrada en los controles sin el compuesto, sugiriendo la posibilidad de que dicha sustancia actuara sobre la RNasa viral. El "soulattrolide" no inhibió de manera significativa la actividad dependiente de RNA de otras retrotranscriptasas virales tales como la del VIH-2, la del Virus de la Mieloblastosis Aviar y la RT mutante del VIH-1 resistente a la tiobencimidazolona (TIBO), un INNRT (Luciw, 1996). Esto reveló una acción selectiva del compuesto y sugirió la posibilidad de un solapamiento entre los sitios de unión de esta cumarina y del TIBO. El problema de muchos compuestos y medicamentos anti-VIH es que pueden llegar a ser tóxicos para los pacientes que los utilizan regularmente ya que interfieren eventualmente en procesos esenciales para el desarrollo celular. Este es el caso de la AZT, que muestra una IC₅₀ relativamente baja para la DNA polimerasa celular β (11 μM). Para evaluar la toxicidad del "soulattrolide" se realizaron los mismos experimentos que para la RT pero con enzimas celulares tales como las DNA polimerasas α y β eucarióticas y la RNA polimerasa de *E. coli*. Los valores de inhibición obtenidos para la DNA polimerasa α y para la RNA polimerasa fueron inferiores al 30% en presencia de 495 μM del compuesto. Sin embargo la DNA polimerasa β resultó ser más sensible al compuesto, presentando una IC₅₀ cercana a 495 μM . Esto podría resultar problemático si se toma en cuenta que esta enzima parece intervenir en el proceso de reparación de errores durante la replicación del DNA eucariótico (Klug y Cummings, 1999). No obstante los valores de IC₅₀ fueron altos al compararse con los obtenidos con el AZT y con otras

cumarinas como la calanolida A (205 μ M). La calanolida A, así como su forma isomérica calanolida B (o costatolida) y la dihidrocalanolida A (o dihidrocostatolida), aisladas de *Calophyllum lanigerum*, exhibieron al igual que el ?soulattrolide?, la misma acción selectiva contra la RT del VIH-1 (Buckheit *et al*, 1999). No obstante, la propiedad más relevante de estas cumarinas fue su capacidad para inhibir sinérgicamente la citopatogenicidad del VIH-1 con una amplia gama de drogas anti-VIH, tal y como lo reveló el estudio realizado por Buckheit y colaboradores (1999). Estos investigadores midieron la viabilidad en células T infectadas con el VIH-1 en presencia de las tres cumarinas citadas anteriormente y una combinación de drogas a diferentes concentraciones. De esta forma observaron que todas las cumarinas inhibían la citopatogenicidad del virus de manera sinérgica con los inhibidores nucleosídicos empleados en el ensayo, con el inhibidor no nucleosídico UC781, así como con los inhibidores de la proteasa Ritonavir y Saquinavir. El costatolide, en combinación con INRTs, mostró los mayores niveles de sinergismo entre las tres cumarinas, por lo que podría constituir la base de una terapia que permita incrementar el efecto de los INRTs. La ventaja de esta combinación es que los compuestos no compiten entre sí puesto que se unen a regiones diferentes de la retrotranscriptasa (Buckheit *et al*, 1999). Otra característica interesante descubierta por Buckheit y colaboradores (1999), fue que las cumarinas analizadas actuaban efectivamente sobre los virus con una mutación puntual en el residuo 181 de la retrotranscriptasa. Esta mutación consiste en el cambio de un residuo de tirosina por uno de cisteína, haciendo que el virus pierda sensibilidad hacia una serie de INNRTs.

El residuo de tirosina de la posición 181 se encuentra en un bolsillo situado en la subunidad p66 de la RT, cerca del sitio activo de la polimerasa. A este bolsillo se unen la mayoría de los INNRTs, por lo que las mutaciones que ocurren en esta región afectan la unión de estos compuestos y bloquean su efecto (Buckheit *et al*, 1995). Esto indica que las calanolidas A y B y la dihidrocostatolida actuaron en un sitio de unión distinto al de la mayoría de los INNRTs. Por otro lado, Buckheit y colaboradores (1999) observaron que al hacer sub-cultivos de células T infectadas con el VIH-1 en presencia de concentraciones crecientes de las tres cumarinas, se lograron aislar cepas virales resistentes a estos compuestos ya que no vieron reducida su citopatogenicidad en ensayos con XTT. Sin embargo, los virus resistentes a la calanolida A mantuvieron su sensibilidad hacia la mayoría de los INNRTs probados, así como hacia los INRTs como el AZT y el 3TC. En vista de estos resultados, hay que considerar las cumarinas como un posible complemento en los tratamientos anti-VIH, ya que actúan sinérgicamente con las drogas actualmente en uso y seleccionan virus susceptibles a otros compuestos.

Otros inhibidores de la transcriptasa reversa: el ácido repandusínico de *Phyllanthus niruri*.

