

Implementación de un método fluorométrico para evaluación de actividad anti transcriptasa reversa del virus VIH-1

Carolina Wilches-Arciniegas¹ Claudia Patricia Cordero-Camacho²
y Fabio Ancízar Aristizábal-Gutiérrez^{1, 2 y 3}

Resumen

Se implementó una prueba de tamizaje preliminar para evaluar la potencial inhibición ejercida por productos de origen natural y sintético sobre la actividad de la proteína Transcriptasa Reversa del virus VIH-1, en respuesta a la necesidad de disponer de un ensayo *in vitro* no radioactivo, relativamente rápido, que arroje resultados válidos, con costos moderados, bioseguro y de fácil acceso. Esta prueba se basa en la capacidad que tiene la proteína transcriptasa reversa viral para formar DNA de cadena sencilla (cDNA) a partir de RNA, utilizando deoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), proceso conocido como transcripción reversa. Para detectar la actividad de la proteína se realizaron ensayos fluorométricos *in vitro*, usando proteína recombinante sin purificar, y nucleótidos fluorescentemente marcados (Cy3-dCTP) como parte del sustrato. Las condiciones establecidas para la actividad de la proteína fueron 5 µg/reacción de RNA total y 2 µg/reacción de oligo-dT₁₂₋₁₈, reflejadas en 43.6% de incorporación del nucleótido fluoromarcado.

Palabras clave: VIH-1 - Transcriptasa reversa - SIDA - cDNA - Retrotranscripción, Cy3

Summary

Implementation of a fluorometric method for the anti HIV-1 virus reverse transcriptase activity evaluation

A preliminary screening test to asses the potential of natural and synthetic products to inhibit the HIV-1 reverse transcriptase activity was implemented. This method is a response to the need of an *in vitro*, non radioactive, easy, biosafety and rapid test, with reliable results and accesible to our laboratories. This test is based on the ability of the viral reverse trascriptase (RT) of synthesize single strand DNA (cDNA) from a RNA strand, using triphosphate deoxynucleotides (dNTPs), process known as reverse transcription. In order to detect the enzyme activity *in vitro* fluorometric assays were carried out, with unpurified recombinant protein and fluorescently marked nucleotides as part of the substrate (Cy3-dCTP). Conditions for the protein activity

1. Posgrado Interfacultades de Microbiología.
2. Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14490, Bogotá D.C. Colombia.
3. E-mail: faaristizabal@unal.edu.co

Recibido para evaluación: junio 3 de 2005
Aceptado para publicación: julio 29 de 2005

were established at 5 μ g/reaction of total RNA and 2 μ g/reaction of oligo-dT₁₂₋₁₈, which gave a 43.6% of incorporation of fluorescent nucleotide (Cy3-dCTP).

Key words: HIV-1 - Reverse Transcriptase - AIDS - cDNA - Retrotranscription, Cy3.

Introducción

El virus de la inmunodeficiencia humana tipo uno (VIH-1), agente etiológico más agresivo del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), pertenece a la familia retroviridae, posee dos copias de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva y requiere de un intermediario DNA para su proliferación (1). La replicación del virus se inicia con la transcripción reversa de la cadena viral RNA en una doble cadena DNA, la cual es posteriormente integrada en el DNA cromosomal de la célula hospedadora. Esta etapa proviral de síntesis de cDNA, crítica para el ciclo de vida retroviral, es catalizada por la enzima Transcriptasa Reversa viral (TR). La TR es biosintetizada como un producto del gen *Pol*, el cual también codifica para las proteínas proteasa (PR) e integrasa (IN). La poliproteína primaria de TR es luego procesada por la proteasa para dar un heterodímero de la TR-HIV-1 funcional que contiene las subunidades p66 (66KDa) y p51 (51KDa) (2).

Durante la replicación, la cadena RNA es copiada por la actividad DNA polimerasa dependiente de RNA (PDDR) de la TR, produciendo un híbrido RNA-DNA. La actividad RNasa-H degrada específicamente el RNA viral del heteroduplex y finalmente la doble cadena de DNA viral es obtenida por la síntesis de la segunda cadena de DNA, por la actividad DNA polimerasa dependiente de DNA (PDDD) de la TR (3). Siendo la TR requerida para la síntesis inicial del DNA proviral, la inhibición de la polimerización de DNA a partir de RNA viral catalizado por TR, inhibe la replicación del virus (4, 5).

