

PRODUCCIÓN, ESTABILIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA ENZIMA
RETROTRANSCRIPTASA RECOMBINANTE OBTENIDA A PARTIR DE
Escherichia coli BL21(DE3)

Presentado por:

Coy Gómez, Gabriela

Pérez Giraldo, Estefanía

UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE INGENIERÍA, DISEÑO Y CIENCIAS APLICADAS
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
CALI
2024

PRODUCCIÓN, ESTABILIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA ENZIMA
RETROTRANSCRIPTASA RECOMBINANTE OBTENIDA A PARTIR DE
Escherichia coli BL21(DE3)

Presentado por:

Coy Gómez, Gabriela

Pérez Giraldo, Estefanía

TRABAJO DE GRADO PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICA
FARMACÉUTICA

Tutor:

Steven Alexander David Jiménez, MSc

Tutor:

Álvaro Andrés Barrera Ocampo, PhD

UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE INGENIERÍA, DISEÑO Y CIENCIAS APLICADAS
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
CALI
2024

AVAL PARA LA ENTREGA DE PDG II

Firma del asesor



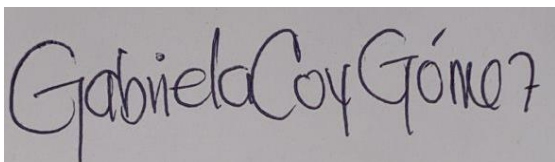
Asesor: Steven Alexander David Jiménez, MSc

Firma del co-asesor



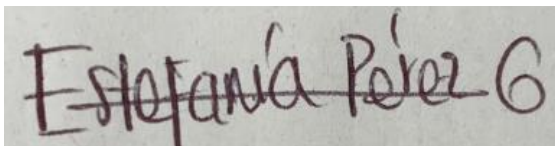
Co-asesor: Álvaro Barrera Ocampo, PhD

Firma estudiante 1



Estudiante: Gabriela Coy Gómez

Firma estudiante 2



Estudiante: Estefanía Pérez Giraldo

Tabla de contenido

2. INTRODUCCIÓN.....	5
3. METODOLOGIA.....	11
3.1 Producción de la enzima.....	11
3.1.1 Preparación de material y medios de cultivo.....	11
3.1.2 Pre-inoculo	12
3.1.3 Expresión de la enzima MMLV RT recombinante.....	12
3.1.4 Purificación de la enzima MMLV RT recombinante.....	12
3.1.5 Regeneración columna HisTrap TM FF 1 mL.....	13
3.2 Determinación de formulación	14
3.3 Evaluación de la estabilidad de la enzima.....	14
3.4 Atributos de calidad de la enzima.....	14
3.4.1 Actividad biológica.....	15
3.4.2 Identidad de la proteína	16
3.4.3 Cuantificación de la proteína.....	16
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
5. CONCLUSIONES.....	30
6. AGRADECIMIENTOS.....	30
7. REFERENCIAS:	31

1. RESUMEN

Las pruebas moleculares representan una herramienta clave en el diagnóstico de diversas enfermedades, particularmente las que son de origen infeccioso. Durante la pandemia, estas pruebas se convirtieron en el pilar del diagnóstico debido a su versatilidad, rapidez, especificidad y sensibilidad pues permitieron implementar tratamientos y cercos epidemiológicos oportunos. La técnica de RT-qPCR permitió la detección del virus SARS-CoV-2; sin embargo, la abrumadora demanda de estas pruebas generó un desabastecimiento de suministros críticos, en particular, la enzima MMVL-RT, esencial para ejecutar la técnica. Por ende, en respuesta a esta escasez y con el objetivo de asegurar un suministro local de la retrotranscriptasa, la Universidad Icesi ha propuesto una metodología integral para su obtención y almacenamiento. Esta metodología abarca la producción, estabilización y evaluación de la enzima RT recombinante obtenida *in-house* a partir de *Escherichia coli* BL21(DE3). La secuencia de trabajo comprende la expresión de la enzima MMLV-RT en bacterias *E. coli* BL21(DE3), seguido de su purificación mediante cromatografía de afinidad utilizando una cola de histidina. Además, la formulación de la enzima en un buffer de almacenamiento y la evaluación cualitativa de la actividad enzimática permitieron una valoración exhaustiva de los atributos de calidad de la enzima almacenada durante un mes. El resultado obtenido fue una enzima con alto grado de pureza, específica y funcional, conservando su actividad incluso después de un mes de almacenamiento a temperaturas de 4°C y -20°C.

Palabras claves: Retrotranscriptasa, Pruebas moleculares, Enzima, Diagnostico, RT-PCR, Enzima MMLV-RT

2. INTRODUCCIÓN

La pandemia causada por el virus SARS-CoV-2 (por sus siglas en inglés, Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2), generó un impacto a nivel de salud pública y de la economía global; según la Organización Mundial de la Salud (OMS), hasta el 30 de agosto de 2023, se han confirmado más de 770 millones de casos y más de 6 millones de muertes relacionadas¹. Asimismo, la crisis sanitaria tuvo un impacto en la fabricación y la cadena de suministro de reactivos, equipos y materiales utilizados en los laboratorios clínicos para las pruebas de diagnóstico molecular, como la PCR. En el caso de Colombia, el Instituto Nacional de Salud (INS) determinó que antes de la pandemia, en el país se realizaban alrededor de 7.000 pruebas de PCR al mes para detectar diversas infecciones, incluyendo influenza, tuberculosis, VIH, entre

otras; sin embargo, en el 2019 durante el pico de la pandemia se estimó un total de 1 millón de pruebas PCR al mes². Por otro lado, la escasez de guantes, tapabocas, pipetas, centrífugas, termocicladores, enzimas polimerasas y productos químicos, se agravó debido a los largos tiempos de entrega. Esto se debe a que, según el Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia, la capacidad de fabricación de suministros de laboratorio a nivel local es restringida, y la mayor parte de estos artículos se adquieren a través de importaciones de otros países³. Adicionalmente, la demanda de estos insumos se vio incrementada significativamente debido a la pandemia, lo que ha generado una mayor dependencia de las importaciones.

Las pruebas moleculares son una herramienta valiosa para diagnosticar diversas enfermedades, principalmente las de origen infeccioso⁴. Durante la pandemia, se convirtieron en las más utilizadas debido a su versatilidad, rapidez, especificidad y sensibilidad. La técnica de RT-qPCR, en particular, permitió detectar el virus del SARS-CoV-2; sin embargo, debido a la alta demanda de estas pruebas, hubo una falta de suministros, especialmente la enzima MMVL-RT (por sus siglas en inglés, Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase), que es esencial para realizar la técnica; además la MMVL-RT que se encuentra en el mercado es costosa, y no se ha logrado producir localmente. Por consiguiente, la producción de una polimerasa recombinante ofrecería a los centros de investigación y diagnóstico la posibilidad de contar con una enzima funcional, más económica y manteniendo una calidad similar al producto comercial, igual en rendimiento y acompañada de un protocolo de producción documentado.

Por lo tanto, con el fin de contribuir al desarrollo de capacidades y lograr una producción local de la enzima retrotranscriptasa, la Universidad Icesi consideró la posibilidad de fabricar esta enzima para su propio uso y, posiblemente, para su transferencia entre universidades y centros de investigación aliados, dado el papel fundamental de la enzima MMVL-RT en el diagnóstico clínico molecular. El proyecto se enfoca en estimar, para junio del año 2024, la producción, estabilización y evaluación de la enzima RT recombinante obtenida *in-house* a partir de *Escherichia coli* BL21(DE3). El objetivo principal es que en un futuro esta enzima esté disponible para su aplicación en investigaciones clínicas y en el diagnóstico clínico molecular. A partir de lo mencionado anteriormente, se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿Cómo se puede estabilizar en formulación la retrotranscriptasa recombinante para mantener sus propiedades biológicas y fisicoquímicas durante el almacenamiento?