El ácido AR, tal y como se mencionó anteriormente, es aislado de la planta *Phyllanthus niruri*, la cual ha tenido un extenso uso medicinal. Ello motivó a un equipo de investigadores a estudiar el efecto del extracto acuoso de la planta mencionada sobre la infección por VIH-1 (Ogata *et al*, 1992). Para ello, Ogata y colaboradores (1992) extrajeron, en primer lugar, los componentes de la planta en agua. Después de evaporar el solvente, resuspendieron el residuo sólido en metanol generando una fracción soluble y una fracción insoluble que utilizaron para hacer ensayos de inhibición de la RT. Estos se realizaron con una RT recombinante del VIH-1 expresada en *E.coli*. Los investigadores incubaron la RT en un medio de reacción con timidina trifosfato marcada y secuencias de poli (rA) y oligo (dT) como templados y cebadores de la enzima, respectivamente. El DNA radioactivo sintetizado se fijó en filtros de intercambio iónico y se estimó su cantidad en

un contador de centelleo. El residuo insoluble en metanol presentó la mayor actividad inhibitoria sobre la RT, por lo que Ogata y colaboradores (1992) lo sometieron a fraccionamientos sucesivos y evaluaron la actividad anti-RT de cada fracción. De esta manera se logró aislar e identificar el AR, que bloqueó de manera efectiva la actividad RT del VIH-1 mostrando valores de EC 50 inferiores a los del Foscarnet, un inhibidor específico de la RT del VIH-1. Sin embargo su actividad no fue tan selectiva como la de este último compuesto ya que también inhibió considerablemente la DNA-polimerasa eucariótica α , lo que podría explicar su efecto citotóxico a bajas concentraciones. La actividad DNA polimerasa se midió de la misma manera que para la RT, pero en el medio de reacción se agregó DNA de timo de becerro como sustrato de la enzima (Ogata *et al*, 1992).

Los inhibidores de la interacción REV/RRE: el Niruriside de *Phyllanthus niruri*.

Otro compuesto totalmente distinto a las cumarinas, es el denominado niruriside, el cual ha sido aislado de fracciones metanólicas de la misma planta de donde proviene el ácido repandusínico, *Phyllanthus niruri*. El niruriside actúa de modo diferente sobre el VIH-1, ya que en un estudio se observó que interfiere con la unión de Rev a RRE (Qian-Cutrone *et al*, 1996). Tal y como se señaló en la primera parte del trabajo, Rev es una proteína se une a los transcritos del genoma viral que contienen el elemento de respuesta a Rev (RRE). Esta interacción protege los RNAm del corte y empalme y facilita su transporte hacia el citoplasma celular. Así, para medir el efecto del niruriside sobre la formación de los complejos Rev/RRE, Qian-Cutrone *et al*. (1996) utilizaron una proteína Rev expresada en *E.coli* y un transcrito de RNA marcado con ^{33}P que presentaba el elemento RRE. La formación de complejos entre la proteína y el RNA, se pudo monitorear y cuantificar mediante la transferencia de la proteína Rev a filtros de nitrocelulosa y la medición de la radioactividad en un medidor de centelleo: las proteínas unidas al RNA marcado mostraron actividad radioactiva, mientras que las proteínas libres no. Así, los autores observaron que, si bien el IC 50 obtenido en ensayos de XTT con células T infectadas con VIH-1 fue significativamente alto (260 μM), la cantidad de compuesto necesaria para disminuir en un 50 % la interacción de la proteína Rev con su respectivo sitio de unión en el RNA viral fue de 3,3 μM (Qian-Cutrone *et al*, 1996). La diferencia entre estos resultados sugiere que la acción del niruriside se ve limitada por su incapacidad para penetrar en las células.

Los inhibidores de la proteasa: los triterpenos de *Geum japonicum*.

La planta *Geum japonicum* se usa en la medicina tradicional China como un antidiurético y se sabe que contiene compuestos con actividad antiviral (Xu *et al*, 1996). Por tal motivo, el grupo de investigación liderado por Xu (1996), decidió separar los componentes activos de *Geum japonicum* partiendo de un extracto metanólico de la planta. Guiados por bioensayos, lograron determinar que la actividad antiviral del extracto venía dada por cinco triterpenos. Éstos son lípidos emparentados con los esteroides que derivan de unidades de isopreno. Xu *et al*. (1996) decidieron estudiar el efecto de estos compuestos sobre la proteasa de VIH-1. Para ello, incubaron la enzima en presencia de cada uno de los triterpenos en un medio con un heptapéptido sintético de secuencia aminoacídica idéntica a la del sitio de escisión de las proteínas p24-p17 del precursor Gag. La presencia de los cinco triterpenos durante la reacción inhibió la cantidad de péptido que se obtuvo en ausencia de los compuestos. Los porcentajes de inhibición variaron entre un 42% para el compuesto con menor actividad, hasta un 100 % para el triterpeno más activo (Xu *et al*, 1996).

Los inhibidores de la transcripción: los taninos, las calconas y las cumarinas.

La transcripción del genoma viral una vez que se ha integrado al DNA de la célula hospedadora también constituye el blanco de ciertos compuestos. Algunos actúan a nivel de proteínas que participan en la regulación de la transcripción. En efecto, ciertas proteínas de células eucariotas se encuentran unidas covalentemente a homopolímeros de poli(ADP-ribosa) que juegan un papel importante en la reparación y transcripción del DNA (Althaus, 1992). Por ejemplo, la poli-ADP-ribosilación de algunos factores de transcripción tales como la proteína de unión a TATA del complejo de la RNA polimerasa II, inhibe la transcripción genética (Oei *et al*, 1998).

Se sabe que los taninos de plantas como el té verde inhiben la poli(ADP-ribosa) glicohidrolasa (PARG), una enzima que participa en la despolimerización de las moléculas de poli(ADP-ribosa). Esta inhibición suprime la expresión del gen del virus del tumor mamario murino (VTMM) inducida por glucocorticoides (Tsai *et al*, 1992). Sobre la base de estos antecedentes, Uchiumi y colaboradores (1996) decidieron estudiar el efecto del ácido tánico sobre la transcripción de una construcción que poseía el gen reportero cloranfenicol acetil transferasa (*cat*) fusionado a secuencias promotoras del LTR del VIH-1 (plásmido pHIVCAT). Para observar mejor el efecto inhibitorio, estos autores sometieron ciertas células T infectadas con VIH-1 a la acción del TPA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato), ya que se sabe que induce la actividad promotora de las LTR. El TPA activa proteínas quinasas que fosforilan la proteína I κ B citoplasmática liberando el factor de transcripción NF- κ B. Este migra al núcleo en donde se puede unir a las LTR y promover la transcripción de los genes virales (Uchiumi *et al*, 1996; Luciw, 1996). Los resultados obtenidos por estos autores se muestran en la Figura 8, en donde se aprecia que el ácido tánico inhibió la transcripción de CAT inducida por TPA de manera dependiente de la concentración. En las células no tratadas con TPA el efecto no se observó puesto que los niveles basales de expresión de CAT fueron muy bajos.