La introducción de terapias antiretrovirales ha mejorado la calidad de vida de pacientes con avanzada infección viral y previniendo o deteniendo la progresión de la enfermedad. Sin embargo, es imposible eliminar completamente el VIH de los individuos infectados, y evitar al mismo tiempo, los fuertes efectos secundarios que sufren algunos de los pacientes y la aparición de virus multirresistentes en pacientes que han recibido medicación por largo tiempo. Estos hechos hacen necesario desarrollar nuevos moléculas que inhiban diferentes fases de la replicación viral. La búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas, involucra el estudio de principios activos naturales, de los cuales los más estudiados son los derivados de plantas (6, 7).

La producción de TR-HIV1 a través de técnicas recombinantes ha hecho que la identificación de inhibidores sea un proceso más fácil, la especificidad de los inhibidores puede ser determinada por la medición de sus propiedades inhibitorias sobre polimerasas no virales. La mayoría de los ensayos para determinar la actividad de la enzima TR están basados en medir la incorporación de nucleótidos marcados en la síntesis de DNA. La detección de la actividad enzimática es posible a través de ensayos isotópicos y no isotópicos. Los ensayos isotópicos radioactivos miden la cantidad de DNA sintetizado *in vitro* por la TR empleando nucleótidos que se marcan con tritio ($\alpha^3\text{H}$) o fosforo 32 ($\alpha\text{-}^{32}\text{P}$) (8).

Por otro lado, los ensayos no isotópicos que utilizan nucleótidos trifosfatados marcados con digoxigenina o biotina y determinan la actividad de la RT-HIV1 por mediciones de tipo

ELISA, tienen ventajas asociadas a una manipulación segura al ser no radioactivos, pero presentan costos elevados (7, 9).

En este trabajo se describe la implementación de un ensayo fluorométrico para la evaluación *in vitro* de la potencial actividad inhibitoria sobre VIH de compuestos, mediante la determinación de la interferencia en la actividad polimérica de la proteína retrotranscriptasa recombinante de HIV-1 empleando fracciones protéticas sin purificar.

Materiales y métodos

Producción de la proteína TR recombinante

Se empleó la cepa comercial *E. coli* HB101 transformada con el plásmido pHRTRX-2 (ATCC 67828), que contiene la porción del gen *pol* que codifica para la proteína Transcriptasa Reversa del virus VIH-1, codificada por el provirus pHXBc2. (10). En este vector la expresión del gen de la RT está regulada por un promotor TrpE (promotor triptófano), que permite inducir la expresión de la proteína recombinante con ácido indolacrílico, que actúa como atenuador del represor de la transcripción (10-13).

Se obtuvo un inóculo de *E. coli* pHRTRX-2 en medio M9 suplementado con triptófano (13). A partir de este se estableció un cultivo en medio M9 sin triptófano, suplementado con ácido indolacrílico (IAA) 10 µg/mL, incubando a 37°C con agitación, hasta alcanzar una densidad óptica a 600nm (D.O_{600nm}) de 0.5 unidades de absorbancia. Para conocer la producción basal de la proteína recombinante se realizó un cultivo en las mismas condiciones pero en ausencia del inductor (IAA).

Las células se recolectaron por centrifugación a 2000 rpm por 5 minutos, se lavaron con solución de lavado (TrisHCl 10mM, NaCl

100mM, EDTA 1mM, pH 8,0), se recolectaron por centrifugación a 12000 rpm por 2 minutos a 4°C. Se resuspendieron en solución de extracción (TrisHCl 10mM, NaCl 500mM, PMSF 100mM, pH 8,0) y se lisaron por sonicación con cuatro pulsos de 20s cada uno e intervalos de reposo de 10s entre los pulsos, en baño de hielo. El lisado se centrifugó a 12000 rpm por 10 min a 4°C para obtener dos fracciones: insoluble y soluble. En las dos fracciones se determinó la concentración proteica total por el método de Bradford (14). La producción de la proteína recombinante fue verificada mediante electroforesis en geles de poliácridamida denaturantes (SDS-PAGE), teñidos con azul de Coomassie.

Determinación de la actividad de la proteína TR recombinante de VIH-1

Template. El RNA total utilizado como molde durante el ensayo, se obtuvo por el método de Trizol® a partir de cultivos de líneas celulares derivadas de tumores sólidos humanos. La concentración se determinó espectrofotométricamente en el equipo Smart-Spec®, empleando el factor de conversión 1 Unidad de absorbancia a 260nm equivalen a 40 µg/µL.

