PRODUCCIÓN, PURIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE LOS ATRIBUTOS DE CALIDAD DE LA ENZIMA M-MLV RETROTRANSCRIPTASA (RT) OBTENIDA *IN HOUSE* MEDIANTE UN SISTEMA RECOMBINANTE EN *E. coli* BL21 (DE3)

Jessica Torres Agredo

UNIVERSIDAD ICESI

FACULTAD DE INGENIERÍA, DISEÑO Y CIENCIAS APLICADAS

PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA

Santiago de Cali

2024

EVALUACIÓN DE LOS ATRIBUTOS DE CALIDAD DE LA ENZIMA M-MLV RETROTRANSCRIPTASA (RT) OBTENIDA *IN HOUSE* MEDIANTE UN SISTEMA RECOMBINANTE EN *E. coli* BL21 (DE3)

Jessica Torres Agredo

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TITULO DEL PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA

Tutor:

Steven Alexander David Jiménez, MSc.

CoTutor:

Paola Andrea Caicedo Burbano, Ph.D.

Santiago de Cali

2024

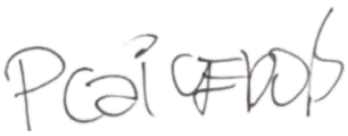
AVAL PARA LA ENTREGRA DE PDG II

Firma del Tutor:



Steven A. David

Firma del Co-Tutor:



Paola A. Caicedo

Firma del estudiante:



Jessica Torres Agredo

TABLA DE CONTENIDO

1. **Resumen del proyecto:** 7
2. **Introducción** 8
3. **Metodología** 10
4. **Resultados y discusión** 19

Conclusiones 36

Agradecimientos 37

5. **Referencias bibliográficas** 37

anexos 39

Listado de tablas

Tabla 1. Buffers necesarios para la purificación de la enzima por cromatografía por afinidad. 14
Tabla 2. Componentes de buffer de almacenamiento. 15
Tabla 3. Estudio de estabilidad: Condiciones de almacenamiento a evaluar. 15
Tabla 4. Matriz de estudio de estabilidad para la enzima recombinante M-MLV RT. 16
Tabla 5. Termoperfil requerido para la RT-PCR de M-MLV RT. 17
Tabla 6. Reactivos necesarios para el mix de PCR. 18
Tabla 7. Termoperfil requerido para la qPCR de M-MLV RT. 18
Tabla 8. Reactivos necesarios para el mix de qPCR. 18
Tabla 9. Determinación de la concentración de MMLV-RT. 20
Tabla 10. Determinación de la concentración de M-MLV RT del **Lote I** a t_0, t_1 y t_2. 27
Tabla 11. Determinación de la concentración de M-MLV RT del **Lote II** a t_0, t_1 y t_2. 28
Tabla 12. Determinación de la concentración de M-MLV RT del **Lote III** a t0, t1 y t2. 29
Tabla 13. Evaluación de la actividad biológica de la M-MLV RT recombinante LOTE I. 30
Tabla 14. Evaluación de la actividad biológica de la M-MLV RT recombinante LOTE II. 32
Tabla 15. Evaluación de la actividad biológica de la M-MLV RT recombinante LOTE III. 34

Listado de figuras

Figura 1. Mapa del plásmido pET – 19b MMLV RT empleado para la expresión del gen M-MLV RT; en este se puede detallar el promotor T7, el operador lac, la secuencia 10xHis-Tag, el gen de resistencia a Ampicilina. Imagen tomada de: https://www.addgene.org/browse/sequence/298742/. 9
Figura 2. Evaluación de la producción M MLV-RT de tres (3) lotes a escala de 2 Litros y un (1) lote de 1 L. **A)** Gel de electroforesis SDS-PAGE teñido con azul de comassie (6 uL de muestra). **MWM PageRuler™:** Marcador de peso molecular, **PT:** Proteína Total, **FS:** Fracción Soluble. **B)** Resultados de

la Cuantificación de M MLV-RT de la Fracción soluble con respecto a la toda la proteína presente. *El gráfico de barras expone el resultado en mg/mL del valor promedio de los tres lotes de 2L vs el lote de 1L. 21
Figura 3. Esquema del complejo de formación entre la resina de Ni^{2+} y la cola de histidina. Imagen tomada de: https://cube-biotech.com/our-science/protein-purification/his-tag/. 22
Figura 4. Evaluación del ensayo de purificación por cromatografía de afinidad **A.** Gel de electroforesis SDS-PAGE teñido con azul de comassie (13 uL de muestra). **MWM Kaleidoscope™:** Marcador de peso molecular. **FS**: Fracción soluble. **B.** Densitometría del gel en cuestión correspondiente a la densidad óptica de las bandas del carril 2 referente a la fracción purificada de FS. 23
Figura 5. Estimación cualitativa mediante SDS-PAGE del grado de pureza a **t_0, t_1 y t_2** post-producción de la M MLV-RT **Lote I**. El gel del lado izquierdo corresponde a la evaluación de la enzima almacenada a **4°C**. En contraste, el gel del lado derecho corresponde a la evaluación de la enzima almacenada a **-20°C**. **MWM Kaleidoscope™:** Marcador de peso molecular, **R:** Replica. 25
Figura 6. Estimación cualitativa mediante SDS-PAGE del grado de pureza a **t_0, t_1 y t_2** post-producción de la M MLV-RT **Lote II**. El gel del lado izquierdo corresponde a la evaluación de la enzima almacenada a **4°C**. En contraste, el gel del lado derecho corresponde a la evaluación de la enzima almacenada a **-20°C**. **MWM Kaleidoscope™:** Marcador de peso molecular, **R:** Replica. 25
Figura 7. Estimación cualitativa mediante SDS-PAGE del grado de pureza a **t_0, t_1 y t_2** post-producción de la M MLV-RT **Lote III**. El gel del lado izquierdo corresponde a la evaluación de la enzima almacenada a **4°C**. En contraste, el gel del lado derecho corresponde a la evaluación de la enzima almacenada a **-20°C**. **MWM Kaleidoscope™:** Marcador de peso molecular, **R:** Replica. 25
Figura 8. Estimación de la concentración de M-MLV RT determinado mediante el reactivo Bradford en conjunto el análisis densitómetro de cada gel en cuestión. Las gráficas de barras reúnen los datos obtenidos con base al valor promedio de las tres replicas almacenadas a 4°C y a -20°C con respecto al tiempo evaluado (t_0, t_1 y t_2 post producción). 27
Figura 9. Ensayo de actividad biológica mediante RT-qPCR del **Lote I a t_0, t_1, t_2**. La Línea verde representa la M MLV-RT comercial New England BioLabs® vs la M MLV-RT recombinante almacenada a 4°C y -20°C (R1, R2 y R3 c/u). *Cada muestra evaluada se encuentra por duplicado. 31
Ahora bien, con respecto a los valores de Cq expuestos en la Tabla 10 correspondientes al Lote I, es posible inferir de forma cualitativa que se mantienen relativamente semejantes en el rango entre 11 a 13 ciclos desde la semana 1 hasta la semana 8 de evaluación; a excepción de la réplica 1 almacenada a -20°C en la semana 4; en contraste con el resto de réplicas de enzimas recombinantes y la comercial (representada de color verde) exponiendo una amplificación más tardía. (Véase Anexo 1b-Figura 10). 32
Figura 11. Ensayo de actividad biológica mediante RT-qPCR del **Lote II a t_0, t_1, t_2**. La Línea verde representa la M MLV-RT comercial New England BioLabs® vs la M MLV-RT recombinante almacenada a 4°C y -20°C (R1, R2 y R3 c/u). *Cada muestra evaluada se encuentra por duplicado. 33
Figura 12. Ensayo de actividad biológica mediante RT-qPCR del **Lote III a t_0, t_1, t_2**. La Línea verde representa la M MLV-RT comercial New England BioLabs® vs la M MLV-RT recombinante almacenada a 4°C y -20°C (R1, R2 y R3 c/u). *Cada muestra evaluada se encuentra por duplicado. 35
Anexo 1a-Figura 13. Ensayo de actividad biológica mediante RT-qPCR del **Lote I t_0= 1 semana**. La Línea verde representa la M MLV-RT comercial New England BioLabs® vs la M MLV-RT recombinante almacenada a 4°C y -20°C (R1, R2 y R3 c/u) 39

Anexo 1b-Figura 14. Ensayo de actividad biológica mediante RT-qPCR del **Lote I t_1= 4 semanas**. La Línea verde representa la M MLV-RT comercial New England BioLabs® vs la M MLV-RT recombinante almacenada a 4°C y -20°C (R1, R2 y R3 c/u) 40
Anexo 1c-Figura 15. . Ensayo de actividad biológica mediante RT-qPCR del **Lote I t_1= 8 semanas**. La Línea verde representa la M MLV-RT comercial New England BioLabs® vs la M MLV-RT recombinante almacenada a 4°C y -20°C (R1, R2 y R3 c/u) 41
Anexo 2a-Figura 16. Ensayo de actividad biológica mediante RT-qPCR del **Lote II t_0= 1 semana**. La Línea verde representa la M MLV-RT comercial New England BioLabs® vs la M MLV-RT recombinante almacenada a 4°C y -20°C (R1, R2 y R3 c/u) 42
Anexo 2b-Figura 17. Ensayo de actividad biológica mediante RT-qPCR del **Lote II t_1= 4 semanas**. La Línea verde representa la M MLV-RT comercial New England BioLabs® vs la M MLV-RT recombinante almacenada a 4°C y -20°C (R1, R2 y R3 c/u) 43
Anexo 2c-Figura 18. Ensayo de actividad biológica mediante RT-qPCR del **Lote II t_2= 8 semanas**. La Línea verde representa la M MLV-RT comercial New England BioLabs® vs la M MLV-RT recombinante almacenada a 4°C y -20°C (R1, R2 y R3 c/u) 44
Anexo 3a-Figura 19. Ensayo de actividad biológica mediante RT-qPCR del **Lote III t_0= 1 semana**. La Línea verde representa la M MLV-RT comercial New England BioLabs® vs la M MLV-RT recombinante almacenada a 4°C y -20°C (R1, R2 y R3 c/u) 45
Anexo 3b-Figura 20.Ensayo de actividad biológica mediante RT-qPCR del **Lote III t_1= 4 semanas**. La Línea verde representa la M MLV-RT comercial New England BioLabs® vs la M MLV-RT recombinante almacenada a 4°C y -20°C (R1, R2 y R3 c/u) 46
Anexo 3c-Figura 21. Ensayo de actividad biológica mediante RT-qPCR del **Lote III t_1= 8 semanas**. La Línea verde representa la M MLV-RT comercial New England BioLabs® vs la M MLV-RT recombinante almacenada a 4°C y -20°C (R1, R2 y R3 c/u) 47

1. RESUMEN DEL PROYECTO:

La técnica PCR ha revolucionado la investigación molecular, facilitando diagnósticos precisos y fiables de enfermedades que resultan en un problema en salud pública. Su variante, RT-PCR, permite amplificar millones de copias partiendo de ARN para su conversión en ADN, siendo crucial en enfermedades como COVID-19, VIH, dengue y Zika. Sin embargo, la dependencia de reactivos importados, especialmente uno de los componentes más críticos, la enzima M-MLV RT; encarece su implementación sobretodo en escenarios de urgencia clínica, como la reciente pandemia. Esta enzima, clave para la transcripción inversa, se obtiene mayormente de fuentes virales, con altos costos y tiempos de importación prolongados, limitando su disponibilidad clínica en Colombia.

Teniendo en cuenta lo anterior, este proyecto aborda la producción local de la enzima retrotranscriptasa M-MLV RT (por sus siglas en inglés: Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) mediante tecnología ADN recombinante en un modelo bacteriano de *E. coli* BL21 (DE3) con el fin de de proponer una alternativa nacional que resulte sostenible y eficiente para la obtención de la enzima activa y funcional. El objetivo general de este proyecto recae en la evaluación de la actividad biológica, pureza y estabilidad de tres lotes de 2 Litros c/u, almacenados a dos diferentes temperaturas por un periodo total de 8 semanas. Para ello, se planteó un esquema metodológico que abarca la expresión bacteriana, purificación por cromatografía de afinidad y análisis de los atributos de calidad: Pureza, concentración y actividad biológica mediante SDS-PAGE, Bradford y RT-qPCR, respectivamente. En este orden de ideas, los resultados obtenidos indican niveles comparables de actividad enzimática frente a productos comerciales en el periodo evaluado, destacando su viabilidad técnica y la capacidad para cumplir con los estándares requeridos de fiabilidad y funcionalidad en estudios moleculares avanzados y pruebas diagnósticas.

Palabras clave: M-MLV RT, recombinante, PCR, actividad biológica, pureza, concentración.

2. INTRODUCCIÓN

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) ha emergido como una de las herramientas más poderosas y versátiles en la investigación de la biología molecular y médica, en virtud del estudio del material genético como diana principal. Actualmente, esta técnica se implementa en una amplia gama de aplicaciones, desde el diagnóstico molecular y la detección de patógenos, hasta diversas investigaciones de expresión génica y mutaciones. En efecto, en muchos laboratorios y hospitales se ha convertido en el método estándar para una detección temprana y con mayor seguridad de patógenos, con la ventaja de que se requiere una cantidad mínima de muestra biológica para obtener de igual forma resultados que sean confiables y precisos[1].

Ejemplos recientes como la emergencia sanitaria a nivel mundial a causa de la COVID-19, ha puesto en manifiesto su relevancia para el diagnóstico de los pacientes patógenos para el coronavirus de forma rápida y precisa. Puntualmente en este caso, se implementó la RT-PCR (Reverse Transcription PCR), un tipo de reacción enzimática que permite la amplificación exponencial de secuencias específicas a partir de la conversión de ARN en ADN, en la cual es requerida la acción conjunta de varios componentes. Asimismo, existen un gran espectro de enfermedades que pueden ser diagnosticadas por esta técnica, entre las cuales destacan: Citomegalovirus (CMV), Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), Hepatitis C (HCV), Virus de Papiloma Humano (HPV), *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Helicobacter pylori*, Dengue (DENV), Zika*;* siendo estas dos últimas un problema de salud pública en países con climas tropicales y subtropicales favorables para la transmisión de estas enfermedades, con más de 131.000 casos confirmados en Colombia para el año 2023[2,3].

Tras este escenario, se ha evidenciado en los últimos años un incremento significativo en la implementación de pruebas diagnósticas mediante RT-PCR, resultando en una alternativa que presenta mayor sensibilidad y especificidad con tiempos menores de detección; criterios de suma importancia y utilidad especialmente en es escenarios de urgencia clínica[3]. No obstante, una de las principales limitaciones de esta técnica recae en la accesibilidad de los reactivos, siendo uno de los más relevantes la enzima Retro Transcriptasa (RT), requerida para la síntesis del ADNc. Es así como, las fuentes virales de esta enzima provienen del Virus de la mieoblastosis aviar y del Virus de leucemia Murina Moloney (M-MLV, por sus siglas en inglés); esta

última es la forma mayormente empleada debido a que ha demostrado presentar alta actividad catalítica y fidelidad enzimática[4].

El auge da tecnología de ADN recombinante en las últimas décadas ha permitido optimizar estas características en un proceso que a su vez resulta escalable y eficiente; sin los riesgos que trae consigo la manipulación del virus. Grosso modo, esta metodología se basa en la inserción del gen que codifica la enzima en un vector de expresión; en este caso el plásmido pET 19b M-MLV RT ilustrado en la **Figura 1**. En el supuesto exitoso, la transformación en el hospedador (bacterias *E. coli BL21 DE3*) permite la expresión del gen para la obtención de la proteína en un medio de cultivo. Cabe destacar, que la elección de esta cepa modificada como plataforma biológica recae en su capacidad de expresar genes de proteínas heterólogas no toxicas de forma rápida, con atas densidades celulares en un proceso que resulta económico en términos generales. En efecto, el pronombre DE3 alude al profago lambda (λ) que porta el gen RNA polimerasa T7 inducible a expresión por IPTG; asimismo, la falta de proteasas resulta una característica clave que permite reducir la degradación de las proteínas expresadas en el sistema celular[5].

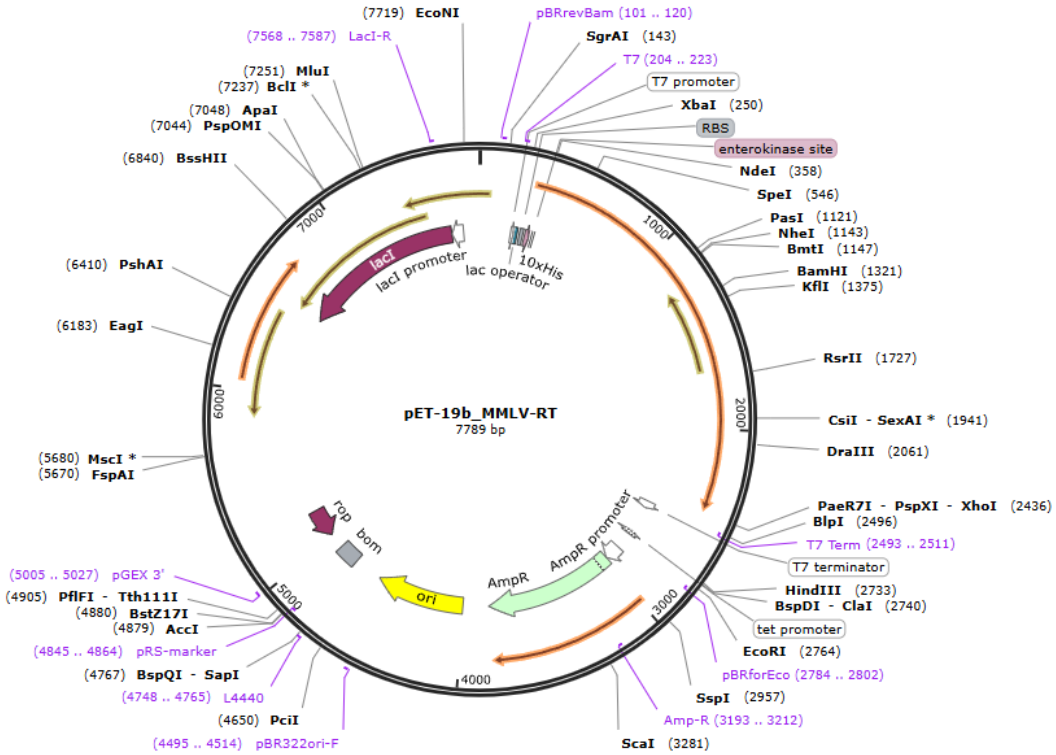


Figura 1. Mapa del plásmido pET – 19b MMLV RT empleado para la expresión del gen M-MLV RT; en este se puede detallar el promotor T7, el operador *lac*, la secuencia 10xHis-Tag, el gen de resistencia a Ampicilina. *Imagen tomada de: https://www.addgene.org/browse/sequence/298742/.*

No obstante, pese a los avances en biotecnología y la consolidación de sistemas eficientes como el descrito previamente, a nivel nacional no se cuenta con una alternativa local para la producción, obtención y posterior abastecimiento que ayude a mitigar la demanda que subyace de la necesidad de la M-MLV RT. En efecto, la accesibilidad de esta enzima representa un desafío con respecto a la dependencia de proveedores externos para su adquisición, que implica altos costes asociados a la importación, junto con tiempos prolongados de entrega para la utilización del producto; lo cual dificulta su disponibilidad de forma oportuna especialmente en circunstancias de criticidad clínica, como lo fue la reciente pandemia[2].