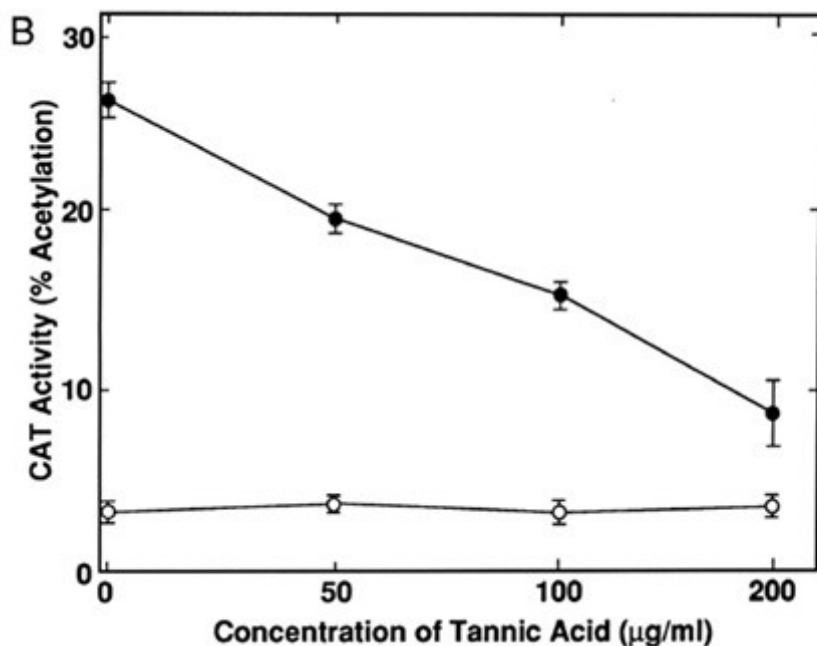


Figura 8. Efecto del ácido tánico sobre la actividad promotora del VIH inducida por TPA. Las células transfectadas con el gen *cat* se incubaron con o sin 50 ng/mL de TPA en presencia de diferentes concentraciones de ácido tánico. Los círculos negros representan las células tratadas con TPA mientras que los blancos representan las células no tratadas (Uchiumi *et al*, 1996).

Para identificar que elementos del promotor del VIH respondían al ácido tánico se construyeron plásmidos con delecciones de 318 (pHCATVII) y 358 (pHCATVIII) pares de bases en la región LTR. Los plásmidos se incorporaron a células T que se trataron con TPA en presencia o en ausencia de ácido tánico. La medición de la actividad de CAT reveló que la carencia de una secuencia nucleotídica entre las posiciones 133 y 93 anulaba la inhibición de la transcripción causada por el ácido tánico (Figura 9). Ello indicó que los elementos sensibles a la acción del ácido tánico se encontraban dentro de la región suprimida de 40 pares de bases (Uchiumi *et al*, 1996).

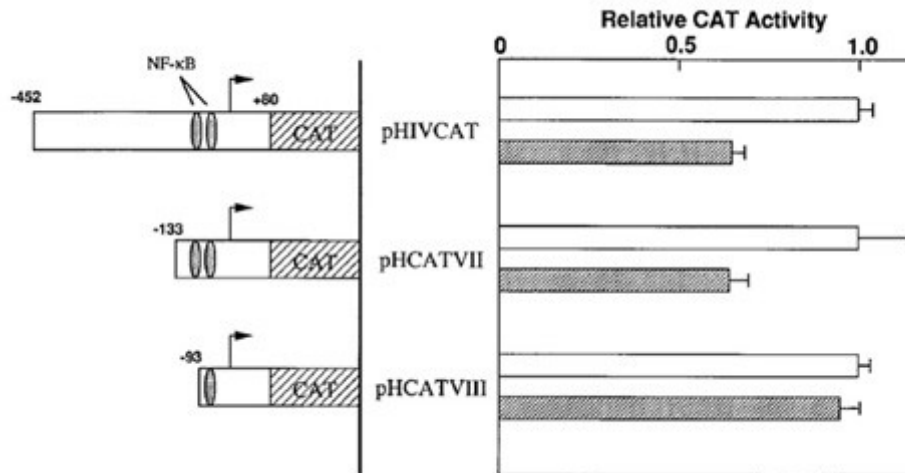


Figura 9. Determinación de los elementos de respuesta al ácido tánico. Los histogramas muestran la actividad de CAT en relación a células no tratadas con ácido tánico y transfectadas con el mismo plásmido. Las columnas grises y blancas representan las células tratadas y no tratadas con ácido tánico, respectivamente.(Uchiumi *et al*, 1996).