Mezcla de nucleótidos (dNTPs y Cy3-dCTP). se empleó la mezcla: dTTP 25mM, dATP 25mM, dGTP 25mM, dCTP 25mM y Cy3-dCTP. Este último nucleótido marcado con el fluorocromo Cy3 al ser incorporado en la cadena de cDNA sintetizada actúa como indicador directo de la síntesis de la primera cadena de cDNA y por tanto permite valorar la capacidad que tiene la proteína TR recombinante de incorporar nucleótidos. La concentración de Cy3-dCTP empleada, se seleccionó realizando diluciones seriadas del reactivo original en relaciones 1:100 hasta 1:1000 y comparando la

intensidad de la banda obtenida al evaluar en geles de poliacrilamida denaturante. La concentración que permitió obtener una banda definida y clara, corresponde a la dilución 1:400 equivalente a una concentración 0.67 μ M.

TR recombinante. La cantidad de extracto total proteico utilizado fue de aproximadamente 200 μ g para un volumen final de reacción de 30 μ L de acuerdo con los parámetros de actividad establecidos en la patente y en otros trabajos (4, 8, 12, 15).

Mezcla de reacción. Como primer o iniciador se utilizó Oligo dT₁₂₋₁₈ en concentraciones variables de 4, 3 y 2 μ g/reacción; el RNA total eucariote empleado como template se utilizó en concentraciones variables de 10, 8, 5 y 3 μ g/reacción, con el fin de encontrar la relación primer-template que permitiera observar la actividad enzimática. La mezcla de reacción incluyó MgCl₂ 10mM, TrisHCl 50mM, DTT 20mM, NaCl 60mM y BSA 0,05%, según las concentraciones empleadas por Goff *et al.* La reacción de incorporación se llevó a cabo a 37°C durante 1 hora de acuerdo a protocolos reportados por Ta (16) y Ali (17). El proceso, incluyendo la electroforesis, se llevó a cabo en cuarto oscuro debido a la fotosensibilidad de los nucleótidos fluoromarcados.

Incorporación de nucleótidos marcados como medida de la actividad Transcriptasa Reversa de la proteína TR recombinante

Para visualizar el cDNA de cadena sencilla producto de la reacción y los nucleótidos marcados no incorporados, se realizó una separación por electroforesis en geles de poliacrilamida denaturante con urea (19%), con 7cm de ancho, 5cm de largo y 0.75mm de espesor. Los geles se corrieron a 50V durante 5 horas.

Análisis del producto de cDNA de cadena sencilla. Una vez finalizado el corrido electroforético, los geles se analizaron con el software Quantity One (Bio Rad®), considerando que el fluorocromo Cy3 presenta su máxima excitación a una longitud de onda de 532nm.

Se realizaron mediciones densitométricas de la intensidad de la señal de los nucleótidos fluoromarcados no incorporados (Cy3-dCTP) en cada reacción expresada en unidades de intensidad de fluorecencia por milímetro cuadrado (Int/mm²), debido a que aparece como una banda definida en todas las reacciones, mientras el cDNA sintetizado se observa como un barrido tenue. Para cada gel analizado, las densidades obtenidas en los diferentes carriles se compararon frente a un control negativo de incorporación que contenía la mezcla de reacción completa, excepto la proteína recombinante. Se considera que en este control el 100% del nucleótido Cy3-dCTP se encuentra libre.

Para la medición de densidad se utilizó una casilla con un área constante de 900 a 903 pixeles, definida manualmente con el cursor, enmarcando la banda de los nucleótidos Cy3-dCTP no incorporados. Se decidió utilizar esta herramienta porque da una medida rápida de la señal de intensidad de la imagen, además muestra la intensidad total, un promedio de la intensidad y la desviación estándar de la misma, asumiendo para ello cada píxel como una unidad de medida. Los análisis se hicieron en un tiempo de exposición entre 0.5 y 5 segundos.

Control positivo de inhibición. Como control positivo de inhibición de la incorporación se empleó Efavirenz, inhibidor de Transcriptasa Reversa no análogo de nucleósidos aprobado por la FDA. Se decidió manejar este tipo de compuesto ya que a diferencia de los inhibidores análogos de nucleósidos, no requiere activación por fosforilación, la cual es mediada por enzimas celulares (18). Para evaluar la capacidad inhibitoria del

Efavirenz se trabajó en concentraciones de 100, 50 y 10nM. El porcentaje de actividad inhibitoria del compuesto se calculó considerando como 100% de inhibición al control negativo de incorporación (16, 19-21).