Dado que hemos definido claramente el enfoque del proyecto resulta esencial comprender la

naturaleza y origen de la enzima MMLV-RT. En 1970, David Baltimore y Howard Temin hicieron el descubrimiento de la enzima retrotranscriptasa (RT) en retrovirus. Este nombre se deriva de la capacidad de estos virus para replicarse en células hospederas mediante la conversión de su genoma ARN a ADN. La retrotranscriptasa se encuentra presente en varios retrovirus, incluyendo el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV), el virus de la mieloblastosis aviar (AMV), entre otros¹⁰. Su capacidad para sintetizar ADN complementario (cADN) a partir de una molécula de ARN la convierte en una molécula central en la investigación molecular y la tecnología del ADN recombinante¹¹.

La retrotranscriptasa (RT), aunque similar a otras polimerasas de ADN, facilita la síntesis de ADN mediante un oligonucleótido, un ion metálico divalente y una mezcla de los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTP)⁸. Además, presenta actividad nativa de RNasa H, específicamente degradando la cadena de ARN molde. La iniciación de la síntesis de ADNc depende de la hibridación de un primer de ADN con el ARN, generalmente en la cola poli(A). En este proceso, el híbrido actúa como sitio de cebado para la polimerasa de la RT y como sustrato para la RNasa H de la RT. Esta dinámica crea una competencia entre ambas actividades, y la eficacia con que la RNasa H destruye el híbrido antes del inicio de la polimerización determina el número máximo de eventos de cebado que pueden ocurrir. Este fenómeno reduce el rendimiento de ADNc al eliminar una parte del mRNA de la reacción.

Considerando lo anterior y estudios que sugieren mejoras en la termoestabilidad y eficiencia de la RT mediante estrategias como mutagénesis dirigida al sitio, diseño racional y producción de enzimas recombinantes utilizando el sistema de expresión de *E. coli*, en 1985, la RT del MMLV fue clonada, sobreexpresada y purificada desde *Escherichia coli*, resultando en una MMLV-RT con actividad RNasa H reducida. Esta variante ofrece la ventaja de producir transcritos largos de alta calidad durante la amplificación de ADNc¹¹. La enzima MMLV RT recombinante cuenta con una longitud de 691 aminoácidos con un peso molecular de 76.9 kDa.

Ahora bien, es importante entender los fundamentos de las enzimas recombinantes. La tecnología de ADN recombinante ha revolucionado la producción de enzimas, permitiendo la inserción de genes específicos en el ADN del hospedero. Estrategias como la sobreexpresión de genes, el uso de promotores fuertes y la optimización de las condiciones de cultivo en *E.coli* BL21 (D3) son fundamentales para lograr una producción eficiente de la retrotranscriptasa recombinante. Los pasos teóricos para obtener una proteína recombinante son relativamente simples. En primer lugar, se elige un gen de interés y se clona dentro de un plásmido. Luego, este plásmido se introduce en

un hospedero apropiado, donde se activa la expresión de la proteína. Finalmente, el producto resultante se purifica del organismo huésped. Esta tecnología, aprovecha la maquinaria molecular del organismo para la síntesis de compuesto que, de otra manera, serían difíciles de producir mediante síntesis química. *E. coli* presenta múltiples beneficios, estos incluyen su capacidad para crecer en fuentes de carbono económicas, lograr una rápida acumulación de biomasa, permitir fermentaciones de alta densidad celular y simplificar el proceso de escalonamiento¹².

Existen diferentes cepas de *E. coli* en el mercado diseñadas para la producción de ciertos tipos de proteínas. Entre ellas, las cepas más utilizadas son *E. coli* BL21(DE3) y algunos derivados del linaje k-12. La cepa BL21 tiene unas características que la hacen una fábrica biológica de gran interés, entre ellas, carece de proteasas, la ausencia de estas en la cepa reduce la degradación de proteínas recombinantes que se expresan en ella¹³. Además, la cepa BL21(D3) cuenta con una modificación genética adicional mediante la inserción del profago λ DE3 en el cromosoma bacteriano, lo que permite una alta expresión de proteínas recombinantes bajo el control del promotor lac.

La estabilidad de las enzimas recombinantes es una consideración fundamental en una serie de aplicaciones biotecnológicas. A menudo, los sistemas enzimáticos son inherentemente inestables, y las enzimas pueden perder su actividad en respuesta a cambios relativamente leves en las condiciones ambientales, como las variaciones de temperatura y pH¹⁴. Sin embargo, asegurar un crecimiento celular óptimo y una producción eficiente de proteínas recombinantes no solo depende de controlar factores como la agitación, el pH, la presión de oxígeno y la temperatura, sino también de contar con un medio de cultivo celular y producción de proteínas adecuado que proporcione los nutrientes necesarios en cada etapa del proceso productivo¹⁵.

En este contexto, se han desarrollado varios enfoques para lograr la estabilización de la enzima¹⁶. Uno de los métodos más comunes implica la inmovilización de enzimas en una superficie sólida. Recientemente, se ha demostrado que la encapsulación de enzimas en liposomas o materiales poliméricos conduce a mejoras significativas en la estabilidad enzimática¹⁴. Además, existe la estrategia de diseñar sitios quelantes de metales que, al unirse con alta afinidad a sitios que satisfacen de manera óptima los requisitos de enlace del ion metálico cuando la proteína está en su estado plegado, el ion metálico cambia el equilibrio de plegado/desplegamiento para proporcionar una estabilidad significativa al estado plegado¹⁷. Los iones metálicos funcionan como cofactores de las enzimas y ayudan a mantener su estructura. La suplementación de iones

metálicos como Cu^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , aumentan la estabilidad de las enzimas¹⁸. Estos enfoques diversificados tienen como objetivo garantizar que las enzimas recombinantes sean más resistentes a las fluctuaciones ambientales y, en consecuencia, sean más efectivas en una variedad de aplicaciones biotecnológicas.

Para asegurar la estabilidad de la enzima, se realizó una formulación que tomará en cuenta criterios cruciales para la eficacia del buffer de almacenamiento, manteniendo la actividad enzimática. Entre las consideraciones clave se encuentran¹⁵

- pH estable: Seleccionar un pH adecuado según la estabilidad de la enzima, muchas enzimas se conservan bien a un pH neutro (7.0-7.5)
- Concentración de sales: Agregar sales (por ejemplo: fosfato, cloruro de sodio) para mantener una fuerza iónica que estabilice la enzima. Evitar concentraciones extremas que puedan afectar la actividad de la enzima.
- Agentes reductores: Incluir agentes como el dithiothreitol (DTT) o el 2-mercaptoetanol para prevenir la formación de puentes disulfuro indeseados.
- Estabilizadores de proteínas: Utilizar compuestos como glicerol o sacarosa para aumentar la estabilidad y prevenir la desnaturalización.
- Conservantes: Incorporar conservantes como azida sódica para prevenir el crecimiento bacteriano, especialmente si se almacena a temperaturas más altas.
- Temperaturas: Guardar las muestras a temperaturas adecuadas, generalmente a -20°C o incluso a -80°C para ralentizar la degradación.