Esta problemática resalta la necesidad de desarrollar metodologías para la producción nacional de M-MLV RT, y de esta forma suministrar de manera pertinente este componente clave en los estudios y pruebas diagnósticas por RT-PCR. Para enfrentar este desafío, investigaciones previas realizadas por el semillero de biotecnología de la Universidad Icesi, han logrado estandarizar el sistema de obtención recombinante de la M-MLV RT a partir del plásmido pET 19b M-MLV RT en una cepa de *E.coli* BL21(DE3), así como la purificación parcial de la misma. Esto, en pro de la realización de un estudio de estabilidad para determinar la funcionalidad enzimática en función del tiempo transcurrido y diferentes condiciones de almacenamiento. Por tal motivo, el presente estudio se llevó a cabo bajo el interés de evaluar el comportamiento en la actividad biológica, pureza y concentración de la M-MLV RT producida bajo un modelo recombinante a tres lotes sujetos a dos condiciones de temperatura, bajo un periodo final de ocho (8) semanas; con el fin determinar su funcionalidad y viabilidad como alternativa local frente a productos importados.

3. METODOLOGÍA

Con la finalidad de poder evaluar los atributos de calidad a tres lotes producidos de M-MLV RT de 2 L c/u, fue necesario el desarrollo de ciertas actividades reunidas en tres procedimientos principales que siguen una secuencia lógica, con el fin de dar cumplimiento a cada objetivo planteado. De modo que, en primera instancia se requirió llevar a cabo la producción del enzima seguido del proceso de purificación y concentración enzimática, y finalmente la ejecución del estudio de estabilidad, descritos detalladamente a continuación:

3.1. Producción de la enzima M-MLV RT recombinante

La obtención de tres lotes de la enzima M-MLV RT en un volumen final de medio de cultivo de 2 Litros se llevó a cabo bajo las condiciones estandarizadas de expresión descritas en un proyecto previo de la misma línea de investigación titulado "Producción y purificación de la enzima recombinante MMLV-RT a partir del plásmido pET 19b MMLV-RT en bacterias *E.coli* BL21(DE3)", y desarrollado por el investigador Rueda, J.C.

3.1.1. Montaje del pre-inóculo

Para la obtención del cultivo fue necesario partir del montaje del pre-inoculo como primera medida. Para esto, se adicionaron 10 µL de stock de bacterias transformadas (M-MLV RT *E. coli* BL21(DE3)) el cual se encontraba almacenado a -80°C, junto con 10 mL de caldo LB (Lennox)-25g/L suplementado con 10 µL de antibiótico Ampicilina-100 mg/mL. En este caso, se requirió disponer de cuatro tubos de ensayos previamente rotulados: tres correspondientes al pre-inóculo y el restante respectivo al control negativo. Finalmente, todos se llevaron a incubación a 37°C con 225 rpm de agitación en un intervalo de 12 a 16 horas.

3.1.2. Inducción

Transcurrido este tiempo, se procedió a llevar a cabo el inoculo para la expresión del gen M-MLV-RT: En 8 Erlenmeyers de 1 L se adicionaron 250 mL de caldo LB junto con 250 µL de ampicilina 100 mg/mL y 2.5 mL de pre-inóculo a cada uno de los Erlenmeyers, para así obtener un volumen total de 2 L divididos en ocho partes. A continuación, los cultivos se incubaron en el shaker Innova® 44/44R a 37°C y 8165 rpm hasta obtener un $OD_{600\ nm}$ de 0.8, alrededor de 3 horas. Una vez, alcanzada la Densidad óptica especificada, se procedió a inducir adicionando 25 µL de IPTG 1000mM a cada Erlenemeyer (correspondiente a una concentración de 0.1 mM de inductor), para finalmente proseguir con la incubación de los cultivos a 18°C y 165 rpm durante un total de 4 horas en el shaker Innova. De este modo, dicho procedimiento se llevó a cabo un total de cuatro reproducciones, con tres replicas para la obtención total de tres lotes de 2 Litros; y adicionalmente, un lote de 1 L como punto de referencia para comparar la producción enzimática.

3.1.3. Tratamiento de las muestras

Tras finalizar el proceso de expresión, se procedió a evaluar y verificar la producción de dos fracciones (Proteína Total y Proteína soluble) para cada uno de los lotes. En efecto, se recolectó el volumen total de cultivo (2L) el cual fue centrifugado durante 30 minutos a 8000 rpm y 4 °C en la Ultracentrifuga refrigerada. Posteriormente, se recolectó el pellet obtenido en un tubo previamente pesado, el cual fue resuspendido en buffer Tris (HCl 25 mM, pH 8.0) en una proporción 6:1 (6 mL de buffer por cada gramo de pellet). Paso seguido, la muestra fue sometida a un proceso de lisis mediante la sonicación por sonda a una amplitud del 50%, pulso 4 minutos con 1 minuto ON y 1 minuto OFF, en un baño de hielo. Dicha fracción corresponde a la proteína total (PT), por lo cual fue necesario recolectar tres réplicas de 500 µL cada una, para su posterior evaluación. Después de la lisis celular, la fracción obtenida fue centrifugada durante 20 minutos a 11000 rpm en refrigeración (4°C), de la cual se obtiene un nuevo sobrenadante, correspondiente a la fracción de Fase soluble (FS).

3.1.4. Identificación y cuantificación de la enzima

La cuantificación de cada muestra se llevó a cabo bajo la metodología Bradford donde se requirió disponer 5 µL de muestra en 250 µL de reactivo Bradford en una placa, para posteriormente ser analizada mediante el lector de microplaca Synergy™ H1 BioTek a una longitud de onda de 595 nm. Cabe destacar, que fue necesaria la construcción de una curva de calibración de concentraciones específicas de BSA (Suero de Albumina) que permitiera determinar la concentración a partir de un ajuste lineal de la recta. De modo que, tras la absorbancia obtenida como respuesta del equipo es posible determinar la concentración de proteína total (PT) de cada muestra en función de la ecuación de la recta definida por medio de la curva de calibración.

En cuanto a la preparación del gel, se empleó el sistema Mini-PROTEAN® Tetra Cell de BIO-RAD con un gel de poliacrilamida (40% acrilamida/bis-acrilamida, 37,5:1) en un sistema al 12% para el “resolving gel” y del 5% para el “stacking gel". A su vez, las muestras fueron previamente tratadas, por lo que se mezclaron en una proporción 1:1 con buffer de carga 2X (Laemmli BIO-RAD); y posteriormente expuestas a un baño seco de temperatura de 95 °C durante 5 minutos. Posteriormente, se sembraron 6 uL de cada muestra en el gel junto con el marcador de peso molecular, en donde se adicionó buffer de glicina 1X (Tris

HCl, Glicina, SDS, pH 8.3) a la cámara de electroforesis; para finalmente llevar a cabo la corrida a 100 V durante 2,30 h. Una vez transcurrida la corrida, el gel fue teñido empleando azul de Coomassie Brilliant Blue para la visualización proteica. Finalmente, cada gel fue analizado mediante densitometría por medio del equipo Amersham Imager 600, para contrastar con la cuantificación de proteína total por método Bradford; y así ajustar la cantidad de M-MLV RT (µg/mL) producida considerando el factor densitométrico.

3.2. Proceso de purificación por un sistema manual de la enzima M-MLV RT recombinante

3.2.1. Purificación y concentración

El proceso de purificación de la enzima recombinante se llevó a cabo bajo el mecanismo de cromatografía por afinidad implementando una columna de vidrio por flujo a gravedad. No obstante, se emplea un sistema de succión mediante el uso de una jeringa con el fin de acelerar el proceso en términos generales. En efecto, se ejecutaron tres pasos importantes que consisten en la regeneración, equilibrio de la resina, y la etapa de la elución. Inicialmente, previo al proceso de purificación se llevó a cabo la regeneración de la resina empaquetada en donde se realizaron una serie de lavados en el siguiente orden:

1. Agua tipo II
2. Solución de urea 8M y ácido acético 2M,
3. Agua tipo II,
4. Solución de EDTA 100 mM pH 8.0,
5. Agua Tipo II,
6. Etanol al 96%,
7. Agua Tipo II
8. $NiSO_4$ 100 Mm,
9. Agua Tipo II.

Como segunda medida fue necesario equilibrar la resina llevando a cabo dos lavados con Buffer A detallado en la **Tabla 1**. Una vez la resina estuvo previamente equilibrada se mezcló junto con el 50% del volumen de la fase soluble (sobrenadante) en un beaker, sometido a agitación y a una temperatura de 2-4 °C por un

total de 60 minutos. Paso seguido, esta mezcla se transfirió a un tubo de 50mL para ser centrifugada a 1900 rpm por 3 minutos, de donde se obtuvo un sobrenadante correspondiente a restos de proteínas que no son de interés (del cual se recolectaron 500 uL para ser evaluados en SDS-PAGE), y un sedimento que corresponde a la mezcla de resina. A continuación, la resina fue resuspendida en Buffer B 45 mM y transferida a la columna para su posterior empaquetamiento por el mecanismo de succión por jeringa hasta la formación de un lecho uniforme. Posteriormente, se realizaron lavados a la columna con Buffer B 45 mM para terminar de retirar impurezas que pueden interactuar con la resina. Finalmente, se procedió con la elución con Buffer B 500 mM con un volumen aproximado de 20 mL de la cual se recolectó toda la fracción succionada que eluye a través de la resina (Fracción que contiene la proteína de interés). Cabe destacar entonces, que todo este proceso fue posteriormente realizado dos veces seguidas para la purificación del volumen total de sobrenadante obtenido en cada Lote (~45-50 mL).

Tabla 1. Buffers necesarios para la purificación de la enzima por cromatografía por afinidad.

	Buffer A	**Buffer B-500mM**	**Buffer B-45 mM**
Componentes	• PBS* 50 mM • NaCl 300 mM	• PBS 50 mM • NaCl 300 mM • Imidazol 500 mM	• PBS 50 mM • NaCl 300 mM • Imidazol 45 mM
	pH 8.0		
	Agua Tipo II (c.s.p)		

*PBS: Phosphate-buffered saline (Tampón salino fosfato)

Una vez purificada la enzima presente en toda la fase soluble fue pertinente concentrarla empleando una unidad de ultrafiltración VivaSpin® 2, en función de una fuerza centrífuga a 6000 rpm por 50 minutos a 10°C; repetido en varios ciclos; hasta la obtención de un volumen aproximado de 5-7 mL. Finalmente, las muestras fueron evaluadas mediante un gel de electroforesis tal como se describe en la sección anterior (***3.1.4***)

3.2.2. Almacenamiento de la enzima M-MLV RT recombinante

Posteriormente, la enzima fue almacenada en el buffer de almacenamiento establecido (Véase **Tabla 2**); conservando a 4°C y a -20°C al menos tres alícuotas de 600 µL por cada lote.

Tabla 2. Componentes de buffer de almacenamiento.

	Buffer de almacenamiento	**Volumen para 600 µL**
Componentes	• Tris-HCl 50 mM • NaCl 150 mM • DTT 1.0 mM • EDTA 0.1mM • Glicerol 50% (v/v) • NaOH c.s.p (pH 7.6 a 25°C)	300 µL
	Glicerol 100%	c.s.p. C_f entre 35-45% (~70 -100 µl)
	M-MLV RT (mg/mL)	c.s.p. C_f ~0,400 mg/mL (200 -230 µl)

3.3. Estudio de estabilidad de la enzima M-MLV RT

Cómo última instancia, se planteó un estudio de estabilidad a los tres lotes producidos y sometidos posteriormente a diferentes condiciones de almacenamiento expuestos en la **Tabla 3** y la **Tabla 4**, donde fueron evaluados los atributos de calidad que conciernen en: i) Pureza, ii) concentración y iii) Actividad biológica; con tres muestras representativas para cada uno de los lotes, en los momentos de tiempo: 1, 4 y 8 semanas post producción-purificación y almacenamiento; y bajo las condiciones de temperatura según un producto que requiere refrigeración.

Tabla 3. Estudio de estabilidad: Condiciones de almacenamiento a evaluar.

Estudio	**Condición de almacenamiento**	**Periodo de tiempo**	**Muestras**
Natural	-20 ± 2ºC / 75% ± 5% HR	Semana 1, 4 y 8	Tres replicas/Lote
Acelerado	4 °C ± 2ºC / 75% ± 5% HR	Semana 1, 4 y 8	Tres replicas/Lote

Tabla 4. Matriz de estudio de estabilidad para la enzima recombinante M-MLV RT.

Momentos de medición (semana)				1 (t_0)			4 (t_1)			8 (t_2)		
				Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Condiciones de almacenamiento	4 ± 2ºC / 75% ± 5% HR	**Atributos de calidad**	Concentración	R1	R1	R1	R1	R1	R1	R1	R1	R1
				R2	R2	R2	R2	R2	R2	R2	R2	R2
				R3	R3	R3	R3	R3	R3	R3	R3	R3
			Pureza	R1	R1	R1	R1	R1	R1	R1	R1	R1
				R2	R2	R2	R2	R2	R2	R2	R2	R2
				R3	R3	R3	R3	R3	R3	R3	R3	R3
			Actividad biológica	R1	R1	R1	R1	R1	R1	R1	R1	R1
				R2	R2	R2	R2	R2	R2	R2	R2	R2
				R3	R3	R3	R3	R3	R3	R3	R3	R3
	-20 °C ± 2ºC / 75% ± 5% HR		Concentración	R1	R1	R1	R1	R1	R1	R1	R1	R1
				R2	R2	R2	R2	R2	R2	R2	R2	R2
				R3	R3	R3	R3	R3	R3	R3	R3	R3
			Pureza	R1	R1	R1	R1	R1	R1	R1	R1	R1
				R2	R2	R2	R2	R2	R2	R2	R2	R2
				R3	R3	R3	R3	R3	R3	R3	R3	R3
			Actividad biológica	R1	R1	R1	R1	R1	R1	R1	R1	R1
				R2	R2	R2	R2	R2	R2	R2	R2	R2
				R3	R3	R3	R3	R3	R3	R3	R3	R3

i) Evaluación de la pureza

Tras el proceso de separación y purificación de la fracción soluble, el grado de pureza se pudo evidenciar de forma cualitativa a partir del registro fotográfico de los geles SDS-PAGE obtenidos, con base a la visualización de bandas adicionales correspondientes a impurezas diferentes a la banda de interés, en este caso la banda proteica correspondiente a la M-MLV RT recombinante.

ii) Determinación de la concentración

Con este ensayo se buscó confirmar la identidad de la enzima; así como determinar la concentración (µg/mL) de la misma mediante el método Bradford en conjunto con la técnica SDS-PAGE, tal como se describe en el apartado **3.1.4** con la excepción de que la cantidad sembrada de muestra fueron 13 µL**.** Lo anterior, considerando la matriz expuesta en la **Tabla 4**, donde se evaluaron las tres replicas por cada lote a la semana 1, 4 y 8 almacenadas a 4°C y -20°C.

iii) Actividad biológica

La actividad biológica de la enzima M-MLV RT es evidenciada mediante un ensayo de RT-qPCR two steps (Reverse Transcription PCR and quantitative PCR, por su acrónimo en inglés) en los cuales permiten evaluar la funcionalidad enzimática retrotranscriptasa en el ARN viral. Para ello, como primera medida fue necesaria la extracción con TRIzol™ del material genético a partir de una muestra procedente del virus de *Zika* de un paciente positivo, mediante el protocolo "Extracción de ARN viral" estandarizado por un grupo de investigación de la línea de biotecnología. Esta técnica permitió la separación del ARN partiendo de la desnaturalización de proteínas, lípidos y otros componentes tras la homogenización mecánica del sobrenadante del virus con el reactivo TRIzol. Posteriormente, se adicionó cloroformo, que permitió la separación de la fase acuosa (ARN viral) de la fase orgánica, tras someter la muestra a centrifugación. Una vez recuperada la fase acuosa se indujo la precipitación del ARN con la adición de isopropanol y posterior centrifugación. Finalmente, se realizaron una serie de lavados con etanol al 75% al pellet obtenido previamente, para proceder a secarlo a temperatura ambiente y resuspenderlo en agua libre de nucleasas (Agua DEPC). Tras la obtención del ARN aislado, fue necesaria su cuantificación para proceder con la técnica RT-qPCR.

En el primer paso de la PCR se requirió llevar a cabo la síntesis del ANDc mediante el equipo termociclador BioRad bajo el protocolo según condiciones expuestas en la **Tabla 5**. Para ello, fue necesaria la preparación del coctel de amplificación detallado en la **Tabla 6** para un volumen total de 20 uL por mix. En este sentido, se preparó un mix por cada réplica del lote en cuestión (Véase **Tabla 4**), junto con el control negativo (NTC, Not Templete Control, por sus siglas en inglés); asimismo, se llevó a cabo la preparación del mix de la enzima comercial M MLVR-RT New England BioLabs® como control positivo y punto de referencia; para un total de 14 muestras.

Tabla 5. Termoperfil requerido para la RT-PCR de M-MLV RT.

Termoperfil	
Temperatura	**Tiempo**
25°C	5 minutos
42°C	60 minutos

65°C	20 minutos
4°C	INFINITO

Tabla 6. Reactivos necesarios para el mix de PCR.

Reactivo	Concentración final	Volumen 1 mix (µL)
Primer Reverse (50 uM)	5 µM	2
dNTPs (10 mM)	0,5 mM	1
Buffer 10X MMLV	1X	2
Enzima M MLVR-RT recombinante	10 U/µL	1
Agua DEPC	-	4
ARN ZIKA	0.5 µg	10
Volumen final		20
Número de muestras		14

El segundo paso consistió en el planteamiento de la técnica qPCR en la cual se requirió el ADNc sintetizado previamente en combinación con los reactivos enlistados en la **Tabla 8,** donde fueron evaluadas las réplicas de cada lote un total de dos veces; junto con la muestra de enzima comercial con su respectivo NTC; NTC correspondiente a una de las réplicas amplificadas en la RT-PCR; y el NTR (Control negativo de la qPCR) para un total de 17 muestras por lote. Cada mix se dispuso finalmente en termociclador CFX96 BioRad bajo las condiciones presentadas en la **Tabla 7**. Finalmente, la qPCR permitió la obtención de una curva de amplificación de cada muestra en comparación con la enzima comercial; así como el valor Cq (Ciclo umbral) para cada replica evaluada.

Tabla 7. Termoperfil requerido para la qPCR de M-MLV RT.

Termoperfil		
Temperatura	**Tiempo**	**Ciclos**
95°C	1 min	
95°C	15 seg	40 ciclos
60°C	30 seg	

Tabla 8. Reactivos necesarios para el mix de qPCR.

Reactivo	Concentración final	Volumen 1 mix (µL)
Luna universal qPCR master mix	1X	2

Primer foward (10uM)	0,25 µM	1
Primer reverse (10uM)	0,25 µM	2
Agua DEPC	-	4
Muestra ADNc	<100 ng	1
Volumen final		10
Número de muestras		17

Como última medida, tras la realización de cada experimento, se llevó a cabo una recopilación de los datos más pertinentes para su posterior análisis, acerca de la variación presentada en cada atributo evaluado en función del tiempo transcurrido por el periodo definido de 8 semanas y considerando a su vez las diferencias en el almacenamiento a 4°C y a -20°C para tres replicas por cada lote.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Producción de la enzima M-MLV RT

La enzima RT obtenida a partir del M-MLV es la forma más frecuentemente producida a nivel industrial, procurando que presente una alta actividad catalítica polimerasa, baja actividad RNasa H (enzima encargada de hidrolizar los enlaces fosfodiéster entre el ADNc y el ARN) y un grado considerable de termoestabilidad[6]. En este caso, se evaluó el escalonamiento de tres lotes de 2 Litros cada uno, en comparación con el sistema de 1 L evaluado en investigaciones previas; con el fin de estimar la consistencia y reproducibilidad del proceso de obtención mediante un sistema biológico a un volumen mayor.