Resultados y discusión

Producción de la proteína recombinante

Para cultivos celulares de *E. coli* HB101 transformada con el plásmido pHRTRX-2, se evaluaron los niveles basales de expresión de la proteína recombinante sin ácido indolacrílico. Se observó que las células producían la proteína recombinante en baja cantidad, como se puede apreciar por las bandas tenues correspondientes al tamaño de 66kDa tanto en fracciones solubles (sobrenadante) como en fracciones insolubles (precipitado) (Figura 1).

Cuando las células se crecieron en presencia de 10 µg/mL de ácido indolacrílico, se

observó un aumento marcado en la expresión de proteína TR recombinante. La mayor concentración de proteína se detectó en la fracción insoluble del lisado celular (precipitado), lo cual podría ser ventajoso dado que la proteína podría estar más protegida de la degradación por proteasas de la célula hospedera *E. coli*.

Empleando el método de Bradford se determinó que la cantidad de proteína total obtenida fue de 20.6 mg/mL en el sobrenadante y 40 mg/mL en el precipitado.

Determinación de la actividad de la proteína TR recombinante de VIH-1

Concentración de iniciador o *primer*. Empleando una concentración constante de template (RNA total) de 10µg/reacción (0,33µg/µL) (13), se evaluó el efecto de la concentración del

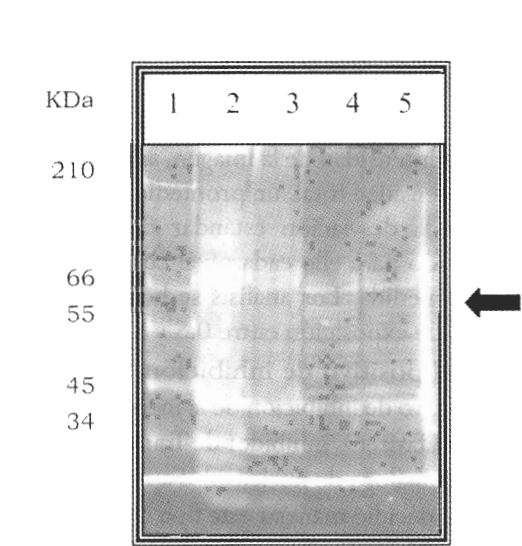


Figura 1. Proteínas totales extraídas por sonicación de células *E.coli* pHRTRX-2, crecimiento sin ácido indolacrílico. 1. Marcador de peso molecular See Blue® (Invitrogen) 2. Precipitado 1, 3. Precipitado 2, 4. Sobrenadante 1 y 5. Sobrenadante 2.

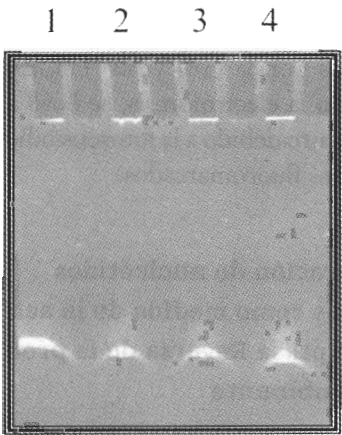


Figura 2. Efecto de la concentración de iniciador (OligodT₁₂₋₁₈) en la actividad enzimática. Concentración de template (RNA total) constante: 10µg/reacción. 1. Control negativo de incorporación (sin extracto proteico) 2. 4 µg/reacción 3. 3 µg/reacción 4. 2 µg/reacción. Condiciones de electroforesis 50V, 5 horas, en poliacrilamida denaturante; volumen/ pozo 30µL.

iniciador (Oligo-dT₁₂₋₁₈) en 2, 3 y 4 µg/reacción. Con esta concentración de template el efecto de la variación de concentración del iniciador en la incorporación del nucleótido fluoromarcado fue mínimo (Figura 2), por tanto se seleccionó la menor concentración evaluada (2 µg/reacción) como concentración de trabajo. En un ensayo independiente se evaluó la actividad de la enzima empleando 1 µg/reacción y no se obtuvo incorporación.