Debido a que las secuencias de unión del factor NF- κ B se encontraban en dicha región, los mismos autores decidieron estudiar el efecto del ácido tánico sobre la transcripción del gen *cat* asociado a estas secuencias, ya que podría afectarse la expresión de otros genes. Observaron que el compuesto no inhibió la actividad de CAT, por lo que las regiones reconocidas por NF- κ B no estaban involucradas en la inhibición de la transcripción mediada por el ácido tánico. De allí concluyeron que el elemento responsable del efecto inhibitorio del ácido tánico era una secuencia de 30 pares de bases que se encontraba corriente arriba de los elementos de unión a NF- κ B. Esto condujo a Uchiumi y colaboradores (1996) a sugerir que el mecanismo de acción del ácido tánico en la disminución de la expresión a partir del LTR, ocurría mediante la inhibición de la acción de PARG. Se ha descrito que la poli-ADP-ribosilación de algunos factores transcripcionales conlleva a una disminución de la transcripción. La PARG se encarga de despolimerizar a dichos factores volviéndolos activos. Al parecer, en la expresión del DNA del VIH están involucrados factores asociados a ciertas regiones de las LTR que son susceptibles a la ADP ribosilación, por lo que requieren ser despolimerizados por PARG para promover la transcripción. Por lo tanto, la presencia del ácido tánico, al inhibir la PARG, impediría la despolimerización de dichos factores disminuyendo la expresión de los genes virales. Motivados por esta investigación y por otros trabajos que mostraban que los ligninos también inhibían la PARG, Uchiumi *et al*. (2003) decidieron estudiar el efecto de una serie de compuestos de plantas relacionados con los taninos y ligninos de estructura conocida. Para dichos estudio realizaron los mismos ensayos que en su trabajo de 1996, pero emplearon un gen reportero distinto: el de la luciferasa (*luc*). Esta es una enzima aislada de la especie de luciérnaga *Photinus pyralis*, que genera luz al monooxigenar un sustrato de luciferina. La intensidad de la luz que se genera es proporcional a

la cantidad de enzima y puede medirse en un luminómetro (MGT, sin fecha). El gen *luc* se fusionó con las LTR del VIH-1 en un vector y fue transfectado a células T. De esta manera se observó que el ácido tánico, los elagitaninos (taninos hidrolizables), las cumarinas y las calconas (de la familia de los flavonoides) aislados de distintas plantas, inhibieron la actividad luciferasa inducida por TPA de manera dependiente de la concentración (Figura 10). Los elagitaninos, que mostraron efecto inhibitorio, compartieron una estructura circular compuesta por fenoles y sacáridos responsable de la supresión de la expresión de ciertos genes virales al actuar sobre PARG, por lo que este podría ser el mecanismo involucrado en la inhibición de la expresión de la luciferasa (Uchiumi *et al*, 2003).

Por otro lado, a pesar de que el mecanismo de acción mediante el cual las calconas y las cumarinas ejercen su efecto inhibitorio no ha sido determinado, se ha sugerido que podría involucrar la unión selectiva a ciertos factores proteicos de transcripción o transducción, ya que compuestos de estructura similar no tuvieron efecto inhibitorio (Uchiumi *et al*, 2003).

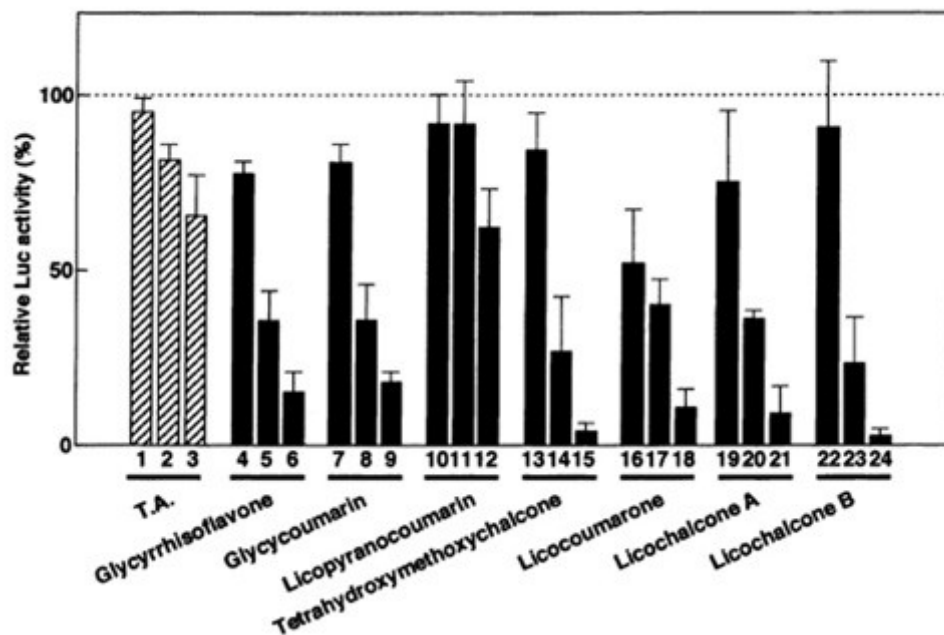


Figura 10. Efecto de los elagitaninos, las cumarinas y las calconas sobre la transcripción de la luciferasa inducida por TPA. Las células transfectadas con el gen de la luciferasa asociado a las LTR del VIH-1 se trataron con TPA en presencia de concentraciones crecientes de los diferentes compuestos. A) Efecto del ácido tánico (T.A) y los elagitaninos (Hirtellin A/B/C, Tamarixinin B, Cocciferin D). B) Efecto de las cumarinas (glicirrisoflavona, glicicumarina, licopiranocumarina, licocumarona) y calconas (Tetrahidroximetoxicalcona, licocalcona A/B) (Uchiumi *et al*, 2003).

Los inhibidores de la integración del genoma viral: la proteína MAP 30.