Continuando con lo mencionado anteriormente, es fundamental considerar los atributos de calidad mediante los cuales se evaluó la actividad enzimática. En este contexto, se ha seguido la directriz de calidad Q1F, la cual aborda las pruebas de estabilidad de nuevos fármacos y productos en zonas climáticas III y IV, según los lineamientos establecidos por la OMS. En este caso, se optó por no tener en cuenta la directriz Q1A(R2) del Consejo Internacional para la Armonización de Requisitos Técnicos para Productos Farmacéuticos de Uso Humano (ICH). Esto se debe a que el Q1A(R2) establece condiciones de almacenamiento a largo plazo para los países de las zonas climáticas III/IV en $30^{\circ}\text{C}/65\%$ ²⁰ y, según lo estipulado en la resolución 3157 de 2018, la OMS ha clasificado a Colombia en la zona climática IVb, caracterizada como cálida/húmeda, con

condiciones de almacenamiento a una temperatura y humedad relativa de $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y $75\% \pm 5\%$, respectivamente²¹.

Un producto terminado debe someterse a evaluaciones en condiciones de almacenamiento que garanticen tanto su estabilidad térmica como su resistencia a la humedad. Estos estudios son esenciales para abordar las fases de almacenamiento y transporte del producto. En la Tabla 1, se han registrado las condiciones de almacenamiento natural y acelerado para un producto terminado²⁰.

Tabla 1. Condiciones para estudio de estabilidad

Estudio	Condición de almacenamiento	Periodo mínimo cubierto por los datos en el momento de la presentación
Largo plazo	$25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} - 60\% \pm 5\% \text{ HR}$ $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} - 65\% \pm 5\% \text{ HR}$ $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} - 75\% \pm 5\% \text{ HR}$	6 o 12 meses
Intermedio	$30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} - 65\% \pm 5\% \text{ HR}$	6 meses
Acelerado	$40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} - 75\% \pm 5\% \text{ HR}$	6 meses

Cuando se llevan a cabo estudios a largo plazo y se evidencia un cambio significativo en las pruebas de almacenamiento acelerado, se requiere la realización de pruebas adicionales en condiciones de almacenamiento intermedio. En este contexto, se evaluarán los criterios de cambio significativo, los cuales deben comprender un mínimo de datos recolectados durante seis meses dentro de un estudio de doce meses bajo condiciones de almacenamiento intermedio. En términos de cambio significativo, se considera que existe cuando:

- Hay una variación del 5% o más con respecto al contenido inicial de la API, detectado mediante ensayos, o la falta de cumplimiento de los criterios de aceptación de potencia al emplear procedimientos biológicos o inmunológicos.
- Se identifica cualquier producto de degradación que supere su criterio de aceptación.
- Hay incumplimiento de los criterios de aceptación en las pruebas de apariencia, atributos físicos y funcionalidad.

Cuando se hace referencia a la degradación, es pertinente llevar a cabo pruebas de estrés del API, las cuales son fundamentales para identificar productos de degradación. Estas pruebas, a su vez,

contribuyen a establecer las vías de degradación y la estabilidad intrínseca de la molécula, validando la capacidad indicativa de estabilidad de los procedimientos analíticos empleados. La naturaleza específica de las pruebas de estrés variará según el API individual y el tipo de Producto Farmacéutico Final (FPF) involucrado. Estas pruebas pueden realizarse en un solo lote de API e incluir el efecto de la temperatura en incrementos de 10°C, como, por ejemplo, a 50°C y 60°C, superando la temperatura utilizada en las pruebas aceleradas. Además, se debe considerar la exposición a la humedad, por ejemplo, al 75% de humedad relativa o niveles superiores, y, cuando sea pertinente, la oxidación y la fotólisis. Asimismo, las pruebas deben evaluar la susceptibilidad del API a la hidrólisis en un rango justificado de valores de pH cuando está en solución o suspensión. En el caso de no observarse productos de degradación después de 10 días, se considera que el API es estable bajo la condición de estrés particular. No obstante, es crucial justificar debidamente las condiciones de estrés empleadas en este contexto.

Asimismo, es relevante resaltar las amplias aplicaciones potenciales de la retrotranscriptasa recombinante, que abre la puerta a diversas áreas, desde la investigación básica, donde se utiliza para la síntesis de cADN en clonación molecular, hasta posibles aplicaciones terapéuticas en la terapia génica y la ingeniería genética de células.

En el ámbito diagnóstico, las pruebas clínicas moleculares desempeñan un papel crucial, especialmente en virología. Gracias a técnicas como la PCR, RT-PCR y qPCR, podemos determinar el tipo de virus responsable de la infección del paciente. Actualmente el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) emplea ensayos moleculares rápidos mediante RT-PCR para diagnosticar la influenza en menos de 15 minutos. Esto posibilita la administración rápida y efectiva de una terapia farmacológica específica¹⁹.

3. METODOLOGIA

3.1 Producción de la enzima

Se usó el protocolo mejorado y ajustado a las condiciones del laboratorio elaborado en un proyecto de grado previo titulado: *“Producción y purificación de la enzima recombinante MMLV RT a partir del plásmido pET 19b MMLV RT en bacterias E.coli BL21(DE3)”*

3.1.1 Preparación de material y medios de cultivo

Se emplearon dos pesas-sales, se pesaron 10 g de caldo LB en cada uno y se depositó el contenido

en dos frascos de 1 L respectivamente. Se re suspendió el medio con 500 mL de agua tipo 2 haciendo los lavados respectivos a los pesa-sales. En otro pesa-sales, se pesaron 5 g de caldo LB y se agregó el contenido a un frasco de 500 mL. Se re suspendió el medio con 250 mL de agua tipo 2 haciendo los lavados respectivos. Empleando doble capa de papel aluminio, una capa de papel Kraft y cinta de autoclave, se alistaron los medios preparados anteriormente, para autoclavar. En el autoclave, se verificó el nivel de agua y se inició el proceso.

3.1.2 Pre-inoculo

Se retiraron del ultracongelador las bacterias *E. coli* BL21(DE3) transformadas con el plásmido pET 19b MMLV RT. Se depositó el tubo eppendorf en un recipiente previamente llenado con hielo para su transporte. Se limpió la cabina de flujo laminar con etanol al 70% empleando una técnica aséptica. Posteriormente, se limpiaron los implementos para introducirlos dentro de la cabina de flujo laminar. Empleando la micropipeta de 100-1000, se agregaron 12 mL de caldo LB a dos tubos de ensayo respectivamente. Después, se marcaron los tubos de ensayo como “Preinoculo. Fecha. *E. coli* BL21(DE3) MMLV RT” y “Control (-)” respectivamente. Luego, se agregaron a ambos tubos 12 μ L de stock de ampicilina, asegurándose de mezclar bien. Por último, se agregaron 12 μ L de stock de bacterias *E. coli* BL21(DE3) transformadas, asegurándose de mezclar bien tanto el stock como el medio de cultivo. Se incubaron las bacterias toda la noche o hasta un máximo de 16 h en una incubadora con agitación a 37 °C y 225 rpm.

3.1.3 Expresión de la enzima MMLV RT recombinante

Empleando la probeta, se midieron 250 mL de caldo LB y se agregaron a cada Erlenmeyer de 1 L respectivamente. Posteriormente, empleando una micropipeta de 100-1000 μ L, se agregaron 250 μ L de stock de ampicilina a 100 mg/mL a cada Erlenmeyer respectivamente, con el fin de obtener una concentración final de 100 μ g/mL. Finalmente, usando la micropipeta de 100-1000 μ L, se agregaron 2.5 mL de preinóculo a cada Erlenmeyer respectivamente. Se incubaron los cuatro Erlenmeyers en una incubadora con agitación a 37 °C y 225 rpm por alrededor de 3 horas o hasta alcanzar un *OD*₆₀₀ de 0.8.