Dentro del contexto de sistemas recombinantes las proteínas obtenidas pueden ser secretadas en el medio de producción o reunirse de forma intracelular (Proteína total); presentándose principalmente de tres formas según su localización: soluble en el citoplasma (Fracción soluble), agregada en cuerpos de inclusión (Fracción insoluble) o secretada en el periplasma[8]. Idealmente, se busca que la proteína se produzca como su producto soluble, puesto que corresponde a las conformaciones funcionales y biológicamente activas, relevantes para su aplicación. En efecto, el modelo bacteriano BL21 DE3 favorece la expresión de la enzima en su forma soluble bajo una expresión controlada por el operador *lac*, el cual responde a la presencia del inductor IPTG. De igual forma la reducción de la temperatura de incubación post-inducción a 18°C permite

minimizar la formación de agregados insolubles o malplegamientos que comprometen la actividad catalítica de la enzima[9].

Es así como es posible evidenciar cualitativamente en la **Figura 2A**, la expresión de esta enzima en la plataforma recombinante que procedió de forma apropiada tanto en la fracción de proteína total (PT) como en la fracción soluble que es la fase de mayor interés; conservando la identidad de la M-MLV RT en virtud de las bandas reflejadas con un peso de aproximadamente 71 kDa en cada uno de los carriles (resaltada en un recuadro azul), lo cual coincide con los pesos moleculares reportados en la literatura por diversos autores, en un rango entre 70-78 kDa (70.28 kDa[2], 71 kDa[10,11], 75 kDa[12], 78 kDa[13] específicamente).

De forma semejante, tras un análisis cuantitativo por medio del gel de electroforesis SDS, la concentración estimada de M-MLV RT en la fracción soluble ronda entre 0.200-0.330 mg/mL con respecto a la cantidad de proteína Total de la FS producida por todo el sistema de expresión (Véase **Tabla 9**). Esta diferencia es debida a que, al incrementar el volumen de producción es posible promover la expresión de otras impurezas proteicas en mayor cantidad, lo cual es posible detallar en el gel, donde se observan la presencia de bandas adicionales con respecto a la de interés. Ahora bien, es posible detallar cierta variación entre las réplicas de los lotes de 2L, lo cual se puede atribuir a que se trata de una plataforma biológica sujeta a alteraciones metabólicas celulares o factores técnicos con respecto a las condiciones de incubación, calidad de los reactivos, densidad celular del preinóculo o inóculo; entre otras inconsistencias que resultan en una diferencia entre la cantidad de enzima obtenida por cada lote, pese a la estandarización del proceso. Finalmente, en cuanto a la cuantificación proteica, pese a que los resultados no exponen un incremento en la concentración enzimática directamente proporcional a un mayor volumen de medio, es posible inferir que la producción alcanzada fue significativa con 0.284 mg/mL de MMLV RT en contraste con 0.237 mg/mL producto de 1 L de medio de cultivo, tal como se representa en la **Figura 2B**, conservando a su vez, la identidad de la enzima en su forma soluble.

Tabla 9. Determinación de la concentración de MMLV-RT.

Muestra	Abs Promedio	Proteína total (mg/mL)	Factor densitometría	M-MLV RT (mg/mL)
FS LOTE I- 2L	0,292	2,71	8,02%	0,217
FS LOTE II- 2L	0,339	3,14	9,79%	0,307

FS LOTE III- 2L	0,365	3,37	9,74%	0,329
FS LOTE 1L	0,249	2,32	10,22%	0,237

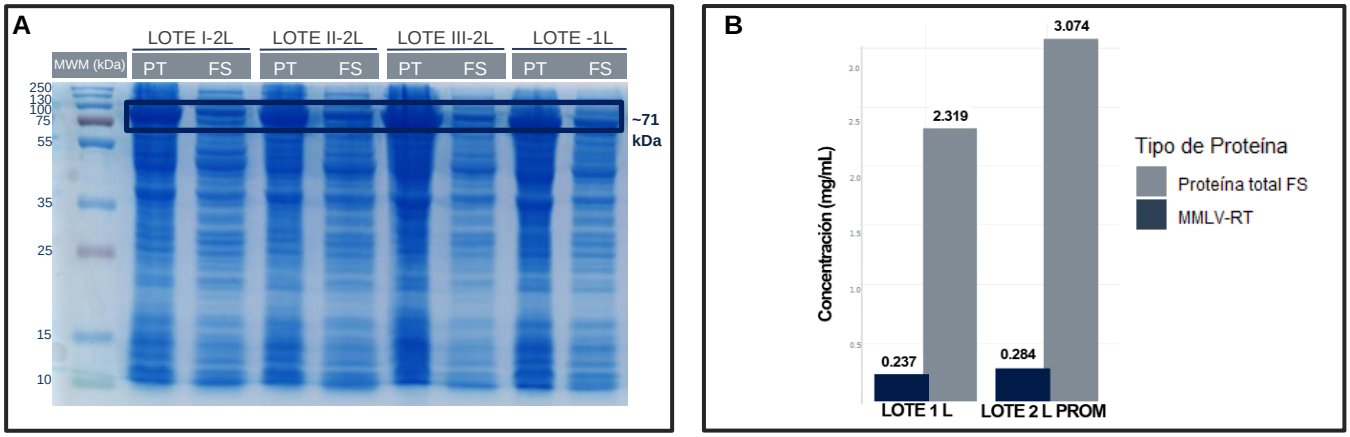


Figura 2. Evaluación de la producción M MLV-RT de tres (3) lotes a escala de 2 Litros y un (1) lote de 1 L. **A)** *Gel de electroforesis SDS-PAGE teñido con azul de comassie* (6 uL de muestra). **MWM PageRuler™:** Marcador de peso molecular, **PT:** Proteína Total, **FS:** Fracción Soluble. **B)** *Resultados de la Cuantificación de M MLV-RT de la Fracción soluble con respecto a la toda la proteína presente.* *El gráfico de barras expone el resultado en mg/mL del valor promedio de los tres lotes de 2L vs el lote de 1L.

4.2. Purificación y concentración de la enzima M-MLV RT

Una vez finaliza el sistema de expresión, la fracción soluble es aislada tras someterla a un proceso de lisado celular; posteriormente se lleva a cabo un proceso de purificación con el fin de eliminar la mayor cantidad de impurezas posibles que puedan afectar la actividad biológica de la enzima**.** Para ello, existen a disposición diversas técnicas y tratamientos, siendo la cromatografía una de las más empleadas. El método cromatográfico de elección depende de las propiedades moleculares de la proteína y la fase estacionaria a disposición. Específicamente para la M-MLV RT, el fundamento de purificación se basa en la formación de un complejo de coordinación entre los componentes de la fase estacionaria (resina de Niquel) y el grupo imidazol presente en una secuencia de histidinas de la enzima (etiquetas epitópicas 10XHis-tag, que se pueden detallar en el mapa del plásmido expuesto en la **Figura 1**); las cuales se unen de forma específica a los grupos quelantes de Ni^{2+}, tal como se ilustra en la **Figura 3**.

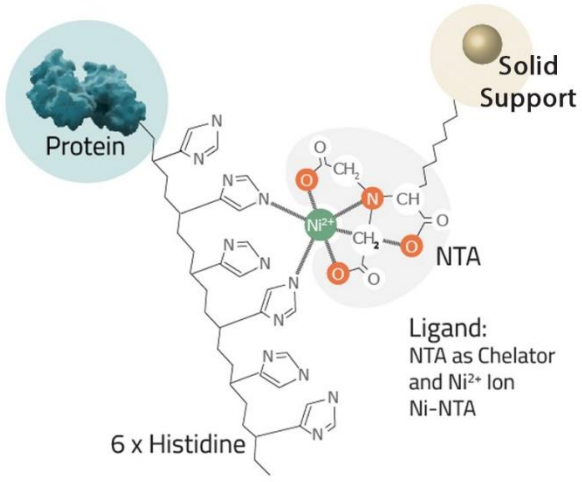


Figura 3. Esquema del complejo de formación entre la resina de Ni^{2+} y la cola de histidina. *Imagen tomada de: https://cube-biotech.com/our-science/protein-purification/his-tag/*.

En este caso, la elución de la fracción soluble de M-MLV R se llevó a cabo con el Buffer B, el cual contiene Imidazol 500 mM que compite con la etiqueta de histidinas presentes en la resina, desplazándola de esta y permitiendo recolectar la proteína de interés en cuestión. Siendo así, es posible evidenciar en el carril 2 expuesto en la **Figura 4A** la presencia de una banda con un alto grado de pureza con una reducción bastante significativa de las impurezas contaminantes las cuales se logran observar en el carril adyacente referente al sobrenadante que contienen las proteínas no específicas que no interactuaron con la resina de Niquel.En congruencia con esto, en la **Figura 4B** se observa la curva (remarcada con el recuadro azul) con un pico de densidad de ~0.560 correspondiente a la banda de M-MLV RT. Adicional a lo anterior, en contraste con el grado de impurezas observadas en la **Figura 2A** es posible concluir que el proceso de purificación bajo un sistema no automatizado resulta ser eficiente para la purificación de aproximadamente 30 mL de fracción soluble con una concentración de 0.132 mg/mL de M-MLV RT estimada tras la cuantificación por Bradford.

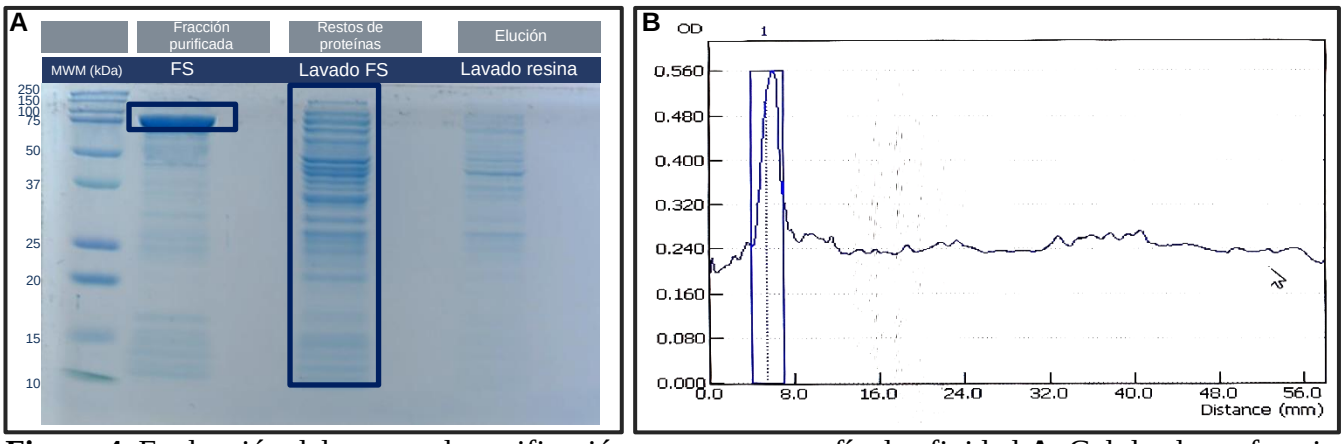


Figura 4. Evaluación del ensayo de purificación por cromatografía de afinidad **A.** Gel de electroforesis SDS-PAGE teñido con azul de comassie (13 uL de muestra). **MWM Kaleidoscope™:** Marcador de peso molecular. **FS**: Fracción soluble. **B.** Densitometría del gel en cuestión correspondiente a la densidad óptica de las bandas del carril 2 referente a la fracción purificada de FS.

4.1. Estudio de estabilidad de la enzima M-MLV RT

La evaluación de los atributos de calidad de es un proceso crucial para garantizar la estabilidad, viabilidad y efectividad de la enzima para su aplicación a nivel investigativo y sobre todo diagnóstico. En este orden de ideas, se hace pertinente evaluar las variaciones que se pueden presentar en la caracterización de la enzima cuando esta es expuesta a diferentes condiciones de almacenamiento como la refrigeración a -20°C como la temperatura estándar recomendada por casas comerciales generalmente y a 4°C como la temperatura representativa del almacenamiento a una estabilidad acelerada. A continuación, se exponen los resultados obtenidos para el presente estudio de estabilidad térmica con respecto al tiempo transcurrido para cada uno de los lotes evaluados, tal como se expone en la
Tabla 4.

i) Evaluación cualitativa del grado de pureza

Posterior a la producción de la M-MLV RT alrededor de 40 a 50 mL de fracción soluble de cada lote fueron purificadas por la metodología previamente descrita, donde se obtuvieron los geles correspondientes presentados en **Figura 5**, **Figura 6** y **Figura 7** para el Lote I, Lote II y Lote III, respectivamente. En estos, es posible evidenciar ciertas bandas proteicas diferentes a la banda de interés de la M-MVLR señalada en un recuadro azul; principalmente en el Lote III, lo cual puede aludir a que se basa en un sistema no automatizado sujeto a errores técnicos relacionados con las etapas del proceso de purificación manual *perse*,

en el cual es crucial la regeneración de la columna previo a llevar a cabo el lavado y elución para evitar la saturación de la resina por restos proteicos; o incluso la capacidad del buffer de almacenamiento para preservar la integridad de la enzima. Cabe destacar entonces, que puede ser indispensable la incorporación del componente NP-40 empleado en las soluciones de almacenamiento disponibles por los diferentes laboratorios que comercializan la M-MLV RT[10,13]. Esto debido a que dicho detergente de naturaleza no iónica favorece la solubilización de la enzima al tiempo que reduce el riesgo de agregación, y ayuda a preservar la conformación de la misma.

Ahora bien, en cuanto al sistema no automatizado, sí demostró ser eficiente para volúmenes menores (~20-30 mL), sin embargo, para un volumen mayor de fracción soluble (40-50 mL) se hace pertinente implementar ciertas medidas que permitan optimizar el proceso, tales como: El control preciso de la temperatura de incubación; la incorporación de resinas con mayor capacidad de unión, particularmente la resina en su presentación lista Ni-NTA que permita minimizar los pasos de regeneración; o la utilización de una sola unidad de Vivaspin para cada lote por purificar, para así evitar su reutilización y posterior sobrecarga en la membrana de filtración que puede resultar en la acumulación de impurezas restantes. Asimismo, se sugiere para futuras investigaciones evaluar un mecanismo de cromatografía por intercambio iónico posterior a la purificación por afinidad, que permita la separación de la enzima mediante un intercambio catiónico de carboximetil Sefarosa en función del efecto del pH sobre los grupos ionizables de los aminoácidos que componen la proteína; metodología que ha resultado eficiente para la obtención de únicamente una banda representando el máximo grado de pureza[11].

Pese a lo anterior, visualmente es posible detallar que en cada uno de los lotes se obtuvo una enzima con un grado menor de impurezas posterior a la purificación, si se contrasta con las impurezas evidenciadas en el clarificado obtenido tras la producción enzimática sin el proceso de purificación ejecutado (**Figura 2A).** Asimismo, no se observa una diferencia significativa entre las réplicas almacenadas a 4°C con respecto a la temperatura de -20°C, preservando este nivel de pureza en el transcurso del tiempo evaluado. Finalmente, cabe destacar que esta metodología a pesar de ser manual, en contraste con el equipo automatizado AKTA Pure accesible en la universidad Icesi (el cual permite purificar cantidad mucho menores de alrededor de 5 mL en virtud de la columna disponible) ; resultó ser una alternativa con mayor costo-efectividad, destacando la posibilidad de reducir los costos asociados a la utilización de equipos más robustos y con mayor tecnología, pero con resultados comparables.

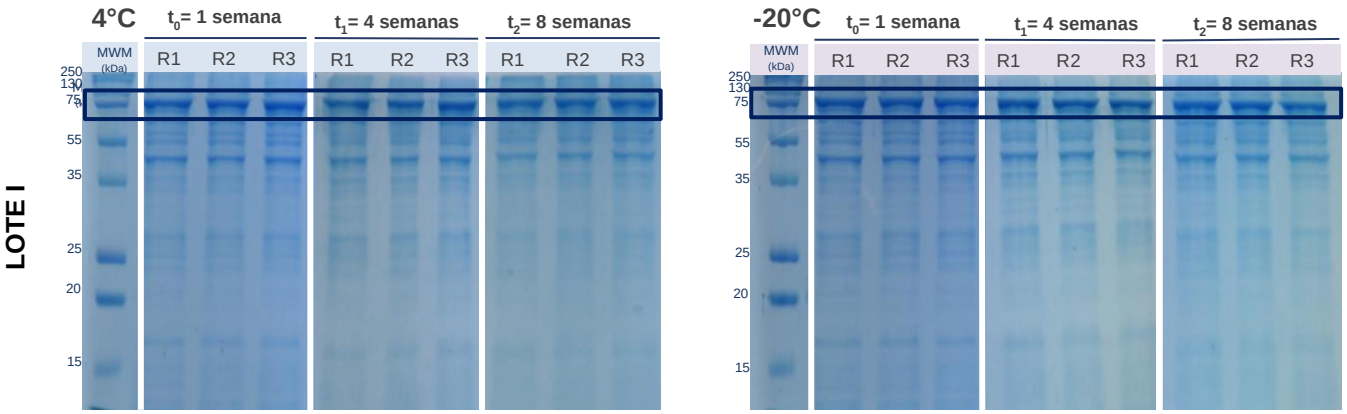


Figura 5. Estimación cualitativa mediante SDS-PAGE del grado de pureza a **t_0, t_1 y t_2** post-producción de la M MLV-RT **Lote I**. El gel del *lado izquierdo* corresponde a la evaluación de la enzima almacenada a **4°C**. En contraste, el gel del *lado derecho* corresponde a la evaluación de la enzima almacenada a **-20°C**. **MWM Kaleidoscope™:** Marcador de peso molecular, **R:** Replica.

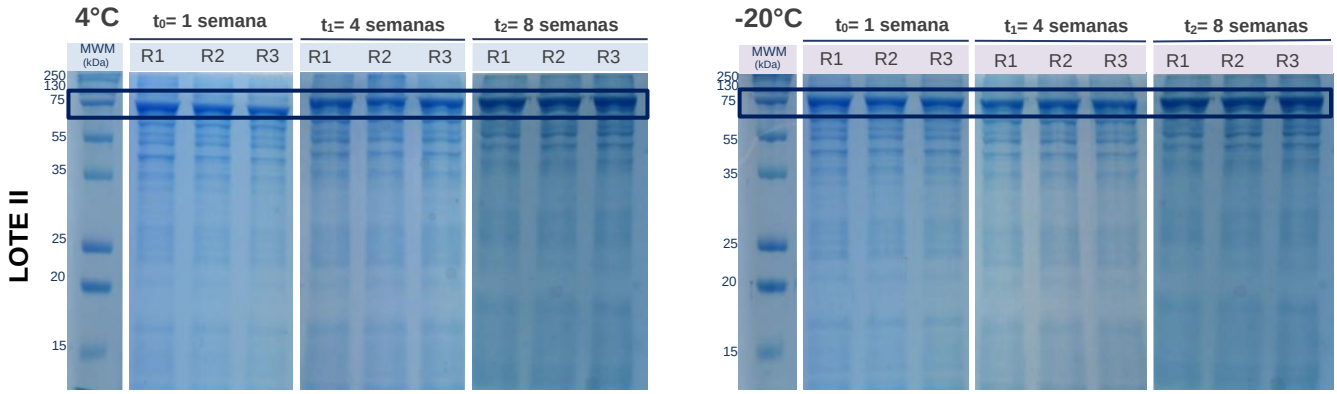


Figura 6. Estimación cualitativa mediante SDS-PAGE del grado de pureza a **t_0, t_1 y t_2** post-producción de la M MLV-RT **Lote II**. El gel del *lado izquierdo* corresponde a la evaluación de la enzima almacenada a **4°C**. En contraste, el gel del *lado derecho* corresponde a la evaluación de la enzima almacenada a **-20°C**. **MWM Kaleidoscope™:** Marcador de peso molecular, **R:** Replica.