La ricina es una proteína que ha sido tradicionalmente conocida por ser extremadamente tóxica al inactivar los ribosomas e impedir la síntesis proteica celular. Se trata por lo tanto de una proteína inactivadora de los ribosomas (PIR) que es capaz de causar un 50 % de muerte celular a concentraciones por debajo de 1 ng/mL (Peumans, *et al*, 2001). El interés por el efecto citotóxico de la ricina llevó al aislamiento de proteínas funcionalmente relacionadas en una gran variedad de plantas. Una de ellas es la proteína MAP 30 aislada de *Momordica charantia*, una planta originaria de China cuyos extractos se han utilizado por siglos para el tratamiento de infecciones y tumores (Lee-Huang *et al*, 1995). A diferencia de la ricina, MAP 30 exhibe una toxicidad selectiva

hacia células tumorales e infectadas con virus sin afectar las células normales, por lo que constituye una excelente candidata para la elaboración potencial de fármacos anticancerosos y antivirales. Los mecanismos de reconocimiento de las células alteradas por parte de MAP 30 aún no han sido establecidos (Wang *et al*, 1999). Las PIR ejercen su mecanismo inhibitorio gracias a su actividad RNA N-glicosidasa que consiste en la ruptura del enlace glicosídico N-C entre una adenina específica y su base nucleotídica. Esto ocurre al nivel de una adenosina situada en la posición 4324 de la subunidad 28 S del RNA ribosomal. Como consecuencia de esta deadenilación los ribosomas son inactivados y la síntesis proteica bloqueada. No obstante, varios indicios sugieren que el efecto anti-VIH de MAP30 no se debe a la deadenilación del rRNA, ya que la proteína es capaz de inhibir la infección por VIH-1 en células T y macrófagos a concentraciones que no muestran efecto sobre los ribosomas (Wang *et al*, 1999). Además, MAP 30 es capaz de inactivar topológicamente las LTR del DNA del VIH-1, haciéndolas insensibles a la acción de la DNA girasa, una topoisomerasa celular que interviene en el desenrollamiento del DNA durante los procesos de replicación y transcripción del DNA (Lee-Huang *et al*, 1995). Basándose en estas observaciones, Lee-Huang y colaboradores (1995) decidieron estudiar si también existía algún efecto de la proteína MAP 30 sobre la actividad de la integrasa viral. Para eso sintetizaron fragmentos de DNA marcados con fósforo radioactivo, con secuencias de 21 nucleótidos correspondientes a los extremos de las regiones U3 y U5 del las LTR del VIH-1. Estos fragmentos sirvieron de sustrato para la integrasa viral, cuyo primer paso catalítico consiste en realizar cortes escalados a nivel de los extremos 3' del DNA de doble cadena viral (ver mecanismos de replicación del virus), suprimiendo específicamente el par de nucleótidos GT (Figura 11). Por lo tanto, la acción de la integrasa sobre los fragmentos sintéticos generaría oligonucleótidos de 19 bases que podrían separarse y visualizarse por electroforesis y autorradiografía (Lee-Huang *et al*, 1995).

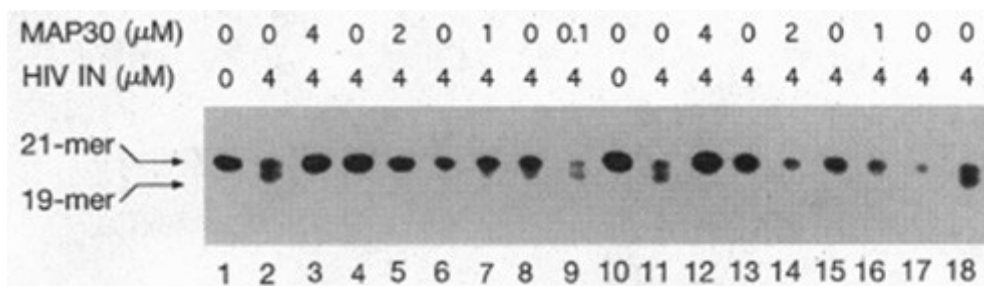


Figura 11. A. Representación esquemática del procesamiento de los extremos 3' catalizado por la integrasa del VIH. B. Inhibición del procesamiento de los extremos 3' de los sustratos U3 y U5 LTR. La electroforesis y posterior autorradiografía mostró la formación de dos bandas en los controles, mientras que solo se observó una banda correspondiente al sustrato sin procesar en los experimentos realizados con diferentes concentraciones de MAP 30 (Lee-Huang *et al*, 1999).

Los investigadores antes mencionados observaron que, al incubar la integrasa en un medio de reacción con los sustratos en presencia de MAP 30, hubo una inhibición en la generación de fragmentos escindidos con relación a los controles no expuestos a la proteína. Vieron que el efecto, tanto en los sustratos U5 como U3, fue proporcional a la concentración de proteína (Figura 11). Esto demostró que la proteína impedía el procesamiento inicial de las LTR por parte de la integrasa. Para estudiar si la MAP 30 también era capaz de impedir el proceso de transferencia de hebras entre el genoma viral y el genoma del hospedador catalizado por la integrasa, estos autores incubaron la enzima junto a diversas concentraciones de proteína en

presencia de los sustratos U5 y U3 carentes de los nucleótidos terminales y de un plásmido receptor. Bajo estas condiciones cualquier inhibición detectada se debería a la interferencia de MAP 30 sobre la transferencia de hebras y no sobre la escisión nucleotídica. Debido a que los sustratos U5 y U3 se encontraban marcados radioactivamente, se pudo hacer un seguimiento de la integración mediante electroforesis y autorradiografía.