3.1.4 Purificación de la enzima MMLV RT recombinante

Se encendió el equipo ÄKTA pure y se ajustó conforme al manual para dejarlo listo para realizar la corrida de purificación, lo cual implicó los siguientes pasos: (i) el acople de la columna HisTrap 1 mL; (ii) el armado y acople del superloop de 10 mL; (iii) la purga de las líneas A y B con los buffers de purificación A y B, y (iv) el equilibrio de la columna. Empleando una jeringa de 10 mL, se tomaron 5 mL de fase soluble o sobrenadante. Después, utilizando un filtro de 0.22 µm, se filtró la muestra sobre un tubo Falcon de 15 mL. Se configuró el equipo ÄKTA pure para la inyección de la muestra y, empleando la misma jeringa, se inyectó la muestra por el puerto de inyección. Con la muestra inyectada dentro del equipo, se abrió el método titulado “PURIFICACION MMLV RT JCRA ISOCRATICO” y se corrió el método. Después de que finalizó la corrida, se verificó que se observara un pico correspondiente a la elución de la MMLV RT recombinante durante el paso de elución con un área bajo la curva aproximadamente de 16.90 en la fracción 7. Se identificó el tubo correspondiente a la elución de la proteína y se repitió este proceso dos veces más. En cada repetición, se inyectaron 5 mL adicionales de fase soluble para lograr un total de tres purificaciones. Luego, se combinaron las tres fracciones purificadas en un tubo de 15 mL. Para el proceso de concentración, se tomó un Amicon de 15 mL, se agregaron los 13.5 mL de enzima MMLV RT purificada al tubo y se centrifugó a 6000 g por 15 minutos a 10°C utilizando el rotor de ángulo fijo. Se tomó cuidadosamente con una micropipeta de 100-1000 µL el volumen remanente en la parte superior del tubo. Después de esto, por cada 100 µL de muestra de MMLV RT recombinante concentrada, se agregaron 200 µL de buffer de almacenamiento.

3.1.5 Regeneración columna HisTrap™ FF 1 mL

Fue crucial tener presente que la regeneración de la columna debía llevarse a cabo cada vez que se iniciaba una nueva producción de la enzima o cuando la columna había estado almacenada durante un período prolongado y estaba seca. Para este procedimiento, fue necesario conectar la columna al equipo ÄKTA pure y eliminar las burbujas de las bombas. Fue importante tener preparadas y filtradas las soluciones antes de iniciar la regeneración.

Entre cada paso de lavado, fue fundamental esperar a que la línea de UV se estabilizara antes de proceder con el siguiente lavado. El orden de adición de las soluciones fue el siguiente:

1. Lavar la columna con buffer de regeneración (8M urea, 0.2M ácido acético).
2. Lavar la columna con agua tipo II.

3. Lavar la columna con SDS al 2%.
4. Lavar la columna con etanol al 70%.
5. Lavar la columna con agua tipo II.
6. Lavar la columna con EDTA 100 mM pH 8.0.
7. Lavar la columna con agua tipo II.
8. Recargar la columna con solución de NiSO₄ 100 mM.

3.2 Determinación de formulación

Para la formulación se consideraron los criterios mencionados en el marco teórico. Se llevó a cabo la evaluación de un buffer de almacenamiento, el cual le otorgó a la enzima estabilidad, para realizar el buffer se tuvo en cuenta la literatura, el buffer utilizado fue el siguiente:

Tabla 2. Buffer de almacenamiento

Buffer de almacenamiento	
Excipiente	Cantidad
Tris-HCl	50mM
NaCl	150mM
DTT	1mM
EDTA	0.1mM
Glicerol	50%
NP-40	0.1%
pH: 7.6 a 25°C	

3.3 Evaluación de la estabilidad de la enzima

En esta instancia, se llevó a cabo pruebas de estabilidad a dos lotes de enzima durante un período de 1 mes, los recipientes utilizados fueron tubos de 1.5 mL. Dichas pruebas comprendieron evaluaciones tanto en condiciones naturales como aceleradas. En la Tabla 3, se han detallado las temperaturas y los tiempos específicos asociados a cada una de estas pruebas.

Tabla 3. Condiciones para evaluar de la estabilidad de la enzima

Estudio	Condición de almacenamiento	Periodo de tiempo	Muestras
Natural	-20 °C ± 2°C / 75% ± 5% HR	1 mes	Mínimo 2
Acelerado	4 °C ± 2°C / 75% ± 5% HR	1 mes	Mínimo 2

3.4 Atributos de calidad de la enzima

Los atributos de calidad de la enzima se realizaron mediante pruebas antes y después de su almacenamiento, para determinar la eficacia de la enzima en el buffer a diferentes condiciones. Las pruebas realizadas fueron:

3.4.1 Actividad biológica

Para este ensayo cualitativo se realizó una RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, por sus siglas en inglés) y una qPCR (Quantitative polymerase chain reaction, por sus siglas en inglés), que permitió evaluar la función retrotranscriptasa de la polimerasa. Para realizar este análisis se extrajo ARN viral (DENV-2), y se tomaron 500uL de sobrenadante de virus de paciente, teniendo en cuenta el protocolo “Extracción ARN viral (DENV-2) con trizol”. En primer lugar, se sintetizó el ADN complementario (cDNA) mediante una RT-PCR con el uso de la enzima MMLV-RT Reverse Transcriptase recombinante. Para la preparación de la amplificación, se utilizaron los reactivos detallados en la tabla 3. En la tabla 4 se muestran los reactivos necesarios para preparar los 4 mix con 0.5 μ L de la enzima MMLV-RT para cada lote evaluado, a la concentración indicada. Las cantidades especificadas están ajustadas para obtener un volumen final de 20 μ L por muestra. El perfil térmico consistió en lo expuesto en la tabla 5.

Tabla 4. Reactivos utilizados para la síntesis de cDNA con MMLV Reverse Transcriptase 0.5uL enzima producida

Síntesis de cDNA con MMLV Reverse Transcriptase 1uL E. Comercial		
REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN (μ L)
Primer Reverse (50 μ M)	5 μ M	6
dNTPs 10mM	0,5 mM	3
buffer 10X MMLV	1X	6
Enzima MMLV-RT (200 U/ μ L)	10 U/ μ L	3
Agua DEPC		12
RNA DENV-2		
Volumen final		30
Número de muestras	3	

Tabla 5. Termoperfil para síntesis de de cDNA con MMLV Reverse Transcriptase

TERMOPERFIL	
TEMPERATURA	TIEMPO
25°C	5 minutos
42°C	60 minutos
65°C	20 minutos
4°C	INFINITO

Para la amplificación por qPCR y cuantificación absoluta con el reactivo Luna Universal, se

preparó el mix de qPCR siguiendo las indicaciones de la tabla 7 en una cabina de flujo laminar limpia. Cada muestra debía tener un volumen final de 10 μ L. Se añadió el mix a las tiras blancas de tubos de qPCR de 200 μ L. En otro espacio diferente, se adicionaron las muestras correspondientes. En el equipo BioRad CFX96 Touch Real Time PCR disponer las muestras de acuerdo con el diseño de plato deseado y el perfil térmico previamente programado.