De acuerdo al análisis densitométrico del gel presentado en la Figura 2, la concentración mínima de Oligo-dT₁₂₋₁₈ (2 µg/reacción) es adecuada para la actividad de la proteína recombinante. Al comparar la intensidad de la banda de nucleótido fluoromarcado no incorporado para esta condición (carril 4): 12351.4 unidades de Intensidad/mm² frente a la intensidad del

control negativo de incorporación (carril 1): 21902.5 Int/mm², se observa un marcado descenso de la intensidad, lo que indica incorporación del nucleótido marcado en la cadena sintetizada de cDNA (Tabla 1).

Considerando el control negativo (carril 1) como el 0% de incorporación, se tiene que con 4 µg/reacción de Oligo-dT₁₂₋₁₈ se obtiene una incorporación del 43.49% del nucleótido fluoromarcado Cy3-dCTP en la reacción. Para las concentraciones de Oligo-dT₁₂₋₁₈ 3 y 2 µg/reacción se obtienen porcentajes de incorporación similares: 43.53% y 43.61%. Esto muestra que la variación de la concentración del iniciador dentro de este rango, no modifica la actividad de incorporación de la enzima.

Concentración de template (RNA total). Manteniendo constante la concentración de

Tabla 1. Efecto de la concentración de iniciador (Oligo dT₁₂₋₁₈) en el porcentaje de incorporación.

Concentración de iniciador (µg/reacción)	Intensidad (INT/mm ²)	Desviación Estándar	Porcentaje de incorporación	Píxeles
0	21902,5	248,6	0	902
2	12378	140,5	43,48	902
3	12370	171,5	43,52	902
4	12351,4	140,2	43,61	902

Tabla 2. Efecto de la concentración de template en el porcentaje de incorporación de Cy3-dCTP.

Concentración de template (µg/reacción)	Intensidad (INT/mm ²)	Desviación Estándar	Porcentaje de incorporación	Píxeles
10	15394,8	174,7	29,3	902
8	14851,9	168,6	31,8	902
5	15888,5	180,3	27,1	902
3	21610,4	238,9	0,8	902
0	21788,2	247,3	0	902

iniciador (OligodT₁₂₋₁₈) en 2 µg/reacción, se varió la concentración de RNA template: 10, 8, 5, y 3 µg/reacción, esto con el fin de establecer si era posible reducir la concentración establecida con base en reportes de Ta (16) y Ali (17) entre otros. Por análisis densitométrico no se encontró diferencia en el porcentaje de incorporación del nucleótido fluoromarcado con las concentraciones de 5, 8 y 10 µg/reacción (Tabla 2, Figura 3), mientras con 3 µg/reacción, se observa un marcado descenso en el porcentaje de incorporación. Esto indica que es posible emplear el RNA total template en una concentración mínima de 5 µg/reacción (Figura 3).

Inhibición de la actividad de la enzima TR de VIH-1

Control positivo de inhibición (Efavirenz).

Una vez establecidas las condiciones de trabajo de la proteína recombinante TR sin purificar, se evaluó el efecto inhibitorio del control positivo de inhibición Efavirenz en 3 concentraciones

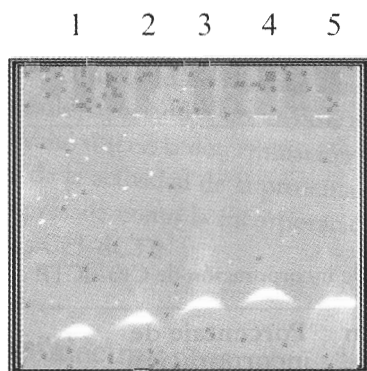


Figura 3. Efecto de la concentración de template (RNA total) Concentración de Oligo dT₁₂₋₁₈, constante 2 µg/reacción. 1. 10 µg/reacción RNA total 2. 8 µg/reacción RNA total, 3. 5 µg/reacción RNA total 4. 3 µg/reacción RNA total 5. Control negativo de incorporación.

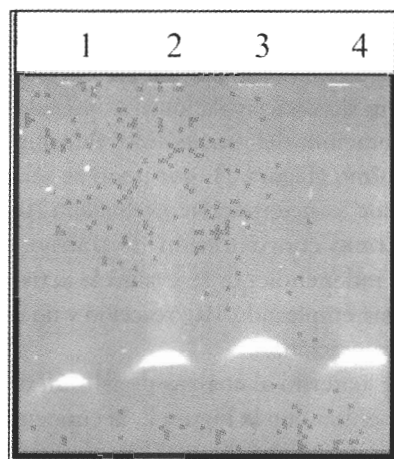


Figura 4. Inhibición de la actividad de la retrotranscriptasa de VIH-1 por Efavirenz con 5 µg/reacción RNA total y 2 µg/reacción Oligo dT₁₂₋₁₈. 1. 10 nM, 2. 50 nM, 3. 100 nM, 4. Control negativo de inhibición. Condiciones de electroforesis 50V, 5 horas, gel de poliacrilamida denaturante. Volumen/pozo 30 µL.