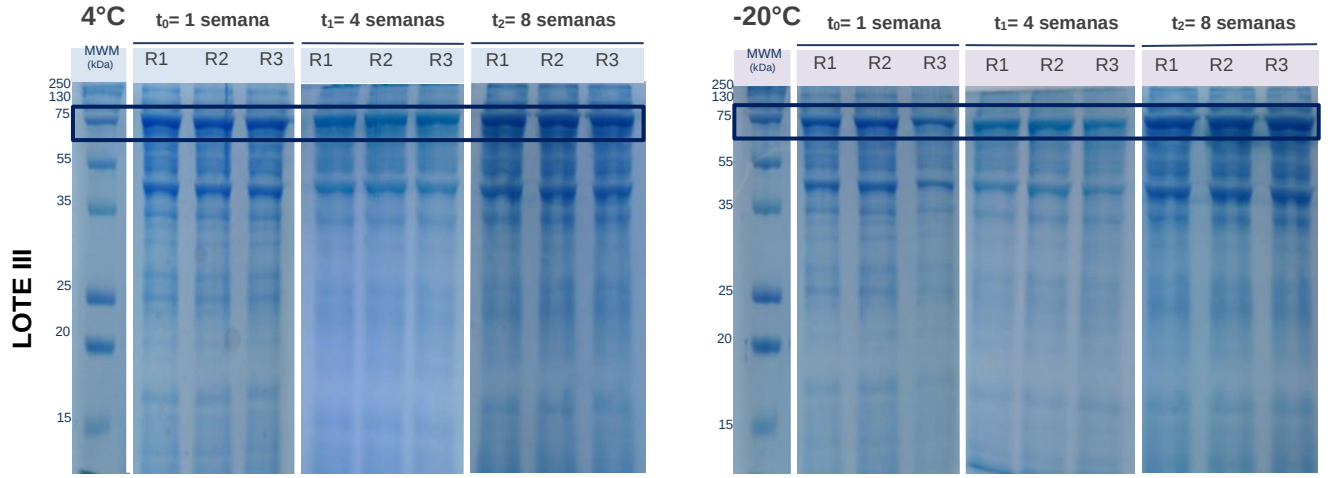


Figura 7. Estimación cualitativa mediante SDS-PAGE del grado de pureza a **t_0, t_1 y t_2** post-producción de la M MLV-RT **Lote III**. El gel del *lado izquierdo* corresponde a la evaluación de la enzima almacenada a **4°C**. En contraste, el gel del *lado derecho* corresponde a la evaluación de la enzima almacenada a **-20°C**. **MWM Kaleidoscope™:** Marcador de peso molecular, **R:** Replica.

ii) Determinación de la concentración

En este caso, la estimación de la concentración de M-MLV RT se llevó a cabo mediante el método Bradford basado en la interacción entre las proteínas y el colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 en su forma aniónica, por lo que la muestra se torna de color azul dada la estabilización del colorante; permitiendo de este modo la medición de la absorbancia a una longitud de onda de 595nm. De esta forma, la concentración proteica de las muestras se determina por medio de una comparación con la absorbancia obtenida de una curva estándar de BSA En efecto, una mayor cantidad de proteína presente en la muestra se refleja en una coloración más azulada y una respuesta de absorbancia mayor. Sin embargo, esta técnica colorimétrica no permite la cuantificación específica de la enzima M-MLV RT, por lo que es necesario realizar un "ajuste" de la concentración por medio de un analisis densitométrico de cada uno de los geles registrados previamente en la evaluación del grado de pureza.

Es así como, los resultados cuantitativos presentados en la **Tabla 10, Tabla 11** y **Tabla 12** correspondientes al Lote I, Lote II y Lote III, respectivamente; reflejan una variación en la concentración a medida que trascurre el tiempo, siendo más pronunciada en el lote I y III. Asimismo, se observa una diferencia en la concentración entre los lotes evaluados, tal como se ilustra en la **Figura 8**. Pese a ello, no es posible inferir una tendencia clara que defina el comportamiento de la cantidad de enzima presente en cada replica. Particularmente, con respecto al Lote II se puede observar una mayor estabilidad en conservación de la concentración, lo cual podría estar relacionado con el mayor grado de pureza evidenciado en este lote; esto sugiere una correlación entre la pureza y la concentración enzimática.

Cabe mencionar que la estimación de la concentración por Bradford si bien es una técnica ampliamente empleada por su simplicidad y rapidez, presenta limitaciones inherentes que pueden afectar la precisión de los resultados obtenidos. Una de las principales fuentes de error radica en las diferencias de pipeteo entre las réplicas por parte del operador, sumado a la sensibilidad en la detección de la densidad óptica de las bandas dispuestas en cada carril para la determinación indirecta de la cantidad de enzima. En este sentido, se sugiere evaluar la cuantificación en el equipo Nanodrop basado en la absorbancia a 280nm en el espectro UV-VIS, empleando el valor del coeficiente de extinción molar reportado para esta enzima de 79780 M^{-1} cm^{-1} sin la necesidad de requerir reactivos adicionales[11]. No obstante, pese a estas observaciones, cabe destacar que la concentración de M-MLVRT se mantiene estable entre el rango entre 0.100 a 0.170 mg/mL

en todos los casos evaluados, sin una diferencia notable entre las dos temperaturas evaluadas; lo cual alude al comportamiento favorable con respecto a la estabilidad de la enzima aunque se trate de un sistema que puede estar sujeto a variaciones por factores biológicos.

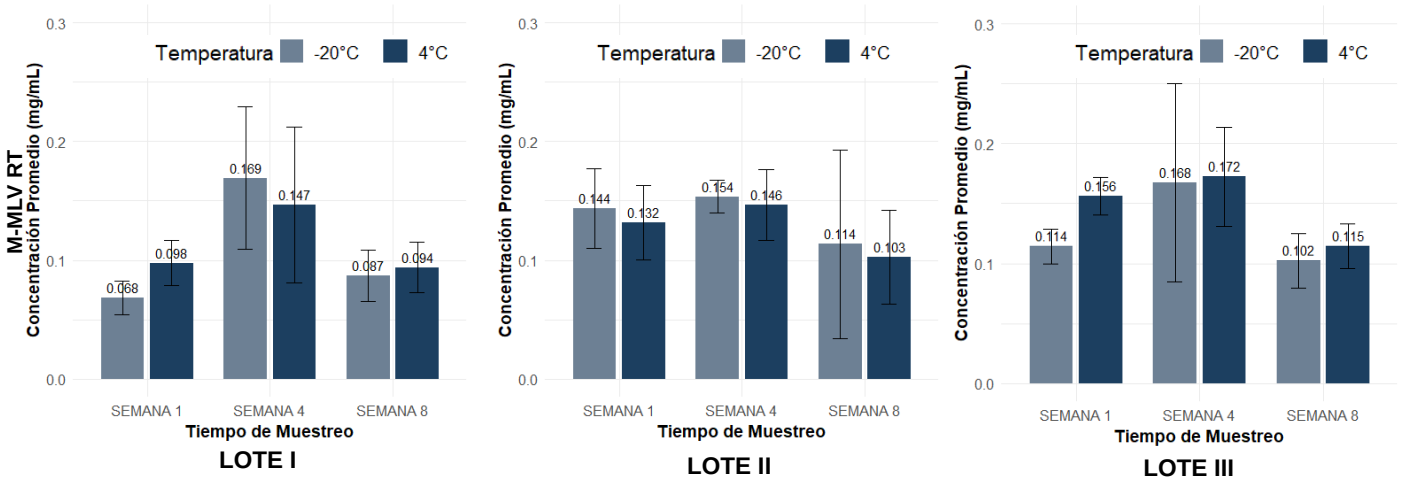


Figura 8. Estimación de la concentración de M-MLV RT determinado mediante el reactivo Bradford en conjunto el análisis densitómetro de cada gel en cuestión. Las gráficas de barras reúnen los datos obtenidos con base al valor promedio de las tres replicas almacenadas a 4°C y a -20°C con respecto al tiempo evaluado (t_0, t_1 y t_2 post producción).

Tabla 10. Determinación de la concentración de M-MLV RT del **Lote I** a t_0, t_1 y t_2.

Tiempo de muestreo	Muestra	Abs	Abs promedio	Proteína Total (mg/mL)	Factor densitometría	M-MLV RT (mg/mL)
T_0=1 semana	Lote I R1 4°C	0,040 0,090	0,065	0,219	43,40%	0,095
	Lote I R2 4°C	0,054 0,062	0,058	0,198	40,67%	0,080
	Lote I R3 4°C	0,094 0,082	0,088	0,288	40,75%	0,118
	Lote I R1 -20 °C	0,034 0,045	0,040	0,142	36,74%	0,052
	Lote I R2 -20 °C	0,067 0,055	0,061	0,207	37,05%	0,077
	Lote I R3 -20 °C	0,047 0,067	0,057	0,195	39,03%	0,076
t_1=4 semanas	Lote I R1 4°C	0,064 0,083	0,074	0,245	34,54%	0,085
	Lote I R2 4°C	0,104 0,153	0,129	0,411	33,89%	0,139
	Lote I R3 4°C	0,203 0,179	0,191	0,599	36,12%	0,216

	Lote I R1 -20 °C	0,238 0,171	0,205	0,640	36,29%	0,232
	Lote I R2 -20 °C	0,152 0,124	0,138	0,439	37,39%	0,164
	Lote I R3 -20 °C	0,107 0,093	0,100	0,325	34,38%	0,112
t_2=8 semanas	Lote I R1 4°C	0,076 0,089	0,083	0,272	37,38%	0,102
	Lote I R2 4°C	0,072 0,041	0,057	0,193	36,28%	0,070
	Lote I R3 4°C	0,091 0,094	0,093	0,302	36,43%	0,110
	Lote I R1 -20 °C	0,062 0,041	0,052	0,178	36,59%	0,065
	Lote I R2 -20 °C	0,102 0,051	0,077	0,254	35,04%	0,089
	Lote I R3 -20 °C	0,104 0,094	0,099	0,322	33,66%	0,108

Tabla 11. Determinación de la concentración de M-MLV RT del **Lote II** a t_0, t_1 y t_2.

Tiempo de muestreo	Muestra	Abs	Abs promedio	Proteína Total (mg/mL)	Factor densitometría	M-MLVRT (mg/mL)
T_0=1 semana	Lote II R1 4°C	0,111 0,102	0,107	0,344	45,56%	0,157
	Lote II R2 4°C	0,054 0,073	0,064	0,214	45,02%	0,097
	Lote II R3 4°C	0,104 0,093	0,099	0,320	44,18%	0,141
	Lote II R1 -20 °C	0,110 0,137	0,124	0,395	43,15%	0,171
	Lote II R2 -20 °C	0,114 0,102	0,108	0,349	44,07%	0,154
	Lote II R3 -20 °C	0,087 0,073	0,080	0,264	40,26%	0,106
t_1=4 semanas	Lote II R1 4°C	0,132 0,115	0,124	0,395	41,88%	0,166
	Lote II R2 4°C	0,095 0,137	0,116	0,373	43,05%	0,161
	Lote II R3 4°C	0,077 0,079	0,078	0,258	43,55%	0,112
	Lote II R1 -20 °C	0,127 0,109	0,118	0,379	40,47%	0,153
	Lote II R2 -20 °C	0,095 0,137	0,116	0,373	37,53%	0,140
	Lote II R3 -20 °C	0,126 0,124	0,125	0,400	41,94%	0,168

t_2=8 semanas	Lote II R1 4°C	0,151 0,056	0,104	0,335	44,06%	0,148
	Lote II R2 4°C	0,030 0,100	0,065	0,219	39,38%	0,086
	Lote II R3 4°C	0,074 0,026	0,050	0,174	42,75%	0,074
	Lote II R1 -20 °C	0,056 0,061	0,059	0,199	40,50%	0,081
	Lote II R2 -20 °C	0,027 0,050	0,039	0,139	39,96%	0,056
	Lote II R3 -20 °C	0,163 0,160	0,162	0,510	39,91%	0,204

Tabla 12. Determinación de la concentración de M-MLV RT del **Lote III** a t0, t1 y t2.

Tiempo de muestreo	**Muestra**	**Abs**	**Abs promedio**	**Proteína Total (mg/mL)**	**Factor densitometría**	**M-MLV RT (mg/mL)**
T_0=1 semana	Lote III R1 4°C	0,161 0,100	0,131	0,417	39,30%	0,164
	Lote III R2 4°C	0,141 0,129	0,135	0,430	38,76%	0,167
	Lote III R3 4°C	0,138 0,088	0,113	0,364	37,83%	0,138
	Lote III R1 -20 °C	0,133 0,081	0,107	0,346	34,83%	0,120
	Lote III R2 -20 °C	0,090 0,071	0,081	0,266	36,78%	0,098
	Lote III R3 -20 °C	0,113 0,126	0,120	0,383	32,65%	0,125
t_1=4 semanas	Lote III R1 4°C	0,257 0,190	0,224	0,697	31,48%	0,219
	Lote III R2 4°C	0,136 0,174	0,155	0,490	32,21%	0,158
	Lote III R3 4°C	0,145 0,116	0,131	0,417	33,50%	0,140
	Lote III R1 -20 °C	0,258 0,265	0,262	0,812	32,36%	0,263
	Lote III R2 -20 °C	0,118 0,118	0,118	0,379	33,00%	0,125
	Lote III R3 -20 °C	0,116 0,111	0,114	0,365	31,36%	0,115
t_2=8 semanas	Lote III R1 4°C	0,131 0,098	0,115	0,368	30,69%	0,113
	Lote III R2 4°C	0,127 0,162	0,145	0,459	29,14%	0,134
	Lote III R3 4°C	0,094 0,118	0,106	0,343	28,19%	0,097
	Lote III R1 -20 °C	0,168	0,136	0,432	29,54%	0,128

		0,103				
	Lote III R2 -20 °C	0,079	0,089	0,290	28,91%	0,084
		0,098				
	Lote III R3 -20 °C	0,107	0,099	0,322	29,63%	0,095
		0,091				

iii) Actividad biológica

Uno de los parámetros más críticos en la evaluación de la calidad de una enzima recae en la actividad biológica, la cual para la M-MLV RT es pertinentemente evaluada con la técnica RT-PCR descrita en la sección **3.3.** Esta refleja el comportamiento sobre la capacidad de la enzima para sintetizar el ADN complementario (ADNc) a partir de la cadena monocatenaria de ARN del zika. Particularmente, la qPCR permite la obtención de los datos de amplificación monitoreados conforme transcurre la reacción de amplificación, en función de la fluorescencia (SYBR Green en este caso) emitida, que es capturada en la etapa de extensión de cada ciclo[1]. Estas señales son graficadas por medio del software en curvas de amplificación que reflejan el curso de la reacción, donde es posible evidenciar el punto en el cual la señal de fluorescencia detectada alcanza un umbral de amplificación representado en el valor Cq (Ciclo de umbral o Ciclo de cuantificación).

Tabla 13. Evaluación de la actividad biológica de la M-MLV RT recombinante LOTE I.

	t_0=1 semana			**t_1=4 semanas**			**t_2=8 semanas**		
	Muestra	**Cq**	**$\overline{Cq}$**	**Muestra**	**Cq**	**$\overline{Cq}$**	**Muestra**	**Cq**	**$\overline{Cq}$**
LOTE I	Lote I R1 4°C (x1)	12,96	**12,96**	Lote I R1 4°C (x1)	13,02	**12,71**	Lote I R1 4°C (x1)	11,73	**11,82**
	Lote I R1 4°C (x2)	12,96		Lote I R1 4°C (x2)	12,40		Lote I R1 4°C (x2)	11,90	
	Lote I R2 4°C (x1)	12,42	**12,43**	Lote I R2 4°C (x1)	12,31	**12,12**	Lote I R2 4°C (x1)	12,89	**12,95**
	Lote I R2 4°C (x2)	12,44		Lote I R2 4°C (x2)	11,93		Lote I R2 4°C (x2)	13,02	
	Lote I R3 4°C (x1)	12,45	**12,49**	Lote I R3 4°C (x1)	12,06	**12,13**	Lote I R3 4°C (x1)	12,07	**12,01**
	Lote I R3 4°C (x2)	12,53		Lote I R3 4°C (x2)	12,20		Lote I R3 4°C (x2)	11,95	
	Lote I R1 -20 °C (x1)	12,31	**12,74**	Lote I R1 -20 °C (x1)	14,61	**14,66**	Lote I R1 -20 °C (x1)	11,43	**11,58**
	Lote I R1 -20 °C (x2)	13,17		Lote I R1 -20 °C (x2)	14,71		Lote I R1 -20 °C (x2)	11,73	
	Lote I R2 -20 °C (x1)	12,72	**12,41**	Lote I R2 -20 °C (x1)	12,60	**12,42**	Lote I R2 -20 °C (x1)	12,09	**12,18**

	Lote I R2 -20 °C (x2)	12,10		Lote I R2 -20 °C (x2)	12,23		Lote I R2 -20 °C (x2)	12,27	
	Lote I R3 -20 °C (x1)	11,17	**11,04**	Lote I R3 -20 °C (x1)	12,91	**12,69**	Lote I R3 -20 °C (x1)	11,55	**11,55**
	Lote I R3 -20 °C (x2)	10,91		Lote I R3 -20 °C (x2)	12,48		Lote I R3 -20 °C (x2)	11,55	
	M-MLV RT Comercial (x1)	13,35	**13,62**	M-MLV RT Comercial (x1)	12,24	**12,28**	M-MLV RT Comercial (x1)	11,16	**11,27**
	M-MLV RT Comercial (x2)	13,90		M-MLV RT Comercial (x2)	12,32		M-MLV RT Comercial (x2)	11,37	

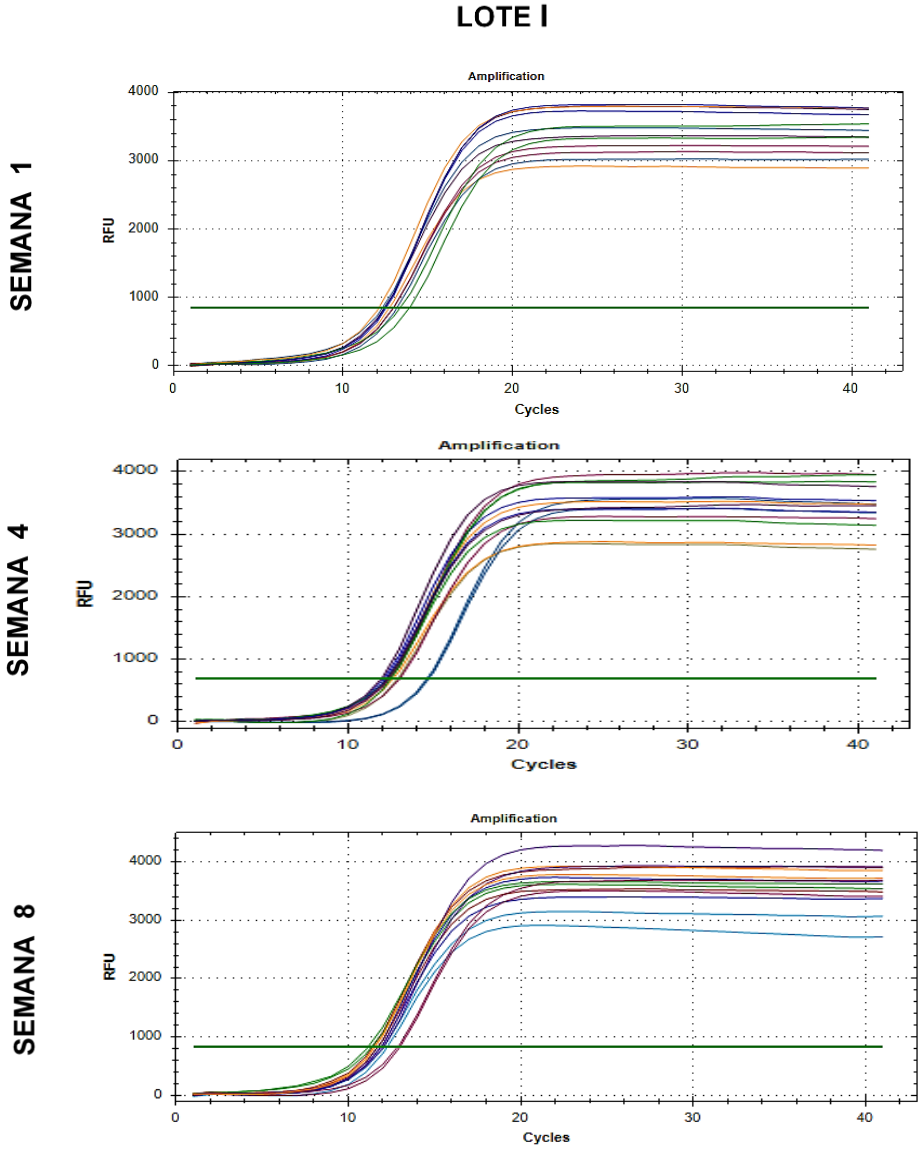


Figura 9. Ensayo de actividad biológica mediante RT-qPCR del **Lote I a t_0, t_1, t_2**. La *Línea verde* representa la M MLV-RT comercial New England BioLabs® vs la M MLV-RT recombinante almacenada a 4°C y -20°C (R1, R2 y R3 c/u). *Cada muestra evaluada se encuentra por duplicado.