Tabla 6. Reactivos utilizados para Luna universal qPCR

Protocolo qPCR con Luna universal qPCR		
REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN (UI)
Luna universal qPCR master mix	1X	100
Primer forward (10uM)	0,25 uM	5
Primer reverse (10 uM)	0,25 uM	5
Agua DEPC		70
Dilución	<100 ng	
Numero de muestras	20	

3.4.2 Identidad de la proteína

Cada paso del proceso de expresión y purificación de la enzima fue verificado con la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). Inicialmente, los geles se prepararon al 5% stacking y 10% running. Luego, se prepararon las muestras de la siguiente manera: se tomaron directamente 20 μ L y se adicionaron 20 μ L de buffer de carga (Cat. No. 1610739, Bio Rad); Posteriormente, las muestras se calentaron en una plancha a 95 °C durante 5 min y se centrifugaron a 13000 rpm por 1 min. Después, se cargaron 15 μ L de cada muestra en los pozos del gel y la electroforesis se corrió a 90 V durante ~ 2h y 10 min. Finalmente, los geles fueron revelados con azul de Coomassie y visualizados en el analizador de geles. Se evaluó que las bandas obtenidas correspondieran al peso molecular 76.9 kDa de la proteína, de acuerdo con lo predicho a partir de la secuencia de aminoácidos.

3.4.3 Cuantificación de la proteína

El ensayo de cuantificación de la proteína se realizó mediante el método Bradford, en el lector de platos, usando una placa de 96 pozos. Con este ensayo es posible analizar rápidamente múltiples muestras de proteínas. Se necesita el reactivo Bradford a temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos. Se agregó 250 uL de Bradford a cada pozo y agregar 5 uL de los estándares de proteína de BSA desde 0.2 mg/mL-1.2 mg/mL. Finalmente, se agregó 5 uL de

muestra de la MMLV-RT, se mezcló por aproximadamente 30 segundos y se midió la absorbancia a 595 nm. El complejo proteico-tinte es estable hasta 60 min. Abrir en el equipo el protocolo "Cuantificación RT Bradford EPG;GCG" para leer las muestras. Se trazó la absorbancia frente a la concentración de proteína de cada estándar y se determinó la concentración de las muestras de la MMLV-RT comparando los valores netos con la curva estándar.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La producción de la enzima se llevó a cabo siguiendo el procedimiento titulado "Producción y purificación de la enzima recombinante MMLV RT a partir del plásmido pET 19b MMLV RT en bacterias *E.coli* BL21(DE3)". Para mejorar el proceso de purificación, se decidió emplear dos volúmenes del lisado clarificado cada uno de 4.5 mL, con el objetivo de aumentar el rendimiento de la proteína. La columna utilizada en el equipo ÄKTA pure fue la HisTrap™ FF 1 mL. Esta columna está diseñada para optimizar purificaciones de proteínas marcadas con histidina, ya que contiene una resina con níquel que le confiere afinidad por la histidina. Esta propiedad permite que las proteínas se unan selectivamente a la columna, facilitando su purificación. Posteriormente, se procedió a identificar la proteína mediante un gel SDS-PAGE, como se muestra en la imagen 1, donde se comparó la intensidad de la banda de la proteína de interés en la fase soluble entre el uso de dos volúmenes de lisado y solo uno.

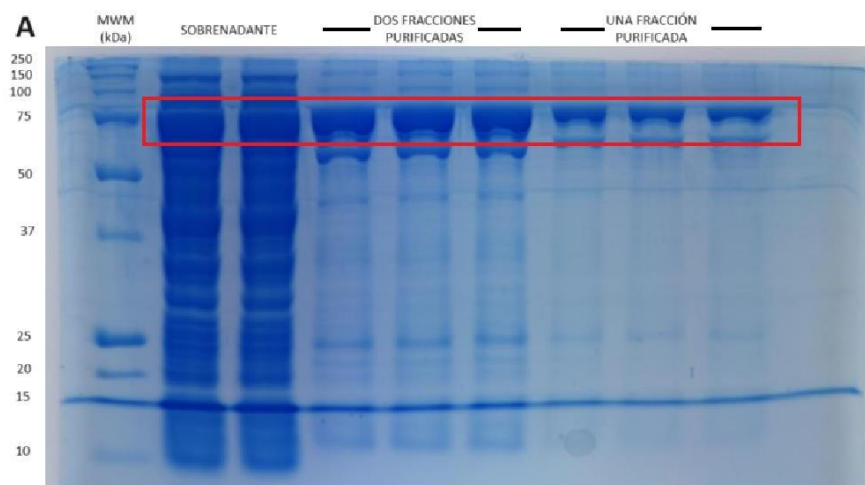


Imagen 1. Determinación de la expresión de la enzima recombinante MMLV RT. Geles de electroforesis SDS-PAGE resultantes del ensayo para la determinación de la expresión y optimización del proceso de purificación. A. De izquierda a derecha se encuentra el marcador de peso molecular (MWM), luego la muestra del sobrenadante sin purificar dos replicas, posteriormente tres réplicas de muestra concentrada de dos fracciones de purificado, finalmente tres réplicas de muestra concentrada de una fracción de purificado.

Debido a que fue posible identificar que las bandas se encontraban aproximadamente a la altura de la banda de 75kDa del marcador de peso molecular y teniendo en cuenta que la proteína pesa

aproximadamente 76.9kDa, se puede establecer que esta corresponde a la MMLV-RT (Figura 1). Sin embargo, para confirmar completamente la identificación de esta proteína, sería recomendable realizar un Western Blot adicional utilizando un anticuerpo específico para la MMLV-RT. Esto permitiría no solo confirmar la identidad de la proteína detectada, sino también cuantificar su cantidad en la muestra, lo que puede ser crucial para estudios comparativos o de expresión de proteínas. Adicional a esto, se procedió con la cuantificación utilizando el método de Bradford, una técnica colorimétrica empleada para este fin, para este ensayo se utilizó una curva estándar de albumina de suero bovino (BSA). Al unir dos volúmenes de lisado clarificado en lugar de utilizar solo uno, se logró un mayor rendimiento, como se observa en los siguientes resultados:

Tabla 8. Resultados de la cuantificación por Bradford de la enzima recombinante MMLV-RT. En color verde, se observa la concentración de enzima (mg/ml) y en color naranja se observa proteína RT total (mg).

Muestras	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs Prome	Densitometria	Enzima (mg/ml)	Vol total (ml)	Proteína total (mg)
Sobrenadante	0,852	0,829	0,858	0,846	29,25	1,157		
Purificado 2F	0,753	0,773	0,723	0,750	75,487	0,810	0,75	0,608
Purificado 1F	0,584	0,617	0,566	0,589	65,073	0,434	0,75	0,325

Considerando los resultados obtenidos, se puede afirmar que la combinación de dos volúmenes de lisado clarificado aumenta significativamente el rendimiento de proteína. Se logró obtener un total de 0.608 mg de proteína al unir dos fracciones, en contraste con los 0.325 mg obtenidos al utilizar solo un volumen.

El rendimiento de la purificación depende en gran medida de la efectividad de las columnas utilizadas en el proceso. Las columnas tienen una capacidad limitada para retener y separar los compuestos de interés. Si no se regeneran adecuadamente, pueden acumular residuos y contaminantes de purificaciones previas, lo que reduce su capacidad de separación y, en consecuencia, el rendimiento del proceso. La regeneración de las columnas es un paso crítico para asegurar que estén en condiciones óptimas para cada ciclo de purificación. Este proceso elimina los residuos acumulados y restablece la capacidad máxima de las columnas, permitiendo que funcionen de manera eficiente y consistente. Sin una regeneración adecuada, se corre el riesgo de obtener resultados inconsistentes, disminuyendo la calidad y cantidad del producto purificado. Además, la regeneración regular prolonga la vida útil de las columnas. Este mantenimiento preventivo asegura que las columnas mantengan su rendimiento óptimo, evitando la necesidad de reemplazos frecuentes y costosos. Por lo tanto, para garantizar la máxima eficiencia y calidad en el proceso de purificación, es esencial seguir estrictamente el procedimiento de regeneración

detallado en la metodología. Esto no solo optimiza el rendimiento de cada ciclo de purificación, sino que también contribuye a la sostenibilidad y economía del proceso en su conjunto.