100, 50 y 10 nM. (Figura 4). Valoración que se realizó por triplicado en días diferentes.

De acuerdo al análisis densitométrico se estableció que el compuesto Efavirenz reduce *in vitro* la actividad de la proteína recombinante en las tres concentraciones valoradas (100, 50 y 10 nM, Figura 4). La inhibición de la incorporación es dependiente de la concentración y a mayor concentración de Efavirenz se observa mayor inhibición, reflejada en una reducción del porcentaje de incorporación (Tabla 3, Figura 5). Con la concentración 100 nM se observa que la incorporación baja hasta el 6,5%, lo que se puede considerar como una inhibición total de la actividad retrotranscriptasa de la proteína recombinante.

Se logró producir una proteína recombinante TR del virus VIH-1, y se establecieron las concentraciones de template (RNA eucariote total), iniciador (oligodT₁₂₋₁₈) y nucleótido fluoromarcado (Cy3-dCTP) para evaluar su actividad de síntesis de cDNA de cadena sencilla *in vitro*. Las condiciones establecidas fueron: 5 µg/reac-

Tabla 3. Efecto del Efavirenz en el porcentaje de incorporación de Cy3-dCTP.

Concentración Efavirenz (nM)	Intensidad (INT/mm ²) ^a	Desviación Estándar	Porcentaje de incorporación ^a	Pixeles
0	21879,6	37,9	0	
10	20464	166,3	40,6	902
50	17335,3	437,1	20,8	902
100	12996,7	628,5	6,5	902

^a Media de tres determinaciones

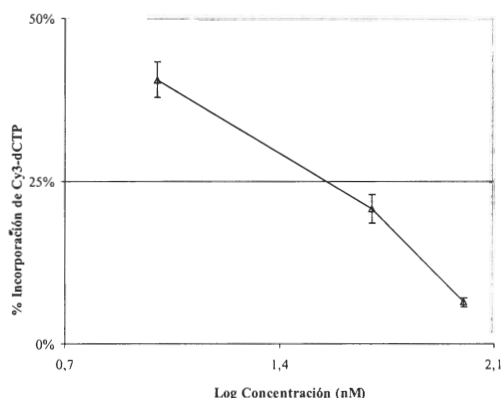


Figura 5. Efecto inhibitorio de Efavirenz. Porcentaje de incorporación de Cy3-dCTP en función del Logaritmo₁₀ de la concentración de Efavirenz (nM). Δ Media de tres determinaciones ± desviación estándar.

ción de template, 2μg/reacción de iniciador y 10 mM de Cy3-dCTP.

El método de marcaje fluorométrico empleado, asociado a un análisis densitométrico, resultó útil en la determinación semicuantitativa de la actividad de la proteína recombinante, expresada como la incorporación de nucleótidos Cy3-dCTP.

Agradecimientos

Al Departamento de Farmacia y al Laboratorio de Microbiología del Instituto de Biotecnología, por permitir el uso de sus instalaciones para el desarrollo de este trabajo.

Bibliografía

1. J. Hansen, T. Schulze, W. Mellert y K. Moelling, Identification and characterization of HIV-specific RNase H by monoclonal antibody, *EMBO J.*, **7**, 239 (1988).
2. B. Larder, D. Purifoy, K. Powell y G. Darby, AIDS virus reverse transcriptase defined by high level expression in Escherichia coli, *EMBO J.*, **6**, 3133 (1987)
3. E. Bowman, V. Pathak y H. Hu, Efficient initiation and strand transfer of polypurine tract-primer-plus-strand DNA prevent strand transfer of internally initiated plus strand DNA, *J. Virology*, **70**, 1687 (1996).
4. N. Tanese, M. Roth y S. Goff, Expression of enzymatically active reverse transcriptase in Escherichia coli, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 4944 (1985).
5. M. Roth, N. Tanese y S. Goff, Purification and Characterization of Murine Retroviral Reverse Transcriptase expressed in Escherichia coli, *J. Biol. Chem.*, **260**, 9326 (1985).
6. T. Kanamoto, Y. Kashiwada, K. Kanbara, K. Gotoh, M. Yoshimori, T. Goto, K. Sano y H. Nakashima, Anti-Human Immunodeficiency Virus Activity of YK-FH312 (a Betulinic Acid Derivative), a Novel Compound Blocking Viral Maturation, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **45**, 1225 (2001).
7. G. Matthee, A. Wrigth y G. Koning, HIV Reverse Transcriptase Inhibitors of Natural Origin, *Planta Médica*, **65**, 493 (1999).