Ahora bien, con respecto a los valores de Cq expuestos en la **Tabla 10** correspondientes al Lote I, es posible inferir de forma cualitativa que se mantienen relativamente semejantes en el rango entre 11 a 13 ciclos desde la semana 1 hasta la semana 8 de evaluación; a excepción de la réplica 1 almacenada a -20°C en la semana 4; en contraste con el resto de réplicas de enzimas recombinantes y la comercial (representada de color verde) exponiendo una amplificación más tardía. (Véase **Anexo 1b-Figura 13**).

Con respecto al Lote II, acorde los resultados reportados en la **Tabla 14**, los valores de Cq se mantuvieron similares dentro de las 4 semanas post producción de la enzima, mostrando ciclos de amplificación mayores en la semana 8. No obstante, este valor presenta un grado de exactitud considerable con respecto al estándar comercial, por lo que se podría inferir que esta variación corresponde presuntamente a alguna alteración en la integridad del material genético de partida, como un cambio en la concentración del ARN viral. De modo que, si la cantidad de material genético en la muestra es menor, la amplificación procederá de forma más lenta y se necesitarán más ciclos para que la señal de amplificación supere el umbral. Asimismo, cabe detallar que se evidencian valores de Cq menores en las réplicas almacenadas a -20°C en contraste con los valores producto de la refrigeración a 4°C. Cualitativamente, en la **Figura 10** se observan los perfiles de amplificación con un nivel considerable de similaridad.

Tabla 14. Evaluación de la actividad biológica de la M-MLV RT recombinante LOTE II.

	t_0=1 semana			t_1=4 semanas			t_2=8 semanas		
	Muestra	**Cq**	**$\overline{Cq}$**	**Muestra**	**Cq**	**$\overline{Cq}$**	**Muestra**	**Cq**	**$\overline{Cq}$**
LOTE II	Lote II R1 4°C (x1)	11,92	**11,72**	Lote II R1 4°C (x1)	12,16	**11,79**	Lote II R1 4°C (x1)	15,55	**15,23**
	Lote II R1 4°C (x2)	11,51		Lote II R1 4°C (x2)	11,41		Lote II R1 4°C (x2)	14,91	
	Lote II R2 4°C (x1)	12,19	**12,21**	Lote II R2 4°C (x1)	11,55	**11,64**	Lote II R2 4°C (x1)	14,87	**14,88**
	Lote II R2 4°C (x2)	12,24		Lote II R2 4°C (x2)	11,72		Lote II R2 4°C (x2)	14,89	
	Lote II R3 4°C (x1)	14,11	**14,48**	Lote II R3 4°C (x1)	11,46	**11,62**	Lote II R3 4°C (x1)	14,36	**14,42**
	Lote II R3 4°C (x2)	14,86		Lote II R3 4°C (x2)	11,77		Lote II R3 4°C (x2)	14,48	
	Lote II R1 -20 °C (x1)	12,09	**11,56**	Lote II R1 -20 °C (x1)	11,93	**11,86**	Lote II R1 -20 °C (x1)	13,76	**13,58**
	Lote II R1 -20 °C (x2)	11,03		Lote II R1 -20 °C (x2)	11,78		Lote II R1 -20 °C (x2)	13,40	
	Lote II R2 -20 °C (x1)	12,66	**12,10**	Lote II R2 -20 °C (x1)	11,80	**11,63**	Lote II R2 -20 °C (x1)	14,61	**14,49**
	Lote II R2 -20 °C (x2)	11,54		Lote II R2 -20 °C (x2)	11,45		Lote II R2 -20 °C (x2)	14,38	

	Lote II R3 -20 °C (x1)	11,20	**11,23**	Lote II R3 -20 °C (x1)	11,64	**11,51**	Lote II R3 -20 °C (x1)	14,61	**14,48**
	Lote II R3 -20 °C (x2)	11,25		Lote II R3 -20 °C (x2)	11,39		Lote II R3 -20 °C (x2)	14,36	
	M-MLV RT Comercial (x1)	10,94	**11,05**	M-MLV RT Comercial (x1)	12,04	**12,18**	M-MLV RT Comercial (x1)	14,26	**14,18**
	M-MLV RT Comercial (x2)	11,17		M-MLV RT Comercial (x2)	12,32		M-MLV RT Comercial (x2)	14,09	

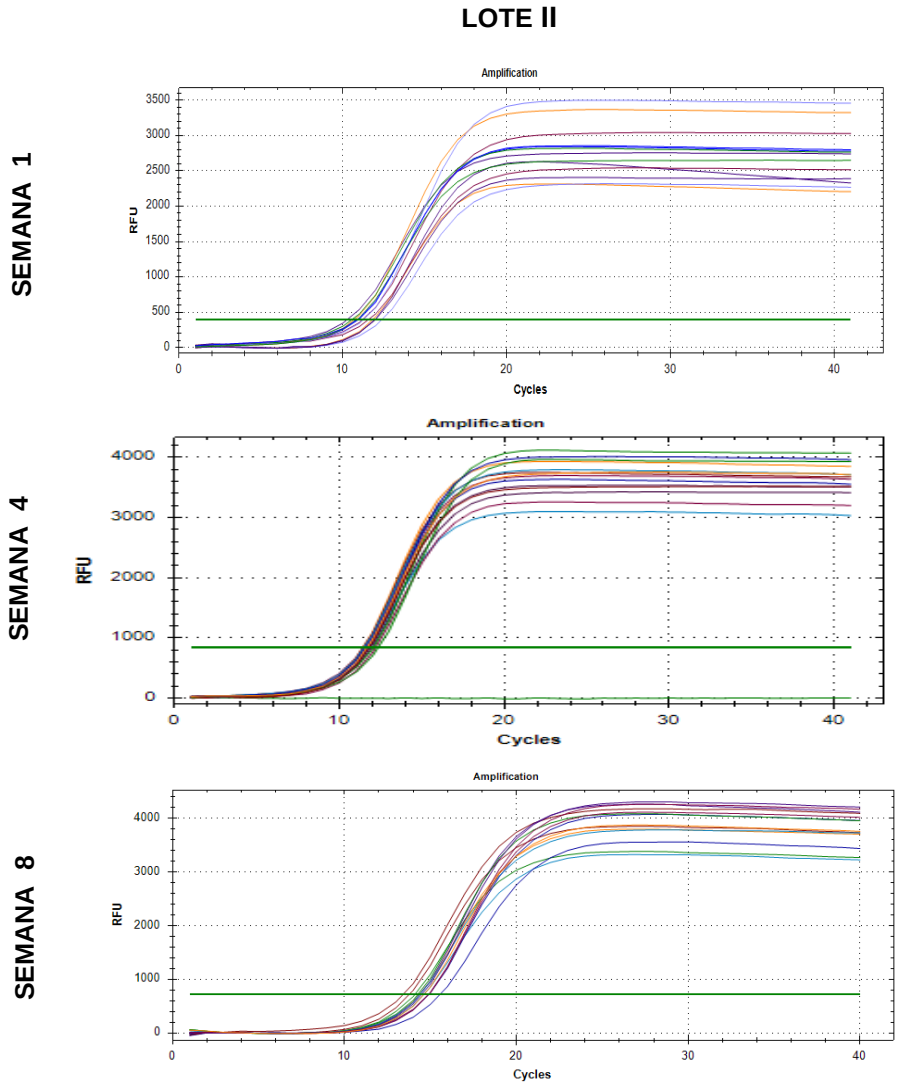


Figura 10. Ensayo de actividad biológica mediante RT-qPCR del **Lote II a t_0, t_1, t_2**. La *Línea verde* representa la M MLV-RT comercial New England BioLabs® vs la M MLV-RT recombinante almacenada a 4°C y -20°C (R1, R2 y R3 c/u). *Cada muestra evaluada se encuentra por duplicado.

Finalmente, los resultados reportados en la **Tabla 15** referentes al Lote III evidencian de igual forma a los otros lotes, valores de Cq precisos entre las replicas evaluadas, sin diferencias notables entre las dos temperaturas de refrigeración. Sin embargo, cabe destacar que tal como es posible detallar en la **Figura 11**,

con respecto a la semana 1 de almacenamiento la enzima comercial presentó un valor de Cq mayor indicando una amplificación más tardia con respecto a las enzimas recombinantes. Caso contrario, transcurridas 4 y 8 semanas post producción la enzima comercial permitió la amplificación en un menor número de ciclos en comparación al resto de las replicas evaluadas. Estas diferencias, podrían estar asociadas a variaciones en la estabilidad del material genético durante el almacenamiento o directamente a la eficiencia de la enzima en cada condición de refrigeración.

Tabla 15. Evaluación de la actividad biológica de la M-MLV RT recombinante LOTE III.

	t_0=1 semana			t_1=4 semanas			t_2=8 semanas		
	Muestra	**Cq**	**$\overline{Cq}$**	**Muestra**	**Cq**	**$\overline{Cq}$**	**Muestra**	**Cq**	**$\overline{Cq}$**
LOTE III	Lote I R1 4°C (x1)	12,01	**11,74**	Lote I R1 4°C (x1)	12,58	**12,33**	Lote I R1 4°C (x1)	11,63	**11,51**
	Lote I R1 4°C (x2)	11,47		Lote I R1 4°C (x2)	12,09		Lote I R1 4°C (x2)	11,38	
	Lote I R2 4°C (x1)	12,77	**12,77**	Lote I R2 4°C (x1)	12,59	**12,55**	Lote I R2 4°C (x1)	11,82	**11,77**
	Lote I R2 4°C (x2)	12,76		Lote I R2 4°C (x2)	12,52		Lote I R2 4°C (x2)	11,72	
	Lote I R3 4°C (x1)	11,86	**12,05**	Lote I R3 4°C (x1)	12,00	**12,12**	Lote I R3 4°C (x1)	11,48	**11,51**
	Lote I R3 4°C (x2)	12,24		Lote I R3 4°C (x2)	12,24		Lote I R3 4°C (x2)	11,54	
	Lote I R1 -20 °C (x1)	12,33	**12,23**	Lote I R1 -20 °C (x1)	12,30	**12,26**	Lote I R1 -20 °C (x1)	11,65	**11,60**
	Lote I R1 -20 °C (x2)	12,13		Lote I R1 -20 °C (x2)	12,22		Lote I R1 -20 °C (x2)	11,55	
	Lote I R2 -20 °C (x1)	12,77	**12,10**	Lote I R2 -20 °C (x1)	12,21	**12,57**	Lote I R2 -20 °C (x1)	11,48	**11,25**
	Lote I R2 -20 °C (x2)	11,43		Lote I R2 -20 °C (x2)	12,92		Lote I R2 -20 °C (x2)	11,03	
	Lote I R3 -20 °C (x1)	12,74	**12,27**	Lote I R3 -20 °C (x1)	12,30	**12,21**	Lote I R3 -20 °C (x1)	11,77	**11,65**
	Lote I R3 -20 °C (x2)	11,80		Lote I R3 -20 °C (x2)	12,11		Lote I R3 -20 °C (x2)	11,53	
	M-MLV RT Comercial (x1)	14,01	**14,12**	M-MLV RT Comercial (x1)	11,30	**11,45**	M-MLV RT Comercial (x1)	10,30	**10,28**
	M-MLV RT Comercial (x2)	14,22		M-MLV RT Comercial (x2)	11,59		M-MLV RT Comercial (x2)	10,25	

Asimismo, cabe destacar que pese a haberse presentado variaciones en la concentración o cierto grado de impurezas restantes posterior al proceso de purificación, no parece afectar directamente la actividad biológica Retrotranscriptasa; puesto que los resultados sugieren perfiles de amplificación muy similares

con respecto a las enzimas recombinantes, siendo estas comparables frente a la funcionalidad de la enzima comercial sin diferencias significativas entre el almacenamiento a -20°C y a 4°C.

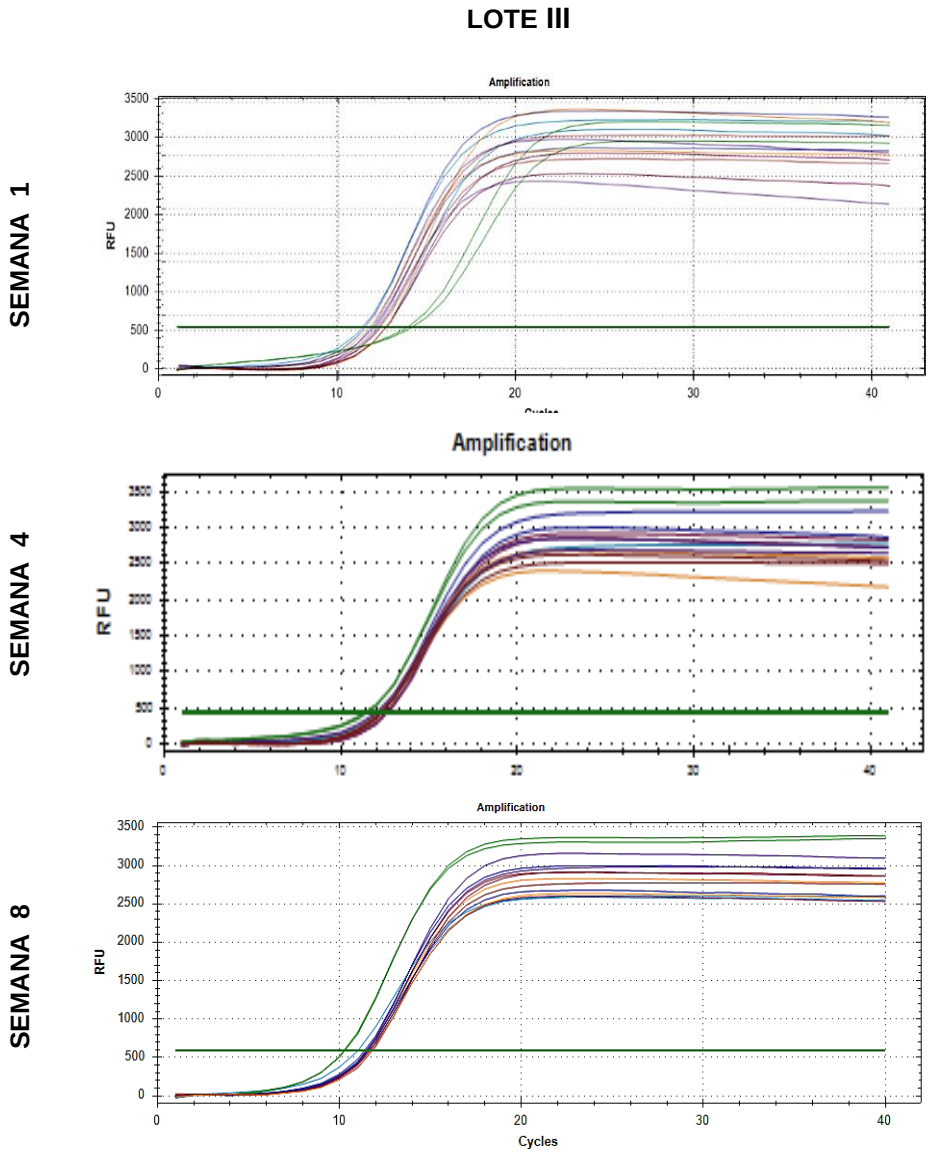


Figura 11. Ensayo de actividad biológica mediante RT-qPCR del **Lote III a t_0, t_1, t_2**. La *Línea verde* representa la M MLV-RT comercial New England BioLabs® vs la M MLV-RT recombinante almacenada a 4°C y -20°C (R1, R2 y R3 c/u). *Cada muestra evaluada se encuentra por duplicado.

CONCLUSIONES

- La producción de la enzima M-MLV RT a escala de 2 Litros en la plataforma recombinante de *E. coli* BL21 (DE3) no parece presentar una diferencia significativa con respecto a un volumen de 1L; no obstante, la expresión en este modelo bacteriano resultó ser una estrategia favorable para la obtención de M-MLV RT en su forma activa y soluble en cantidades favorables en comparación con escalas menores.

- La implementación de un proceso de purificación mediante un sistema no automatizado por flujo a gravedad demostró ser una alternativa viable para la obtención de la M MLV-RT con un grado mucho menor de impurezas tras la obtención de la fracción soluble posterior al tratamiento de lisado. Adicionalmente, este método permitió la purificación de un volumen de medio de aproximadamente 50 mL en un tiempo y proceso relativamente corto y sencillo, resultando en mayor costo-efectividad con un proceso menos robusto que los sistemas automatizados como los costos y el manejo que implica la implementación del equipo AKTA pure.

- La evaluación de los atributos de calidad de la enzima M-MLV RT permitió identificar en términos generales que no hay una diferencia considerable entre el almacenamiento a temperaturas más bajas (-20°C) en comparación con una refrigeración a temperaturas entre los 2-4°C por el periodo evaluado. Particularmente, se pudieron evidenciar ciertas variaciones en la concentración de enzima (mg/mL) entre los lotes a los diferentes tiempos evaluados. No obstante, cualitativamente las bandas de los geles correspondientes presentan un comportamiento similar y la identidad de la enzima se conserva a través del tiempo. Asimismo, la actividad enzimática Retrotranscriptasa resultó ser bastante comparable frente a su estándar (enzima comercial), lo cual respalda la capacidad de la enzima recombinante para cumplir con los estándares requeridos de fiabilidad y funcionalidad en estudios moleculares avanzados y pruebas diagnósticas.