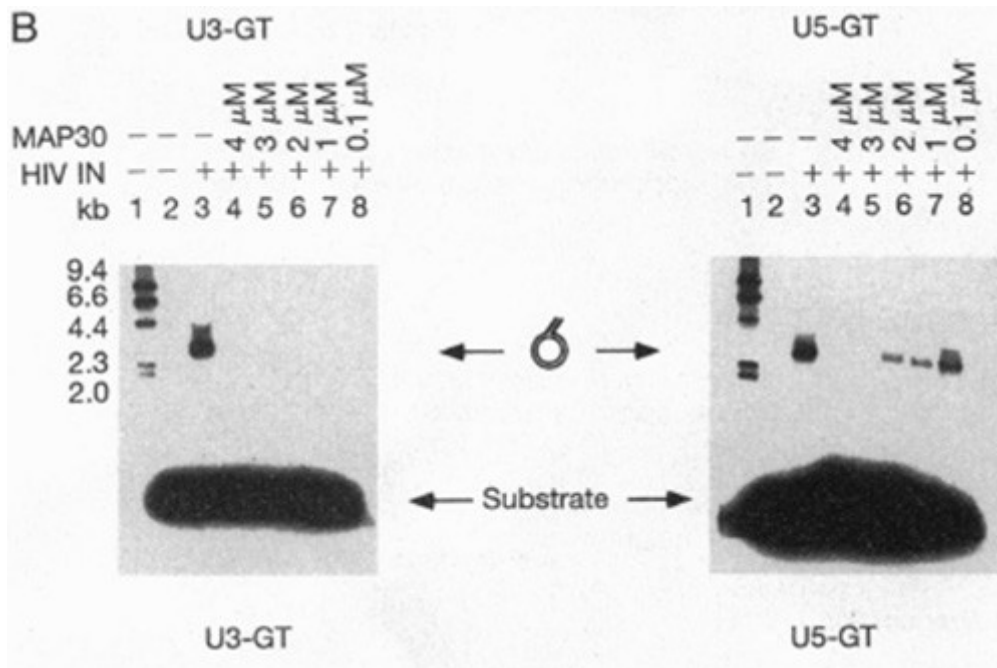


Figura 12. Inhibición de la transferencia de hebras por la acción de MAP30. En el carril uno se corrieron fragmentos marcadores radioactivos producto de la digestión del DNA del fago λ con la enzima de restricción *Hind* 3. Los controles no expuestos a MAP 30 (carriles 2) presentaron una banda alrededor de 2.69 kB constituida por el fragmento de DNA resultante de la integración. En los carriles de los experimentos con MAP 30 y U3, no se observó la banda o apareció más atenuada (en el caso de U5). La mancha obtenida en la parte inferior representa los sustratos U3 y U5 no integrados (Lee-Huang *et al*, 1995). Lee-Huang y colaboradores (1995) encontraron que en presencia de MAP 30 (Figura 12), la integración de U3 y U5 con el plásmido se vio inhibida proporcionalmente a la cantidad de proteína, aunque el efecto fue mayor en el caso de U3. Estos datos indicaron que la proteína MAP 30 de *Momordica charantia* inhibía la integración de las LTR del VIH-1 al genoma receptor. Éstos autores sugirieron que dicha inhibición podría deberse a la actividad glicosilasa/liasa de la proteína, característica de ciertas enzimas que intervienen en el proceso de reparación del DNA (Wang *et al*, 1999). Éstas son capaces de escindir las bases nucleotídicas y de unir una base correctamente insertada a la cadena de DNA (Klug y Cummings, 1999). El proceso requiere la formación de un intermediario DNA-enzima unido covalentemente. MAP 30 presenta este tipo de actividad enzimática al escindir una base de adenina al nivel de las LTR del VIH-1 y unirse a ellas formando complejos de DNA/MAP 30. Éstos generarían sustratos de LTR inadecuados para la integrasa y la DNA girasa, explicando así los efectos inhibitorios de MAP 30 (Wang *et al*, 1999).

CONCLUSIONES

- Existen compuestos naturales aislados en plantas que actúan sobre fases tempranas de ciclo de replicación del VIH, al inhibir la adsorción o la fusión de los virus a las células diana. Se ha sugerido que los polisacáridos de *Rhizophora apiculata* y el ácido repandusínico de *Phyllanthus niruri* actúan previniendo la adsorción. Por su parte, se ha propuesto que la baicalina de *Scutellaria baicalensis* actúa inhibiendo la fusión entre el virus y las células receptoras.
- Se han aislado otros compuestos que actúan sobre fases más tardías del ciclo replicativo del VIH. Tal es el caso de las cumarinas aisladas del género *Calophyllum*, que parecen inhibir específicamente la retrotranscriptasa del VIH-1. Además, algunas de ellas como la calanolida A o B y la dihidrocostatolida, pueden actuar sinérgicamente con una amplia gama de drogas anti-VIH y exhiben actividad sobre cepas resistentes a inhibidores no nucleosídicos de la retrotranscriptasa. Ello indica que estos compuestos actúan sobre sitios de unión distintos al de la mayoría de los INNRTs.
- Otros compuestos que actúan sobre fases tardías de la infección, son el niruriside de *Phyllanthus niruri* y los triterpenos de *Geum japonicum*, quienes inhiben la formación de complejos Rev/RRE y las proteasas virales, respectivamente.
- Moléculas tales como el ácido tánico, los elagitaninos, las cumarinas y las calconas, actúan inhibiendo la transcripción del genoma viral. Se ha sugerido que los elagitaninos y el ácido tánico inhiben la actividad de la poli-ADP- glicohidrolasa, lo que a su vez podría estar inhibiendo la activación de la transcripción de los genes virales. Por otro lado, el mecanismo mediante el cual las calconas y cumarinas ejercen su efecto inhibitorio sobre la transcripción, no ha sido elucidado, pero podría involucrar la unión selectiva a ciertos factores de transcripción o transducción.
- La proteína MAP30 de *Momordica charantia*, es una enzima multifuncional que bloquea eficientemente la infección por VIH-1 en células de cultivo. Se ha sugerido que este compuesto actúa inhibiendo la actividad de la integrasa.
- Si bien los resultados hallados con estos compuestos son esperanzadores, deben ser matizados, puesto que solo representan el primer paso en la búsqueda de fármacos que puedan emplearse de manera segura en modelos biológicos complejos, tales como animales de experimentación y el mismo ser humano. De los compuestos mencionados en el trabajo, solo la calanolida A se encuentra en ensayos clínicos en humanos (Chivian, 2003). No obstante, el hallazgo futuro de compuestos naturales de fácil acceso y baratos, debería ser la prioridad de los laboratorios e industrias farmacéuticas, con el fin de combatir eficazmente la pandemia en los países con menos recursos.