Por otra parte, se prepararon dos lotes de enzima MMLV-RT recombinante, cada lote contó con duplicados para almacenar a 4°C y a -20°C, que fueron formulados con buffer de almacenamiento, descrito en la metodología. Los cuatro tubos del primer lote llevaban 75 uL de enzima y 150 uL de buffer de almacenamiento, por el contrario, los cuatro eppendorf del segundo lote llevaban 78 uL de enzima y 156 uL de buffer de almacenamiento. Los atributos de calidad fueron evaluados tanto en el momento cero como después de un mes de almacenamiento, para estudiar el efecto de la temperatura en el almacenamiento de la enzima e identificar sus condiciones de almacenamiento y la vida útil. A continuación, se detallan las evaluaciones realizadas en el momento cero, en la imagen 2, se muestran los gels de SDS-PAGE de los dos lotes.

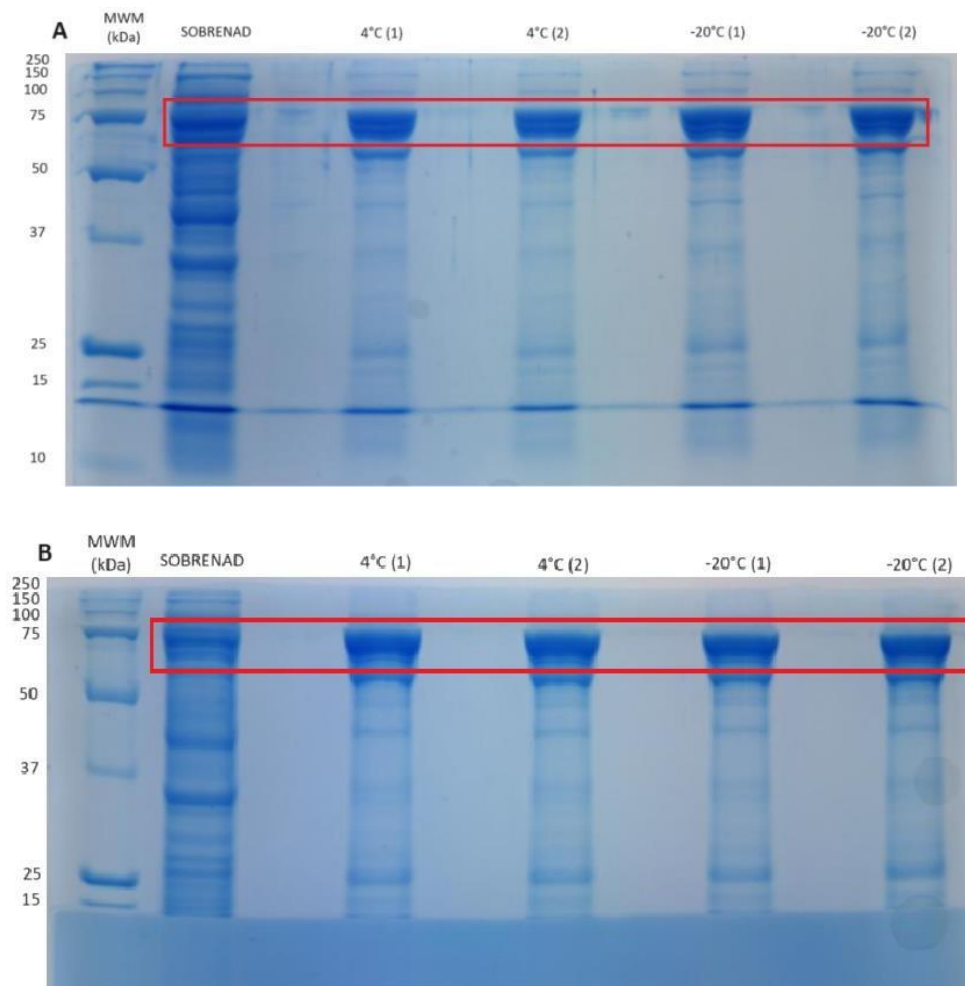


Imagen 2. Identidad de la enzima recombinante MMLV-RT. Gel de electroforesis SDS-PAGE resultantes a tiempo cero de almacenamiento. De izquierda a derecha se encuentra el marcador de peso molecular (MWM), luego la muestra del sobrenadante sin purificar una réplica, posteriormente las dos muestras que fueron almacenadas a 4°C y las dos muestras que fueron almacenadas a -20°C. **A.** Lote 1. **B.** Lote 2

Tabla 9. Resultados de la cuantificación por Bradford de la enzima recombinante MMLV-RT a tiempo cero de almacenamiento del lote 1. En color verde, se observa la concentración de enzima (mg/ml) y en color naranja se observa proteína RT total (mg).

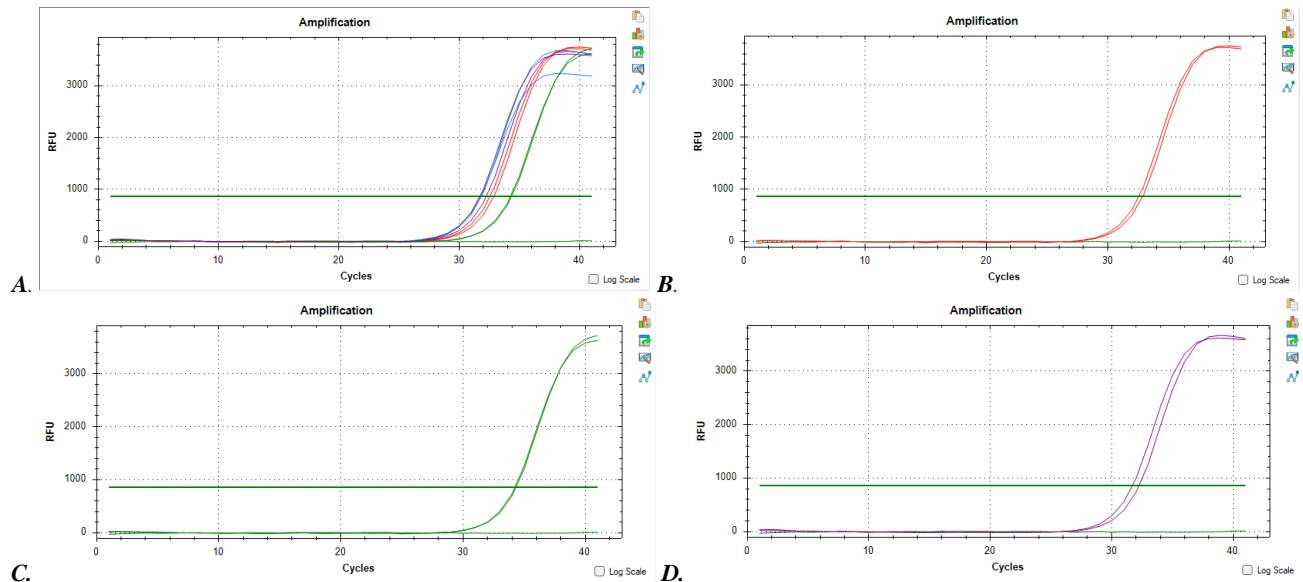
Muestras	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs Promedio	Densitometria	Enzima (mg/ml)	Vol total (ml)	Proteina total (mg)
(1) 4°C	0,528	0,515	0,525	0,523	74,510	0,372	0,225	0,084
(2) 4°C	0,519	0,542	0,535	0,532	74,510	0,389	0,225	0,088
(1) -20°C	0,561	0,516	0,514	0,530	74,510	0,386	0,225	0,087
(2) -20°C	0,554	0,56	0,567	0,560	74,510	0,443	0,225	0,100