- Finalmente, los resultados exponen que es posible almacenar la enzima tanto a 4°C como a -20°C por el periodo de 8 semanas como máximo, ya que en ambas condiciones presenta estabilidad térmica. Asimismo, se sugiere continuar el estudio de estabilidad para definir con certeza la vida útil del producto en condiciones naturales (-20|C) o aceleradas (4°C). Con base a lo anterior, es posible concluir que el

presente proyecto subraya la importancia de desarrollar procesos biotecnológicos locales para satisfacer las necesidades nacionales. La capacidad de producir y purificar M-MLV RT de manera eficiente no solo contribuye a la reducción de costos y tiempos de importación, sino que también fortalece la independencia tecnológica del país en el ámbito biomédico, favoreciendo el diagnóstico molecular y la investigación en salud.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, agradezco a Dios, ya que fue mi fortaleza y con su infinita sabiduría me guio en cada paso de este proceso tan retador pero lleno de aprendizajes. En segundo lugar, agradezco a mi familia por ser mi mayor apoyo y el pilar fundamental para poder culminar esta etapa de mi vida. Quiero expresar mis profundos agradecimientos a mis tutores, la Dra. Paola Andrea Caicedo y el Profesor. Steven Alexander David, por haber depositado su confianza en mí y haberme dado la oportunidad de realizar este proyecto de la mano de su acompañamiento y apoyo, asimismo, a el Dr. Alvaro Barrera; mi mayor admiración y gratitud, son inspiración para mí. Finalmente, mis más sinceros agradecimientos a todos los que me ayudaron bien sea brindándome su apoyo técnico o emocional, especialmente a mis compañeros del 505 L: Juliana Valenzuela, Mateo Peña, Jesús Sebastián David, Valeria Díaz, Juan David Ocampo, Sebastián Ramírez, y demás compañeros por su disposición y acompañamiento.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tamay de Dios, L., Ibarra, C. & Velasquillo, C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad* vol. 2 70–78 (2013).
2. Páramo Olaya, C., Fernando González Barrios, A. & Carlos Cruz Jiménez, J. *Scaling Up Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (MMLV-RT) Production: A Comprehensive Study on Enzyme Yield, Activity, and Economic Impact*. (2024).
3. Farfán, M. MOLECULAR BIOLOGY IN CLINICAL DIAGNOSIS. *Revista Medica Clinica Las Condes* **26**, 788–793 (2015).

4. Chen, Y., Xu, W. & Sun, Q. A novel and simple method for high-level production of reverse transcriptase from Moloney murine leukemia virus (MMLV-RT) in Escherichia coli. *Biotechnol Lett* **31**, 1051–1057 (2009).

5. ThermoScientific. *BL21(DE3) Competent Cells*. www.thermofisher.com/us/en/home/global/terms-and-conditions.html. (2019).

6. Nuryana, I. *et al.* Expression of Codon-Optimized Gene Encoding Murine Moloney Leukemia Virus Reverse Transcriptase in Escherichia coli. *Protein Journal* **41**, 515–526 (2022).

7. Lara, A. PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN Escherichia coli. *Rev Mex Ing Quim* **10**, (2011).

8. González, A. & Fillat, M. ASPECTOS METODOLÓGICOS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN Escherichia coli. *Revista de Educación Bioquímica* **37**, (2018).

9. Sørensen, H. P. & Mortensen, K. K. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of Escherichia coli. *Microbial Cell Farctories* **4**, (2005).

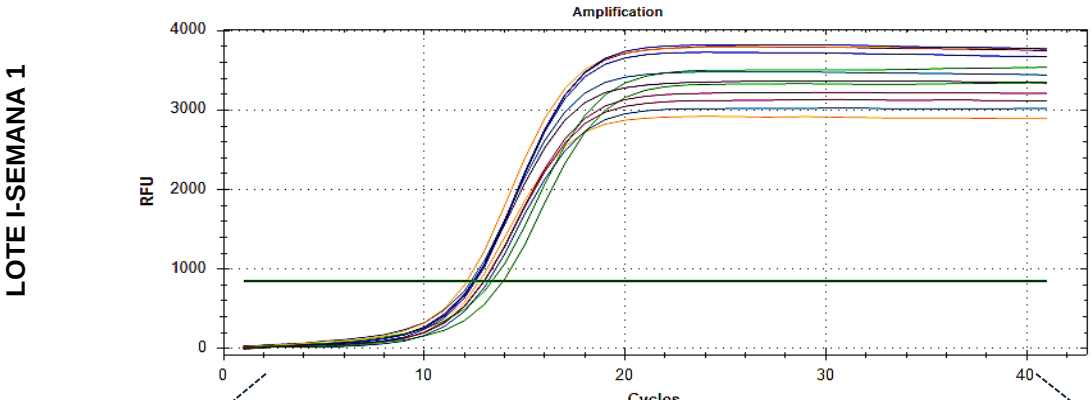
10. Promega. M-MLV Reverse Transcriptase. https://worldwide.promega.com/products/pcr/rt-pcr/m-mlv-reverse-transcriptase/?catNum=M1701.

11. Mendoza-Rojas, G. *et al.* A low-cost and open-source protocol to produce key enzymes for molecular detection assays. *STAR Protoc* **2**, (2021).

12. Yasukawa, K., Mizuno, M., Konishi, A. & Inouye, K. Increase in thermal stability of Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase by site-directed mutagenesis. *J Biotechnol* **150**, 299–306 (2010).

13. New England BioLabs. *M-MuLV Reverse Transcriptase*. doi:https://www.neb.com/en/products/m0253-m-mulv-reverse-transcriptase?srsltid=AfmBOooYsg-v9qLzuqt3NUxAsOI6AWYwz6s5vbdl-azzph1kEugLAYu5.

Anexos



Anexo 1a-Figura 12. Ensayo de actividad biológica mediante RT-qPCR del **Lote I t_0= 1 semana**. La *Línea verde* representa la M MLV-RT comercial New England BioLabs® vs la M MLV-RT recombinante almacenada a 4°C y -20°C (R1, R2 y R3 c/u)

4°C

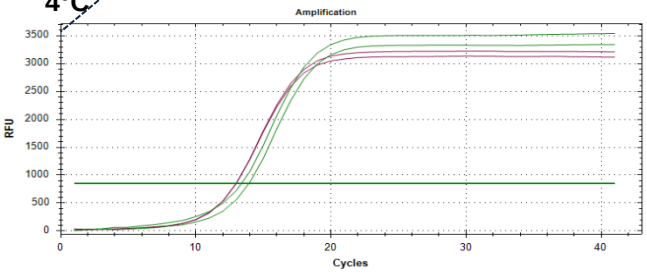


Figura 12a. Curva de amplificación **Lote I R1 4°C**. *Línea fucsia* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial

-20°C

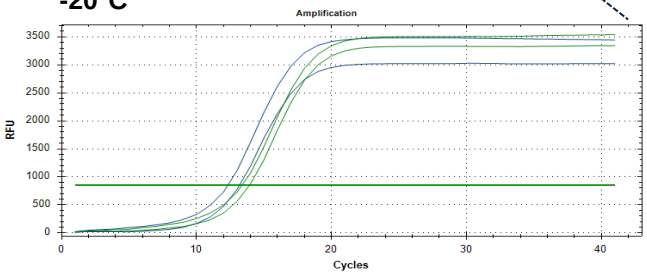


Figura 12b. Curva de amplificación L**ote I R1 -20°C**. *Línea azul* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial

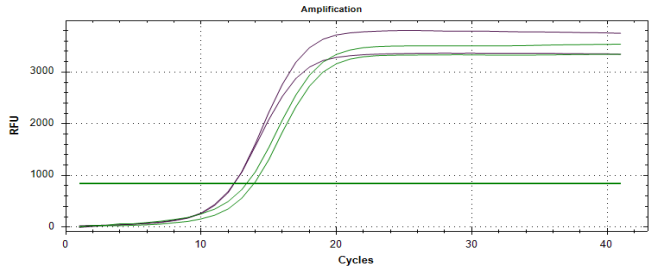


Figura 12c. Curva de amplificación **Lote I R2 4°C**. *Línea purpura* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial

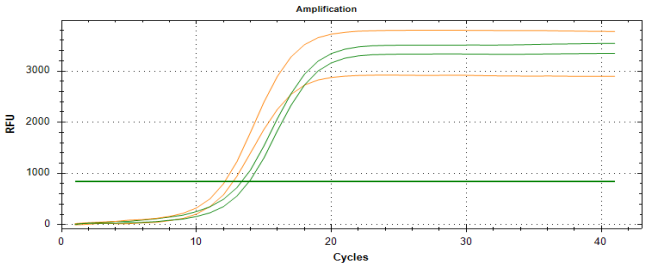


Figura 12d. Curva de amplificación **Lote I R2 -20°C**. *Línea naranja* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial

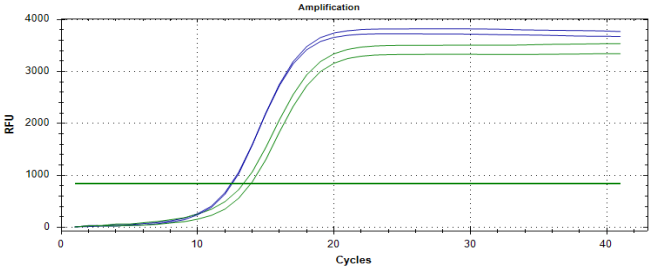


Figura 12e. Curva de amplificación **Lote I R3 4°C**. *Línea azul oscura* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial

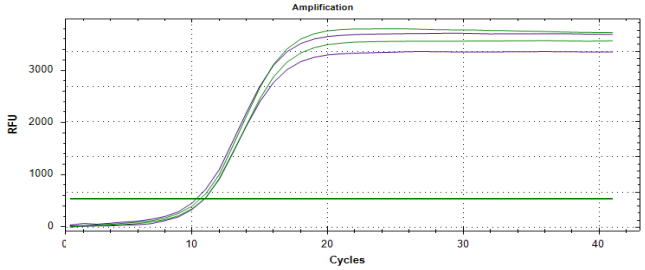
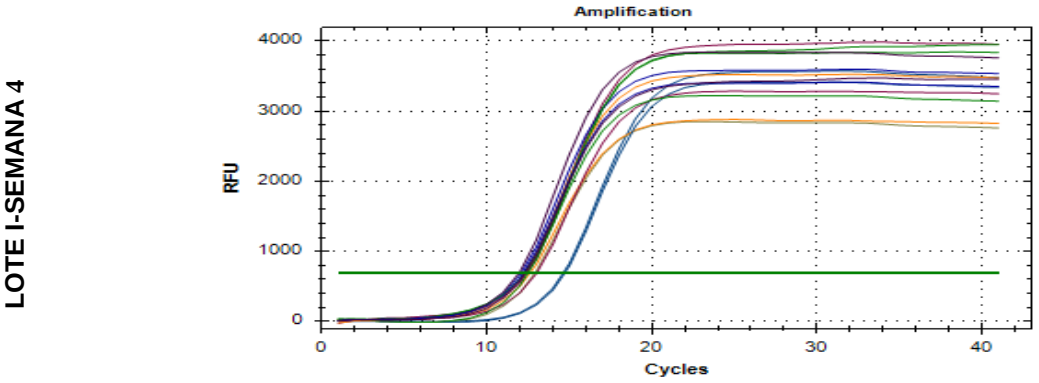


Figura 12f. Curva de amplificación **Lote I R3 -20°C**. *Línea violeta* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial



Anexo 1b-Figura 13. Ensayo de actividad biológica mediante RT-qPCR del **Lote I t_1= 4 semanas**. La *Línea verde* representa la M MLV-RT comercial New England BioLabs® vs la M MLV-RT recombinante almacenada a 4°C y -20°C (R1, R2 y R3 c/u)

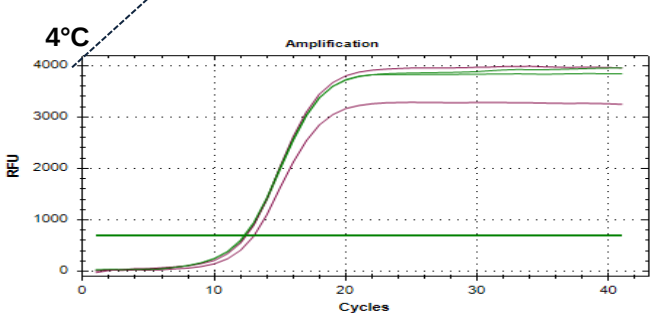


Figura 13a. Curva de amplificación **Lote I R1 4°C**. *Línea fucsia* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial

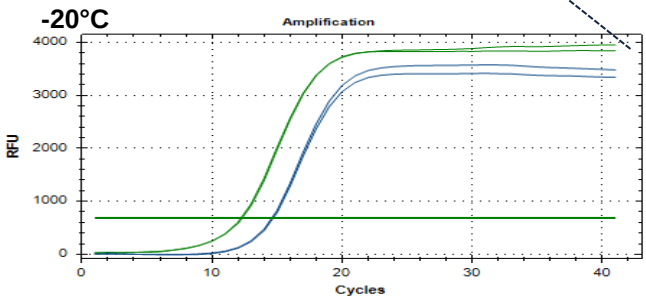


Figura 13b. Curva de amplificación **Lote I R1 -20°C**. *Línea azul* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial

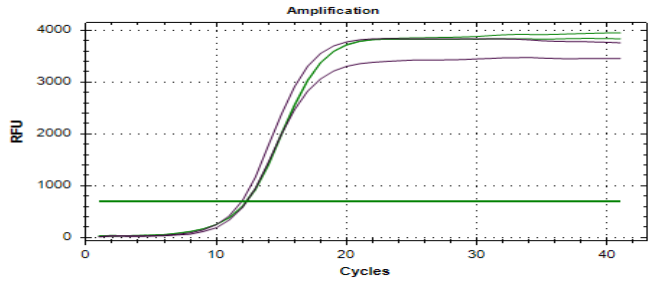


Figura 13c. Curva de amplificación **Lote I R2 4°C**. *Línea purpura* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial

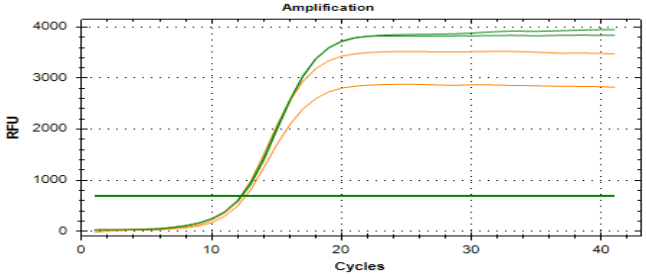


Figura 13d. Curva de amplificación **Lote I R2 -20°C**. *Línea naranja* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial

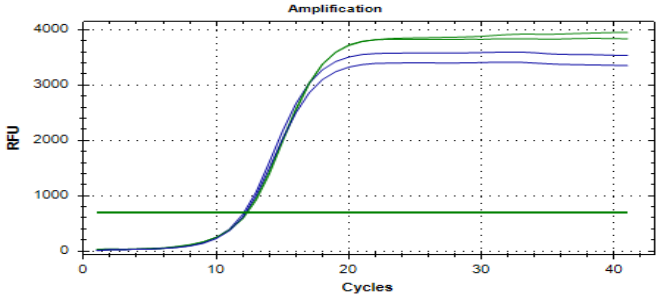


Figura 13e. Curva de amplificación **Lote I R3 4°C**. *Línea azul* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial

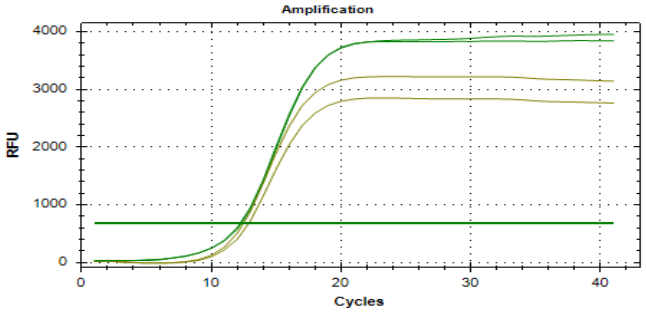
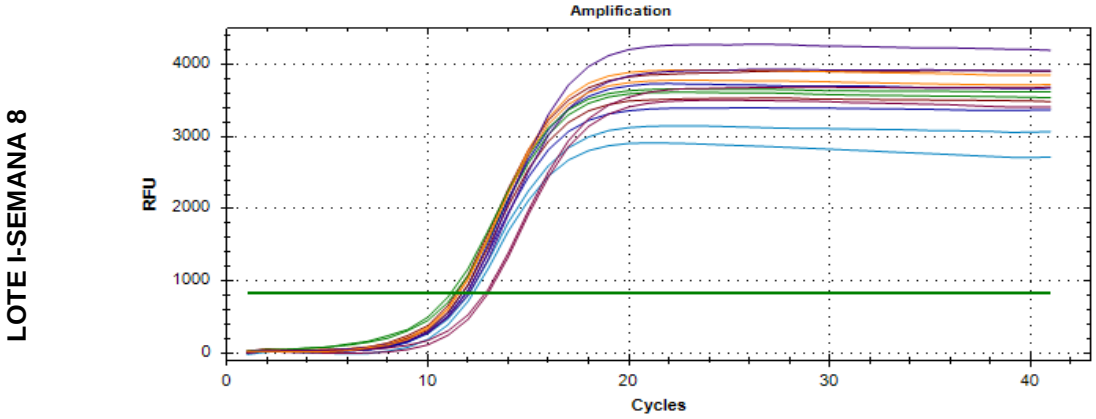


Figura 13f. Curva de amplificación **Lote I R3 -20°C**. *Línea oliva* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial



Anexo 1c-Figura 14. . Ensayo de actividad biológica mediante RT-qPCR del **Lote I t_1= 8 semanas**. La *Línea verde* representa la M MLV-RT comercial New England BioLabs® vs la M MLV-RT recombinante almacenada a 4°C y -20°C (R1, R2 y R3 c/u)

4°C

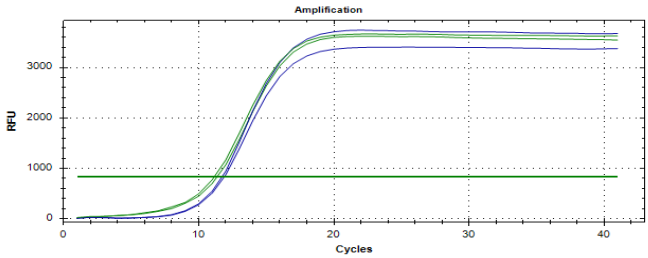


Figura 14a. Curva de amplificación **Lote I R1 4°C**. *Línea azul oscuro* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial

-20°C

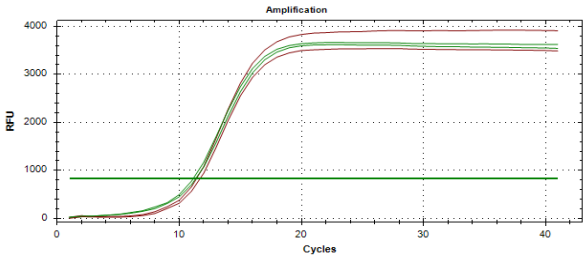


Figura 14b. Curva de amplificación L**ote I R1 -20°C**. *Línea roja* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial

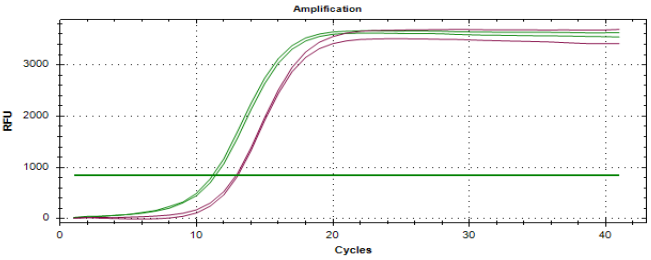


Figura 14c. Curva de amplificación **Lote I R2 4°C**. *Línea fuscia* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial

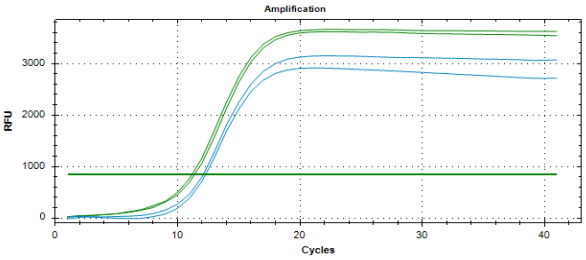


Figura 14d. Curva de amplificación **Lote I R2 -20°C**. *Línea azul clara* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial

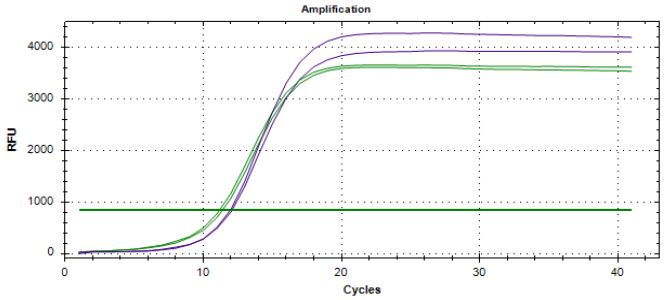


Figura 14e. Curva de amplificación **Lote I R3 4°C**. *Línea violeta* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial

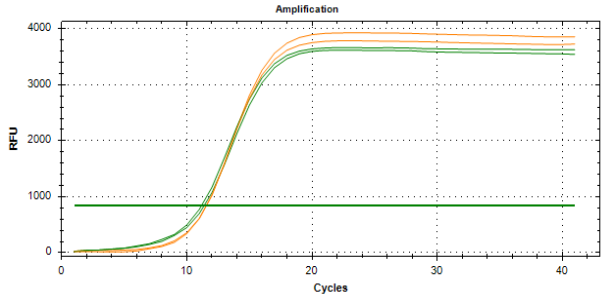
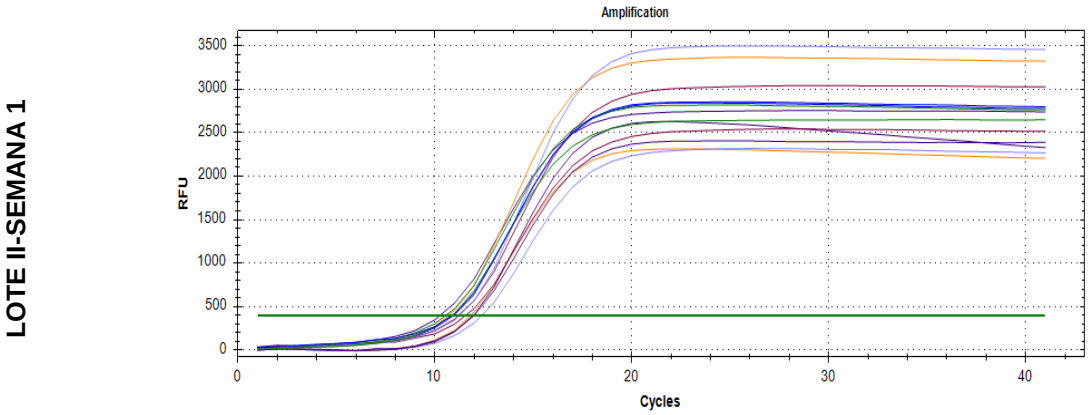


Figura 14f. Curva de amplificación **Lote I R3 -20°C**. *Línea amarilla* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial



Anexo 2a-Figura 15. Ensayo de actividad biológica mediante RT-qPCR del **Lote II t_0= 1 semana**. La *Línea verde* representa la M MLV-RT comercial New England BioLabs® vs la M MLV-RT recombinante almacenada a 4°C y -20°C (R1, R2 y R3 c/u)

4°C

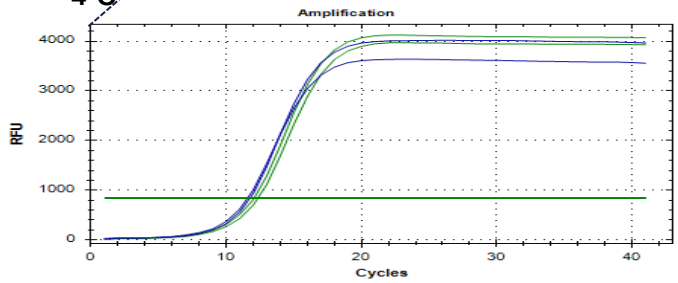


Figura 15a. Curva de amplificación **Lote II R1 4°C**. *Línea azul oscuro* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial

-20°C

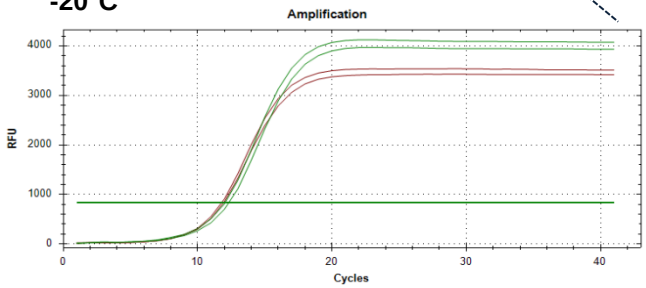


Figura 15b. Curva de amplificación L**ote II R1 -20°C**. *Línea roja* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial

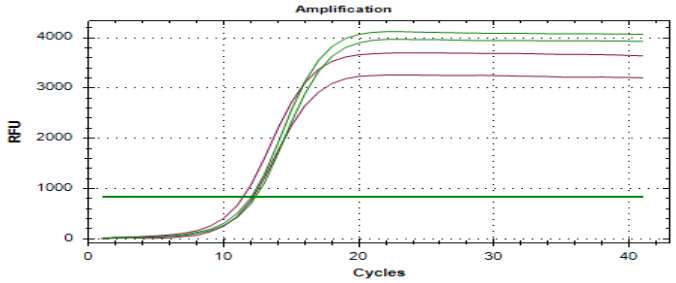


Figura 15c. Curva de amplificación **Lote II R2 4°C**. *Línea fuscia* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial

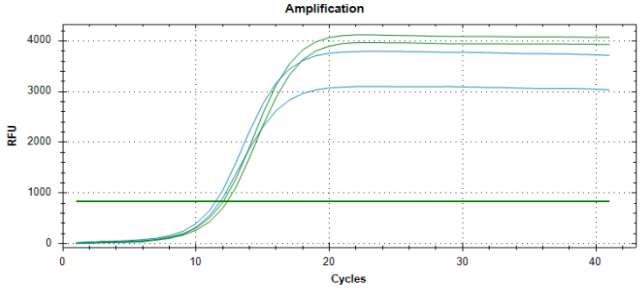


Figura 15d. Curva de amplificación **Lote II R2 -20°C**. *Línea azul claro* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial

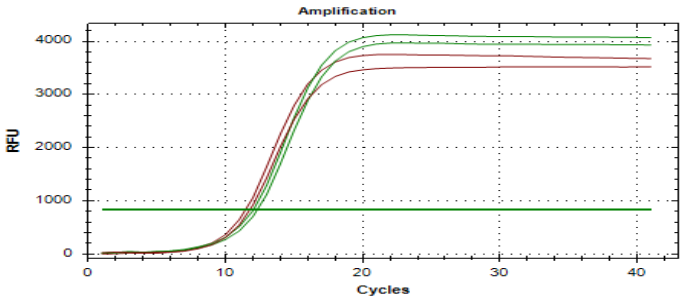


Figura 15e. Curva de amplificación **Lote II R3 4°C**. *Línea café* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial

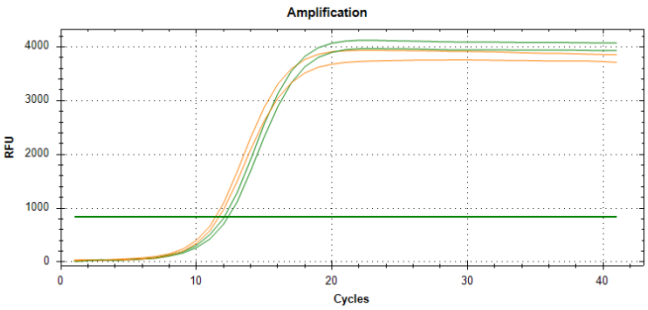
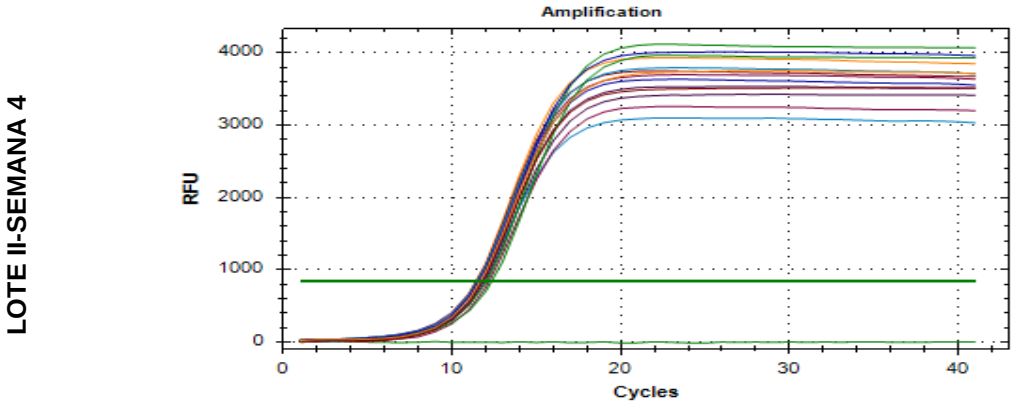


Figura 15f. Curva de amplificación **Lote II R3 -20°C**. *Línea amarilla* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial



Anexo 2b-Figura 16. Ensayo de actividad biológica mediante RT-qPCR del **Lote II t_1= 4 semanas**. La *Línea verde* representa la M MLV-RT comercial New England BioLabs® vs la M MLV-RT recombinante almacenada a 4°C y -20°C (R1, R2 y R3 c/u)

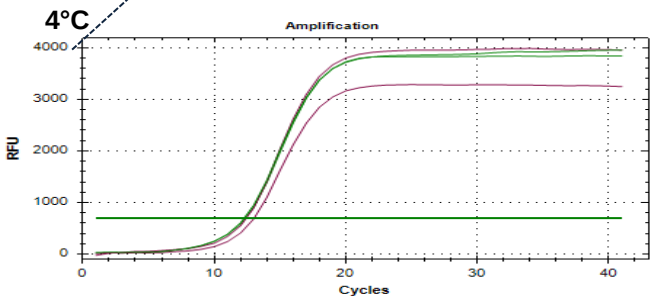


Figura 16a. Curva de amplificación **Lote II R1 4°C**. *Línea fucsia* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial

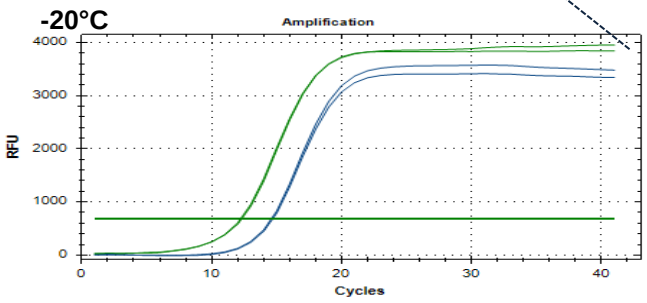


Figura 16b. Curva de amplificación L**ote II R1 -20°C**. *Línea azul* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial

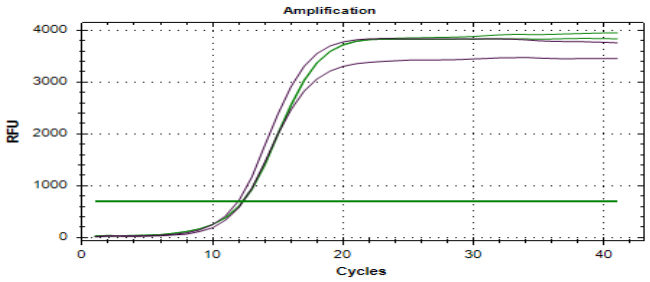


Figura 16c. Curva de amplificación **Lote II R2 4°C**. *Línea purpura* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial

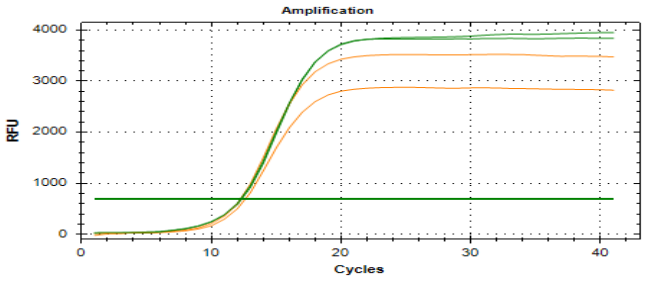


Figura 16d. Curva de amplificación **Lote II R2 -20°C**. *Línea naranja* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial

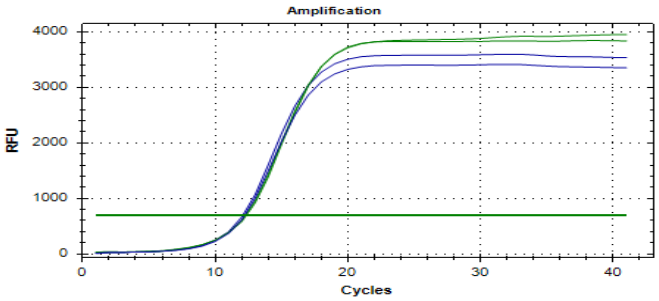


Figura 16e. Curva de amplificación **Lote II R3 4°C**. *Línea azul* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial

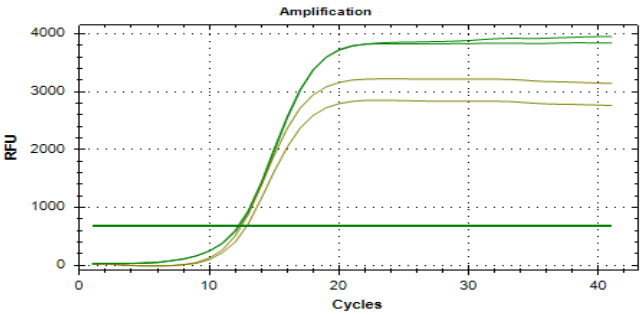
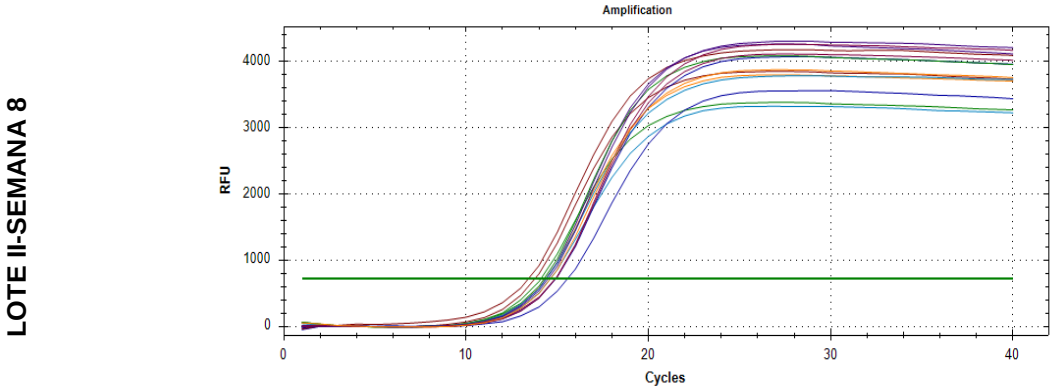


Figura 16f. Curva de amplificación **Lote II R3 -20°C**. *Línea oliva* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial



Anexo 2c-Figura 17. Ensayo de actividad biológica mediante RT-qPCR del **Lote II t_2= 8 semanas**. La *Línea verde* representa la M MLV-RT comercial New England BioLabs® vs la M MLV-RT recombinante almacenada a 4°C y -20°C (R1, R2 y R3 c/u)

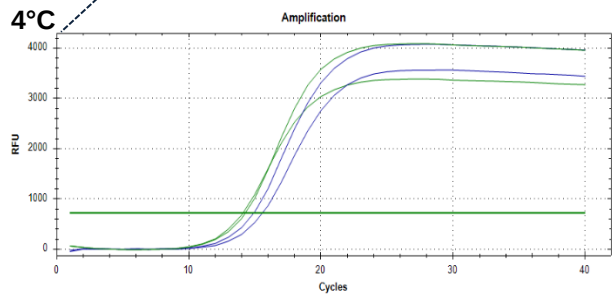


Figura 17a. Curva de amplificación **Lote II R1 4°C**. *Línea azul* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial

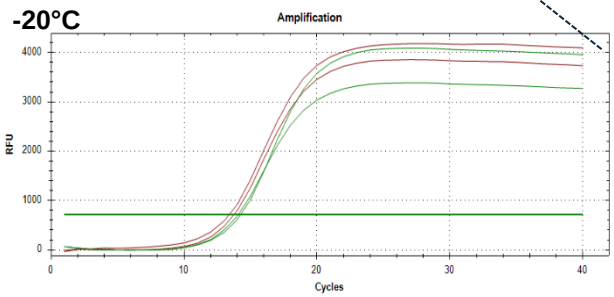


Figura 17b. Curva de amplificación L**ote II R1 -20°C**. *Línea roja* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial

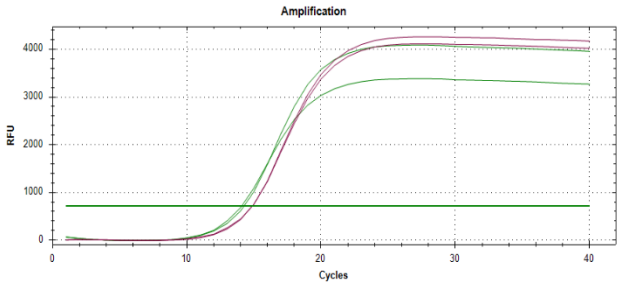


Figura 17c. Curva de amplificación **Lote II R2 4°C**. *Línea fuscia* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial

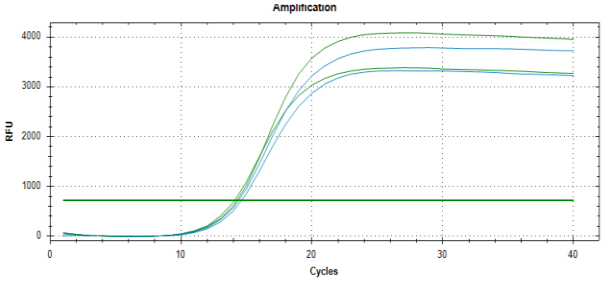


Figura 17d. Curva de amplificación **Lote II R2 -20°C**. *Línea azul claro* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial

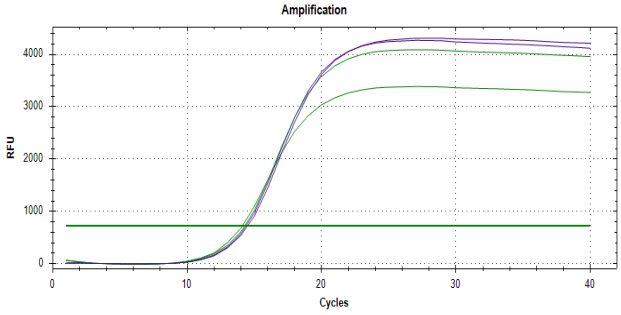


Figura 17e. Curva de amplificación **Lote II R3 4°C**. *Línea purpura representa* M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial

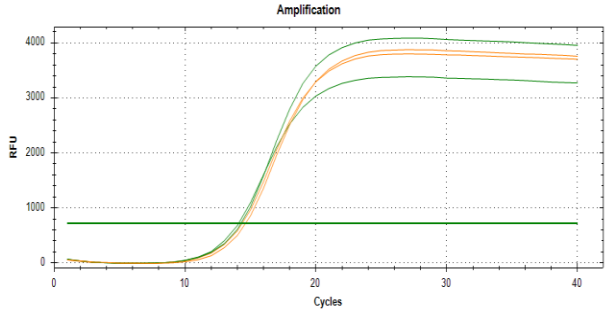
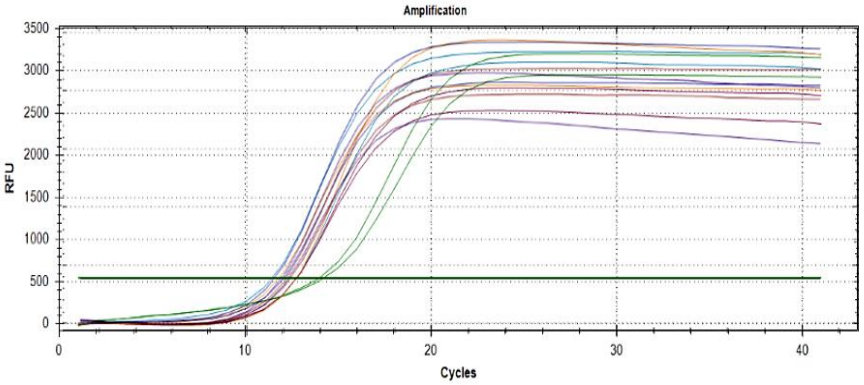


Figura 17f. Curva de amplificación **Lote II R3 -20°C**. *Línea naranja* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial

LOTE III-SEMANA 1



Anexo 3a-Figura 18. Ensayo de actividad biológica mediante RT-qPCR del **Lote III t_0= 1 semana**. La *Línea verde* representa la M MLV-RT comercial New England BioLabs® vs la M MLV-RT recombinante almacenada a 4°C y -20°C (R1, R2 y R3 c/u)

4°C

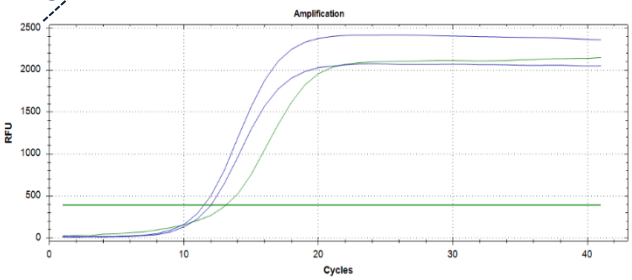


Figura 18a. Curva de amplificación **Lote III R1 4°C**. *Línea fucsia* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial

-20°C

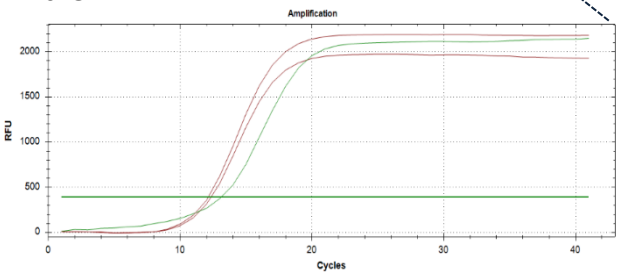


Figura 18b. Curva de amplificación L**ote III R1 -20°C**. *Línea azul* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial

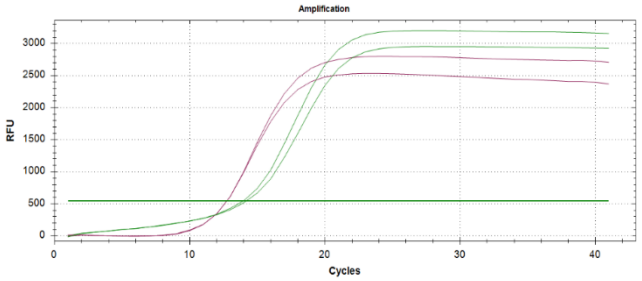


Figura 18c. Curva de amplificación **Lote III R2 4°C**. *Línea purpura* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial

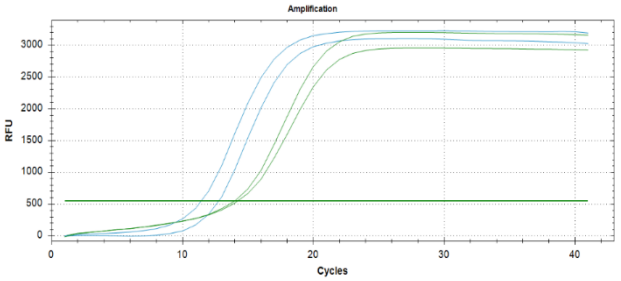


Figura 18d. Curva de amplificación **Lote III R2 -20°C**. *Línea naranja* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial

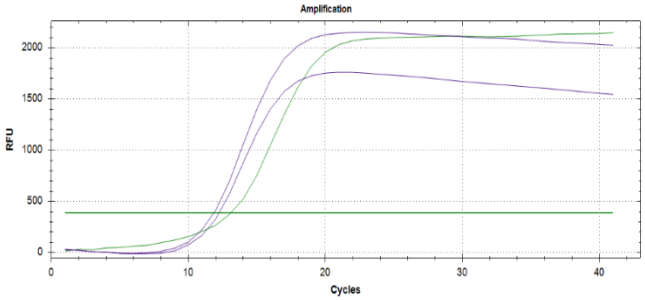


Figura 18e. Curva de amplificación **Lote III R3 4°C**. *Línea morada* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial

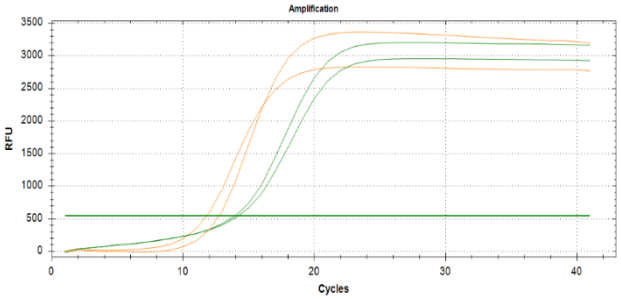
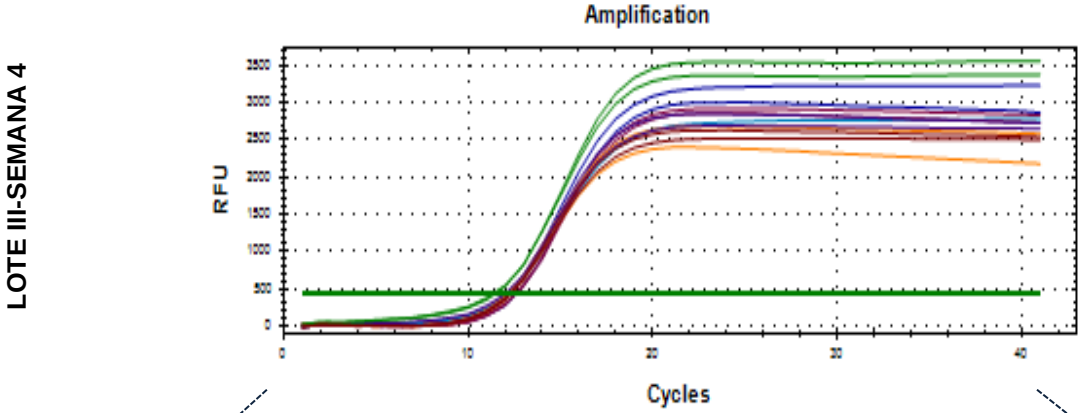


Figura 18f. Curva de amplificación **Lote III R3 -20°C**. *Línea violeta* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial



Anexo 3b-Figura 19.Ensayo de actividad biológica mediante RT-qPCR del **Lote III t_1= 4 semanas**. La *Línea verde* representa la M MLV-RT comercial New England BioLabs® vs la M MLV-RT recombinante almacenada a 4°C y -20°C (R1, R2 y R3 c/u)

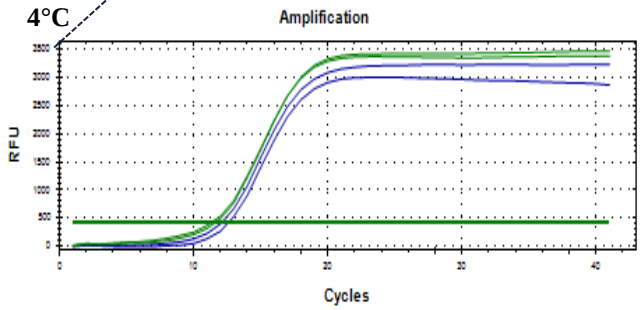


Figura 19a. Curva de amplificación **Lote III R1 4°C**. *Línea azul oscuro* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial

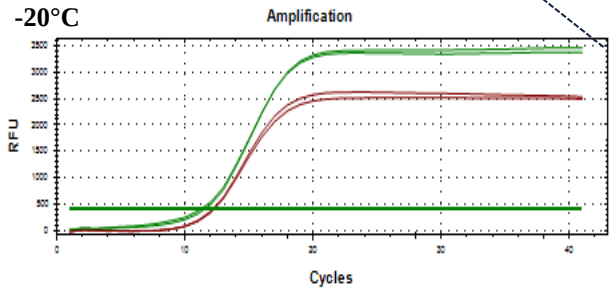


Figura 19b. Curva de amplificación L**ote III R1 -20°C**. *Línea roja* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial

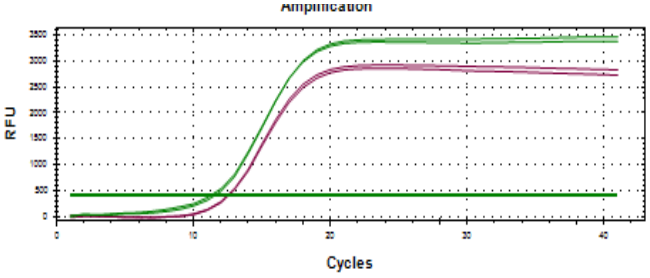


Figura 19c. Curva de amplificación **Lote III R2 4°C**. *Línea fuscia* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial

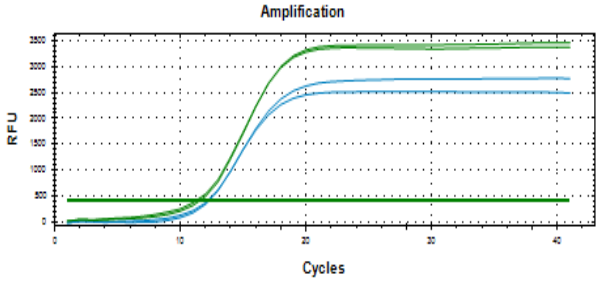


Figura 19d. Curva de amplificación **Lote III R2 -20°C**. *Línea azul claro* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial

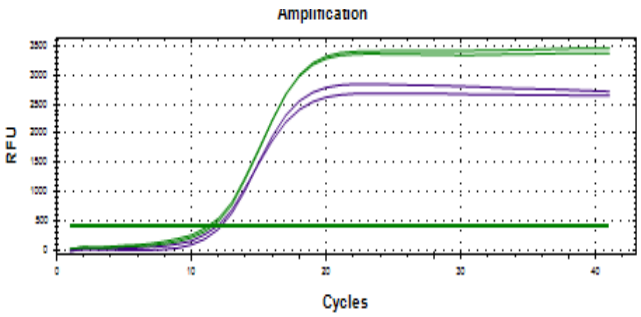


Figura 19e. Curva de amplificación **Lote III R3 4°C**. *Línea morada* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial

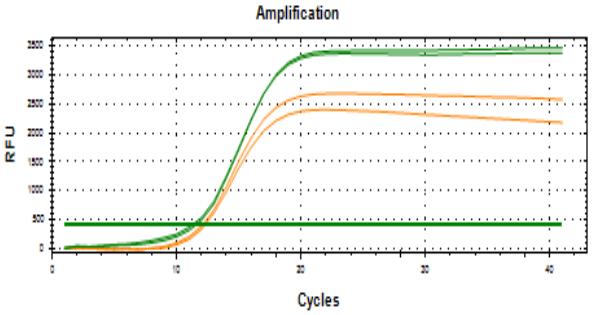
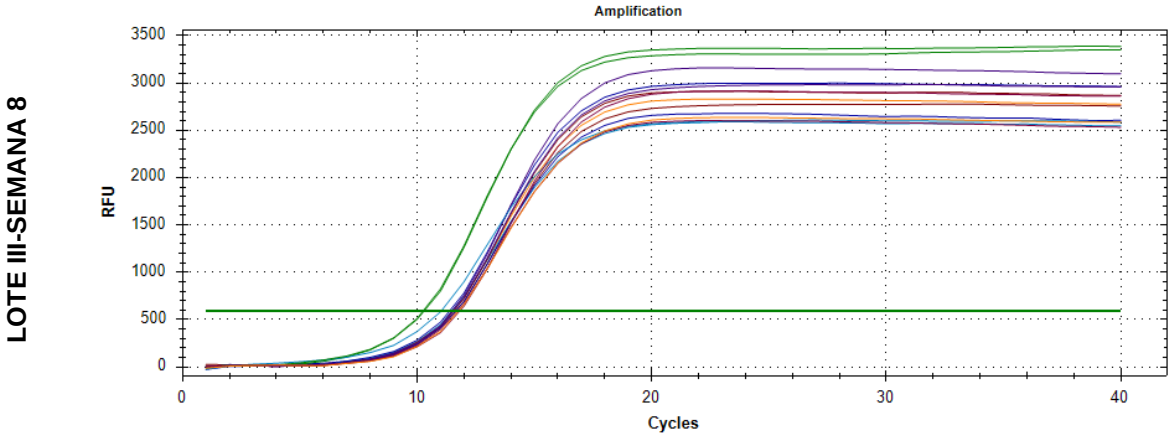


Figura 19f. Curva de amplificación **Lote III R3 -20°C**. *Línea naranja* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial



Anexo 3c-Figura 20. Ensayo de actividad biológica mediante RT-qPCR del **Lote III t_1= 8 semanas**. La *Línea verde* representa la M MLV-RT comercial New England BioLabs® vs la M MLV-RT recombinante almacenada a 4°C y -20°C (R1, R2 y R3 c/u)

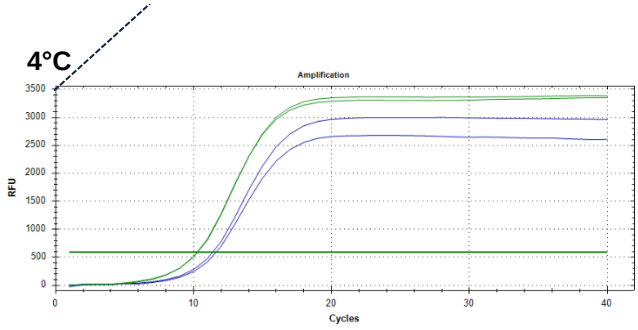


Figura 20a. Curva de amplificación **Lote III R1 4°C**. *Línea azul oscuro* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial

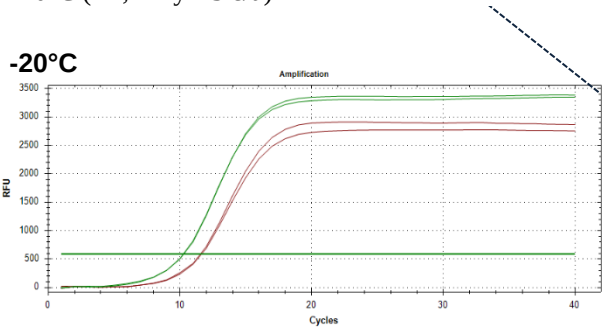


Figura 20b. Curva de amplificación L**ote III R1 -20°C**. *Línea roja* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial

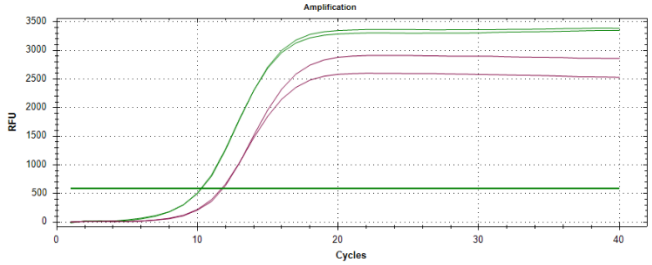


Figura 20c. Curva de amplificación **Lote III R2 4°C**. *Línea fucsia* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial

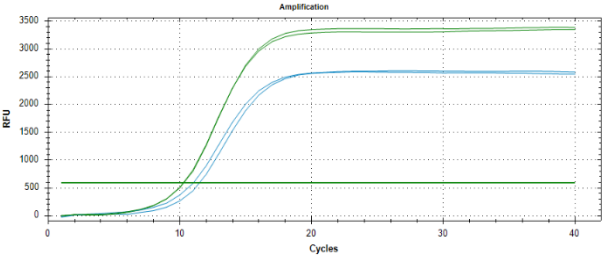


Figura 20d. Curva de amplificación **Lote III R2 -20°C**. *Línea azul claro* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial

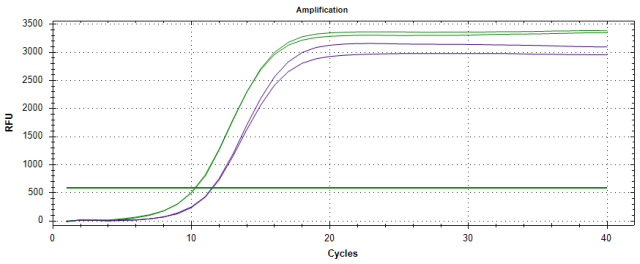


Figura 20e. Curva de amplificación **Lote III R3 4°C**. *Línea morada* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial

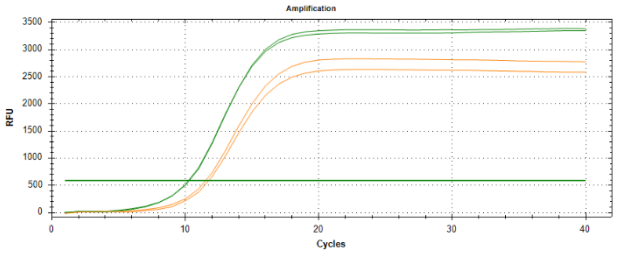


Figura 20f. Curva de amplificación **Lote III R3 -20°C**. *Línea naranja* representa M MLV-RT recombinante por duplicado vs línea verde que representa la M MLV-RT comercial