Abreviaturas

CC50: Concentración de compuestos que causa una disminución de un 50% en la viabilidad de células sanas.

DXS: Sulfato de dextrano.

EC 50: Concentración efectiva de compuestos necesaria para reducir en un 50% la citopatogenicidad inducida por el virus o la replicación viral.

IC 50: Concentración de compuestos necesaria para inhibir en un 50% la actividad retrotranscriptasa.

IF: Inhibidores de la fusión.

INNRT: Inhibidores No Nucleosídicos de la Retrotranscriptasa.

INRT: Inhibidores nucleosídicos de la Retrotranscriptasa.

IP: Inhibidores de la Proteasa.

MAGI: Activación Multinuclear del Indicador de la Galactosidasa.

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2 il)-2,5- difenil-tetrazolio.

RT:Retrotranscriptasa.

SIDA: Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida.

REFERENCIAS

1. Althaus, F. Poly ADP-ribosylation: a histone shuttle mechanism in DNA excision repair. *J. Cell Sci.* 1992. 102: 663-670.
2. Ambion, the RNA company. Protocol for trichloroacetic acid (TCA) precipitation. Disponible en: <http://www.ambion.com/techlib/misc/tcapptn.html>
3. Buckheit R. W., V. Fliakas-Boltz, W. D. Decker, J. L. Robertson, T. L. Stup, C. A. Pyle, E. L. White, J. B. McMahon, M. J. Currens, M. R. Boyd y J. P. Bader. Comparative anti-HIV evaluation of diverse HIV-I-specific reverse transcriptase inhibitor-resistant virus isolates demonstrates the existence of distinct phenotypic subgroups. *Antiviral Res.* 1995. 26: 117-132.
4. Buckheit R. W., E. L. White, V. Fliakas-Boltz, J. Russell, T. L. Stup, T. L. Kinjerski, M. C. Osterling, A. Weigand y J. P. Bader. Unique anti-Human Immunodeficiency Virus activities of the nonnucleoside Reverse Transcriptase inhibitors Calanolide A, Costatolide, and Dihydrocostatolide. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999. 43: 1827-1834.
5. Cann, A. J. Principles of Molecular Virology. Third Edition. United Kingdom: Academic Press; 2001.
6. Chivian M.D. Biodiversity: its importance for human health. Interim executive summary. Center for Health and the Global Environment, Harvard Medical School. USA. 2003. Disponible en: http://chge.med.harvard.edu/publications/documents/Biodiversity_v2_screen.pdf
7. Coffin, J.M. *Retroviridae: The viruses and their replication*. En: *Virology* (eds. B.N. Fields, D.M. Knipe & P.M. Howley), Vol. Two. USA: Lippincott-Raven Publishers; 1996.
8. Cos, P., L. Maes., D. Vanden Berghe., N. Hermans., L. Pieters y A. Vlietinck. Plant substances as anti-HIV agents selected according to their putative mechanism of action. *J. Nat. Prod.* 2004. 67: 284-293.
9. Duke, N. C. *Rhizophora apiculata, R. mucronata, R. stylosa, R. x annamala, R. x lamarckii* (Indo-West Pacific Stilt Mangroves). *Species profiles for Pacific island agroforestry*. Ver. 1.1. 2005. Disponible en: www.traditionaltree.org
10. Esparza, J. The global VIH vaccine enterprise. *Int. Microb.* 2005. 8: 93-101.
11. Geleziunas R. y W. C. Greene. Molecular insights into HIV-1 infection and pathogenesis. En: *The medical management of AIDS*. (eds. M. A. Sande y P. A. Volderbing). USA: W.B. Saunders Company; 2000.
12. Hirsch, M. S. y J. Curran. Human Immunodeficiency Viruses. En: *Virology* (eds. B.N. Fields, D.M. Knipe & P.M. Howley), Vol. Two. USA: Lippincott-Raven Publishers. 1996.
13. Hruby, D. E. Vaccinia virus vectors: New Strategies for producing recombinant vaccines. *Clin. Microbiol. Rev.* 1990. 3: 153-170.
14. Jassim, S.A. y M.A. Naji. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *J. Appl. Microbiol.* 2003. 95: 412-27.
15. Kimpton J. y M. Emerman. Detection of replication-competent and pseudotyped Human Immunodeficiency Virus with a sensitive cell line on the basis of activation of β -galactosidase gene. *J. Virol.* 1992. 66: 2232-2239.