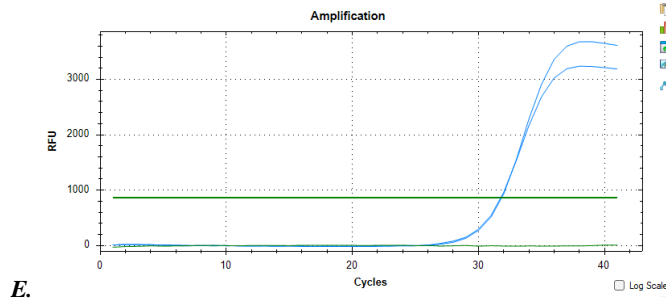
Tabla 10. Resultados de la cuantificación por Bradford de la enzima recombinante MMLV-RT a tiempo cero de almacenamiento del lote 2. En color verde, se observa la concentración de enzima (mg/ml) y en color naranja se observa proteína RT total (mg).

Muestras	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs Promedio	Densitometria	Enzima (mg/ml)	Vol total (ml)	Proteina total (mg)
(1) 4°C	0,472	0,476	0,505	0,484	72,630	0,292	0,234	0,068
(2) 4°C	0,467	0,48	0,503	0,483	72,630	0,290	0,234	0,068
(1) -20°C	0,488	0,486	0,517	0,497	72,630	0,315	0,234	0,074
(2) -20°C	0,483	0,48	0,509	0,491	72,630	0,303	0,234	0,071

Tabla 11. Cuantificación de la extracción de ARN para los ensayos de actividad biológica de los lotes 1 y 2 a tiempo cero.

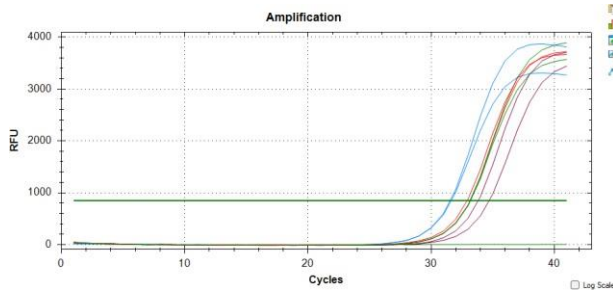
Muestras DENV-2 PTE	Lote 1	Lote 2
	ng/uL	ng/uL
ARN 4°C (1)	14,562	69,229
ARN 4°C (2)	35,726	60,93
ARN -20°C (1)	19,455	43,956
ARN -20°C (2)	19,297	354,947



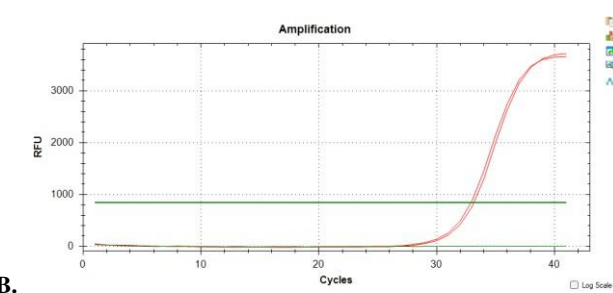


E.

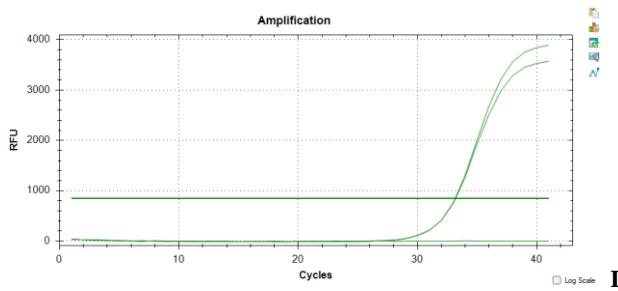
Imagen 3. Resultado de RT-qPCR. Ensayo de actividad biológica de la enzima MMLV-RT Lote 1 a tiempo cero. **A.** Todas las muestras de RT. Amplificadas. **B.** Muestra 4°C (1) con su duplicado (Rojo). **C.** Muestra 4°C (2) con su duplicado (Verde). **D.** Muestra -20°C (1) con su duplicado (Morado). **E.** Muestra -20°C (2) con su duplicado (Azul).



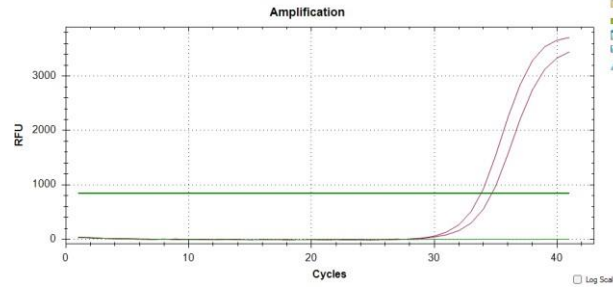
A.



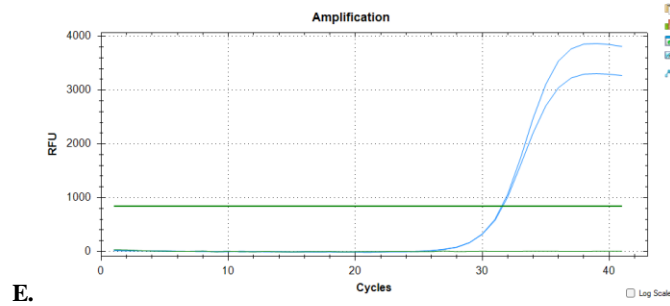
B.



C.



D.



E.

Imagen 4. Resultado de RT-qPCR. Ensayo de actividad biológica de la enzima MMLV-RT Lote 2 a tiempo cero. **A.** Todas las muestras de RT. Amplificadas. **B.** Muestra 4°C (1) con su duplicado (Rojo). **C.** Muestra 4°C (2) con su duplicado (Verde). **D.** Muestra -20°C (1) con su duplicado (Morado). **E.** Muestra -20°C (2) con su duplicado (Azul).

Tabla 12. Ciclo umbral (Cq) RT-qPCR Ensayo de actividad biológica de la enzima MMLV-RT Lote 1 y 2 a tiempo cero.

Muestras DENV-2	Lote 1		Lote 2	
	Cq		Cq	
ADNc 4°C (1)	32,86	32,53	32,91	33,15

ADNc 4°C (2)	34,25	34,33	33,15	33,18
ADNc -20°C (1)	31,69	32,24	33,81	34,69
ADNc -20°C (2)	31,76	31,83	31,61	31,53

En los geles de SDS-PAGE de ambos lotes se obtuvo una MMLV RT de alta pureza con una masa molecular de 76.9 kDa, de acuerdo con lo predicho a partir de la secuencia de aminoácidos, además se puede observar el ancho de la banda que se debe a la unión de los tres volúmenes de lisado clarificado. Después de esto, se cuantificó la proteína utilizando el método de Bradford, y los resultados muestran concentraciones variables de proteína en las muestras analizadas, esto puede deberse a las dificultades de purificar con una columna de 1 mL que puede saturarse lo que puede ocasionar pérdidas y no reflejar un aumento en la cantidad de proteína esperada. Se empleó una curva de calibración generada a partir de estándares de concentraciones conocidas de BSA con absorbancias medidas a una longitud de onda 595nm.