8. N. Tanese, J. Sodroski, W. Haseltine y D.S. Goff, Expression of reverse transcriptase activity of human T-lymphotropic virus type III (HTLV-III/LAV) in *Escherichia coli*, *J. Virology*, **59**, 743 (1986).
9. Amersham Biosciences UK Limited, "Quan-T-RT assay system Documento técnico TRK 1022", Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, 2002.
10. L. Ratner, W. Haseltine, R. Patarca, K.J. Livak, B. Starcich, S.F. Josephs, E.R. Josephs, E.R. Doran, J.A. Rafalski, E.A. Whitehorn y K. Baumeister, Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III, *Nature*, **313**, 277 (1985).
11. K.R. Spindler, D.S. Rosser y A.J. Berk, Analysis of adenovirus transforming proteins from early regions 1A and 1B with antisera to inducible fusion antigens produced in *Escherichia coli*, *J. Virology*, **49**, 132 (1984).
12. V. Prasad y S. Goff, Linker insertion mutagenesis of the human immunodeficiency virus reverse transcriptase expressed in bacteria: definition of the minimal polymerase domain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 3104 (1989).
13. S.P. Goff y N. Tanese, Expression of human immunodeficiency virus (HIV) reverse transcriptase. United States Patent. Patent Number: 5.202.259, 1993.
14. M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248 (1976).
15. N. Tanese y S.P. Goff, Domain structure of the Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase: mutational analysis and separate expression of the DNA polymerase and RNase H activities, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 1777 (1988).
16. T. Ta, A. Kinghorn, S. Hughes y J. Pezzuto, Psychotrine and Its O-methyl Ether are selective inhibitors of human immunodeficiency virus-1 reverse Transcriptase, *J. Biol. Chem.*, **266**, 23529 (1991).
17. H. Ali, G. Köning, S. Khalid, A. Wright y R. Kaminsky, Evaluation of selected Sudanese medicinal plants for their invitro activity against hemoflagellates, selected bacteria, HIV-1-RT, and tyrosine kinase inhibitory and for cytotoxicity, *J. Ethnopharmacol.*, **83**, 219 (2002).
18. D.L. Romero, M. Busso, C.K. Tan, F. Reusser, J.R. Palmer, S.M. Poppe, P.A. Aristoff, K.M. Downey, A.G. So y L. Resnick, Nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors that potently and specifically block human immunodeficiency virus type 1 replication, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 8806 (1991).
19. T. Pengsuparp, L. Cai, H. Constant, H.H. Fong, L.Z. Lin, A.D. Kinghorn, J.M. Pezzuto, G.A. Cordell, K. Ingolfssdottir y H. Wagner, Mechanistic evaluation of new plant-derived compounds that inhibit HIV-1 reverse transcriptase, *J. Nat. Prod.*, **58**, 1024 (1995).
20. H. Sun, S. Qiu, L. Lin, Z. Wang, Z. Lin, T. Pengsuparp, J. Pezzuto, H. Fong, G. Cordell y N. Farnsworth, Nigranoic Acid, a triterpenoid from *Schisandra sphaerandra* that inhibits HIV-1 Reverse Transcriptase, *J. Nat. Prod.*, **59**, 525 (1996).
21. T. Fujihasshi, H. Hara, T. Sakata, K. Mori, H. Higuchi, A. Tanaka, H. Kaji y A. Kaji, Anti-human immunodeficiency virus (HIV) activities of halogenated gomisin J derivatives, new nonnucleoside inhibitors of HIV type 1 reverse transcriptase, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **39**, 2000 (1995).
22. A. Ahmad, J. Davies, S. Randall y G. Skinner, Antiviral properties of extract of *Opuntia streptacantha* I, *Antiviral Res.*, **30**, 75 (1996).