16. Klug, W., M. Cummings. *Conceptos de Genética*. Quinta edición. España: Prentice Hall. 1999.
17. Lee-Huang S., P. Huang, P. Huang, A. Bouranbaier, H. Chien y H. Kung. Inhibition of the integrase of Human Immunodeficiency Virus (HIV) type 1 by anti-HIV plan proteins MAP 30 and GAP 31. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995. **92**: 8818-8822.
18. Li B. Q, T. Fu, Y. Dongyan, J. A. Mikovits, F. W. Ruscetti y J. M. Wang. Flavonoid baicalin inhibits VIH-1 infection at the level of viral entry. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2000. **276**: 534-538.
19. Lin Y., M. Y. Flavin, R. Schure, F. Chen, R. Sidwell, D. L. Barnard, J. H. Huffman y E. R. Kern. Antiviral Activities of Biflavonoids. *Planta Med*. 1999. **65**: 120-125.
20. Luciw, P. A. Human Immunodeficiency Viruses and their replication. En: *Virology* (eds. B.N. Fields, D.M. Knipe & P.M. Howley), Vol. Two. USA: Lippincott-Raven Publishers; 1996.
21. MGT Inc. Sin fecha. Live Cell Luciferase Assay Kit. Product Information Sheet (0626-005).
22. Mullin S.M., C. M. Jamjian, S. L. Spruance. Antiretroviral adverse effects and interactions: clinical recognition and management. En: *The medical management of AIDS*. (eds. M. A. Sande y P. A. Volderbing). USA: W.B. Saunders Company; 2000.
23. Nussbaum O., C. Broder y E. Berger. Fusogenic mechanisms of enveloped-virus glycoproteins analyzed by a novel recombinant vaccinia virus-based assay quantitating cell fusion-dependent reporter gene activation. *J. Virol*. 1994. **68**, 5411-5422.
24. Oei S. L., J. Griesenbeck, M. Schweiger y M. Ziegler. Regulation of RNA polymerase II-dependent Transcription by Poly(ADP-ribosyl)ation of Transcription Factors. *J. Biol. Chem*. 1998. **273**: 31644-31647.
25. Ogata T., H. Higuchi, S. Mochida, H. Matsumoto, A. Kato, T. Endo, A. Kaji y H. Kaji. HIV-1 Reverse Transcriptase inhibitor from *Phyllanthus niruri*. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 1992. **8**: 1937-1944.
26. Pauwels R., J. Balzarini, M. Baba, R. Snoeck, D. Schols, P. Herdewijn, J. Desmyter y E. De Clerq. Rapid and automated tetrazolium-based colorimetric assay for the detection of anti-HIV compounds. *J. Virol. Methods*. 1988. **20**: 309-321.
27. Pengsuparp, T. Specific inhibition oh Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase by Soulattrolide, a coumarin isolated from the latex of *Calophyllum teysmannii*. *J. Nat. Prod*. 1996. **59**: 839-842.
28. Peumans W., Q Hao y E. Van Damme. Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases? *FASEB*. 2001. **15**: 1493-1505.
29. Premanathan M., R. Arakaki, H. Izumi, K. Kathiresan, M. Nakano, N. Yamamoto, H. Nakashima. Antiviral properties of a mangrove plant, *Rhizophora apiculata* Blume, against Human Immunodeficiency Virus. *Antiviral Res*. 1999. **44**: 113-122.
30. Princen K y D. Schols. VIH chemokine receptor inhibitors as novel anti-VIH drugs. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005. **16**: 659-677.
31. Qian-Cutrone J., S. Huang, J. Trimble, H. L. Lin, M. Alam, S. E. Klover y K. F. Kadow. Niruricide, a new HIV REV/RRE binding inhibitor from *Phyllanthus niruri*. *J. Nat. Prod*. 1996. **59**: 196-199.
32. Riss T. y R. Moravec. Improved Non-Radioactive Assay to Measure Cellular Proliferation or Toxicity: the Celltiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay. *Promega Notes Magazine*. 1996. **59**: 19-24.
33. Schols D., M. Baba, R. Pauwels y E. De Clerq. Flow cytometric method to demonstrate whether anti-HIV agents inhibit virion binding to T4⁺ cells. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr*. 1989. **2**: 10-15.

34. Sierra, S., B. Kupfer., R. Kaiser. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *J. Clin. Virol.* 2005. **34**: 233-244.
35. Tsai Y., T. Aoki, H. Maruta, H. Abe, H. Sakagami, T. Hatano, T. Okuda y S. Tanuma. Mouse Mammary Tumor Virus gene expression is suppressed by oligomeric ellagitannins, novel inhibitors of poly (ADP ribose) glycohydrolase. *J. Biol. Chem.* 1992. **267**: 14436-14442.
36. Uchiumi F., H. Maruta, J. Inoue, T. Yamamoto y S. Tanuma. Inhibitory effect of tannic acid on Human Immunodeficiency Virus promoter induced by 12-O-tetra decanoylphorbol-13-acetate in Jurkat T-Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996. **220**: 411-417.
37. Uchiumi F., T. Hatano, H. Ito, T. Yoshida y S. Tanuma. Transcriptional supresión of the HIV promoter by natural compounds. *Antiviral Res.* 2003. **58**: 89-98.
38. Wang Y., N. Neamati, J. Jacob, I. Palmer, S. Stahl, J. Kaufman, P. Huang, H. Winslow, Y. Pommier, P. Wingfield, S. Lee-Huang, A. Bax y D. Torchia. (1999). Solution structure of anti-HIV-1 and anti-tumor protein Map 30: structural insights into its multiple functions. *Cell.* **99**: 433-442.
39. Weiss, R.A. (2000). Getting to know HIV. *Trop. Med. Int. Health.* **5**: 10-15.
40. Xu H., F. Zeng, M. Wan y K. Sim. Anti-HIV triterpene acids from *Geum japonicum* .*J. Nat. Prod.* 1996. **59**: 643-646.
41. Zarocostas, J. (2005). Number of people infected with VIH worldwide reaches 40 m. *Br. Med. J.* **331**: 1224.