La curva de BSA es esencial en la cuantificación por el método de Bradford cuando se necesita una referencia precisa de proteína para calibrar los resultados. Si no se dispone de la proteína específica que se está analizando, BSA se convierte en una elección fundamental como estándar relativo. Se utiliza especialmente en casos donde la muestra contiene predominantemente albúmina o cuando se espera que la proteína en análisis reaccione de manera similar al colorante de Bradford. La curva de BSA permite establecer una relación entre la concentración de proteína y la intensidad del color, lo que facilita la cuantificación precisa de proteínas desconocidas en muestras. Esto asegura resultados confiables y reproducibles en el análisis cuantitativo de proteínas por el método de Bradford²².

Con base en la curva de calibración, se calcularon las concentraciones de proteína para las muestras desconocidas. Los resultados muestran que en el lote 1 (ver tabla 9), se obtuvieron concentraciones más altas en cada una de las réplicas realizadas, lo que sugiere una alta cantidad de enzima presente. En contraste, en el lote 2 (ver tabla 10), se encontraron valores menores en la cuantificación que en el lote 1. Alternativamente, es posible que, durante el proceso de purificación, las columnas de níquel *HisTrapTM FF 1 mL* ya estuvieran desgastadas debido al uso prolongado o saturadas por las grandes cantidades de muestra, es importante destacar que se llevaron a cabo regeneraciones periódicas para optimizar su rendimiento y prolongar su vida útil. Sin embargo, aunque se obtuvieron valores menores, estos son indicativos de una alta presencia de la RT. La reproducibilidad de los resultados se evaluó mediante réplicas de las muestras, y se encontró una

desviación estándar de 0.269 y un coeficiente de determinación (R^2) de 0.9922 entre los valores calculados para cada muestra, lo que indica una alta precisión en las mediciones

Durante el proceso experimental, se llevó a cabo la evaluación del kit EnzCheck RT (Invitrogen) como herramienta para la medición de la actividad cuantitativa enzimática de la RT expresado en unidades internacionales de actividad (UI). Sin embargo, los resultados obtenidos no alcanzaron los niveles de satisfacción esperados. Se observaron diversas variaciones en los resultados, lo que planteó interrogantes sobre la eficacia del kit. Tras un análisis exhaustivo, se identificó que una posible causa de estas variaciones podría ser la antigüedad del kit utilizado en las pruebas experimentales. Asimismo, sería pertinente evaluar la funcionalidad del PicoGreen utilizado, ya que no se empleó el original del kit, sino uno disponible en el laboratorio. Dado que el PicoGreen es uno de los componentes más cruciales del kit EnzCheck RT (Invitrogen), su desempeño es fundamental para la precisión y confiabilidad de los resultados. El PicoGreen es esencial porque proporciona alta sensibilidad y especificidad en la cuantificación de ácidos nucleicos, permitiendo detectar concentraciones extremadamente bajas con gran precisión. Por lo tanto, cualquier variación en su calidad o funcionalidad podría afectar significativamente los resultados obtenidos en los experimentos, como fue el caso en esta ocasión.

A raíz de estos resultados insatisfactorios, se decidió explorar alternativas para validar la actividad enzimática de la RT, pero, en este caso, con una prueba cualitativa. Se optó por emplear la RT-qPCR, en la cual la enzima en cuestión desempeña un papel crucial en la amplificación de un gen específico, previo a esto se realizó una RT-PCR para generar cDNA del gen de interés, de esta manera se observa la capacidad de la enzima para producir cDNA que luego se amplificará a DNA de doble cadena con la qPCR, al final, la actividad biológica de la enzima se confirma de forma indirecta. En el primer paso, la extracción de ARN de dengue tipo 2 fue exitosa, aunque variable obteniendo los resultados de la tabla 11. Además, tanto en el lote 1 como en el lote 2 a tiempo cero, el ARN viral se transcribió inversamente con éxito en cADN mediante la MMLV-RT recombinante producida. En la imagen 3 y 4 se puede observar que ambos lotes de RT recombinante evidenció que podía usarse en la amplificación por PCR.

La qPCR ha surgido como la técnica preferida en el diagnóstico molecular, gracias a su elevada sensibilidad y su capacidad para cuantificar de manera absoluta o relativa la cantidad de material inicial en las pruebas de RT-PCR²³. Esta metodología, que combina el PCR convencional con fluoróforos, permite la detección y amplificación del genoma viral en un solo paso. La intensidad

de fluorescencia generada es directamente proporcional a la concentración de ADN o ARN en la muestra, facilitando así la evaluación precisa de la carga viral²⁴.

Por otro lado, observando la literatura, comparando los estudios del dengue mediante RT-qPCR, se observó una gran diferencia entre los ciclos de amplificación reportados y los obtenidos en el laboratorio. Generalmente, en la literatura se evidencia que el dengue tipo 2 inicia su amplificación desde el ciclo 8-10, mientras que, en el experimento realizado, la amplificación más temprana se observó entre los ciclos 28-30. Esta diferencia es notable, pero no afecta el estudio, ya que esto depende de la agresividad o fortaleza del virus²⁵. La agresividad del virus se refiere a su capacidad para replicarse y causar daño en el organismo huésped. Un virus altamente agresivo se replicará rápidamente y en mayor cantidad, lo que puede resultar en una detección más temprana en los ciclos de amplificación de RT-qPCR. Por el contrario, la fortaleza del virus se relaciona con su capacidad para sobrevivir y mantener su viabilidad en diversas condiciones ambientales y biológicas. Un virus fuerte puede persistir más tiempo en el organismo y resistir condiciones adversas, aunque esto no necesariamente implica una rápida replicación inicial. Factores como las condiciones del almacenamiento de las muestras, la fase de la infección en la que se recogieron las muestras y las variaciones en los protocolos de laboratorio pueden influir en la detección del virus mediante RT-qPCR.²⁵

A pesar de la diferencia en los ciclos de amplificación, el gen tipo C de la nucleocápside del DENV-2 se amplificó correctamente, lo que demuestra la efectividad y el efecto satisfactorio de la enzima retrotranscriptasa. Esta observación subraya la importancia de considerar las variaciones en la agresividad viral al interpretar los resultados de amplificación, sin comprometer la validez del estudio en cuestión.

La comparación significativa se realizó con la enzima retrotranscriptasa comercial MMLV. Así como se hicieron los estudios con la enzima experimental, también se llevaron a cabo con la comercial. Sin embargo, el resultado no fue nada satisfactorio, ya que esta enzima comercial no amplificó el gen tipo C de la nucleocápside del DENV-2. Este resultado es desconcertante y puede deberse a varias razones. Una posible explicación es que la enzima comercial MMLV no estuviera en óptimas condiciones, lo que afectaría su capacidad para retrotranscribir y producir el ADNc del gen de interés. Otra posibilidad es que el lote específico de la enzima estuviera defectuoso, algo que puede ocurrir ocasionalmente con productos comerciales. Aunque todas las pruebas se realizaron simultáneamente y bajo las mismas condiciones, la enzima retrotranscriptasa comercial

no logró amplificar el gen del DENV-2, mientras que la enzima experimental sí lo hizo. Sin embargo, estos contratiempos no desvirtúan el hallazgo principal del estudio, que demuestra la efectividad de la enzima experimental en la amplificación del gen viral.

Después de un período de incubación de un mes, los lotes fueron retirados y sometidos a evaluaciones de calidad correspondientes para determinar su estabilidad. A continuación, se presentan los resultados obtenidos, en la imagen 3 se muestran los geles de SDS-PAGE de los dos lotes.

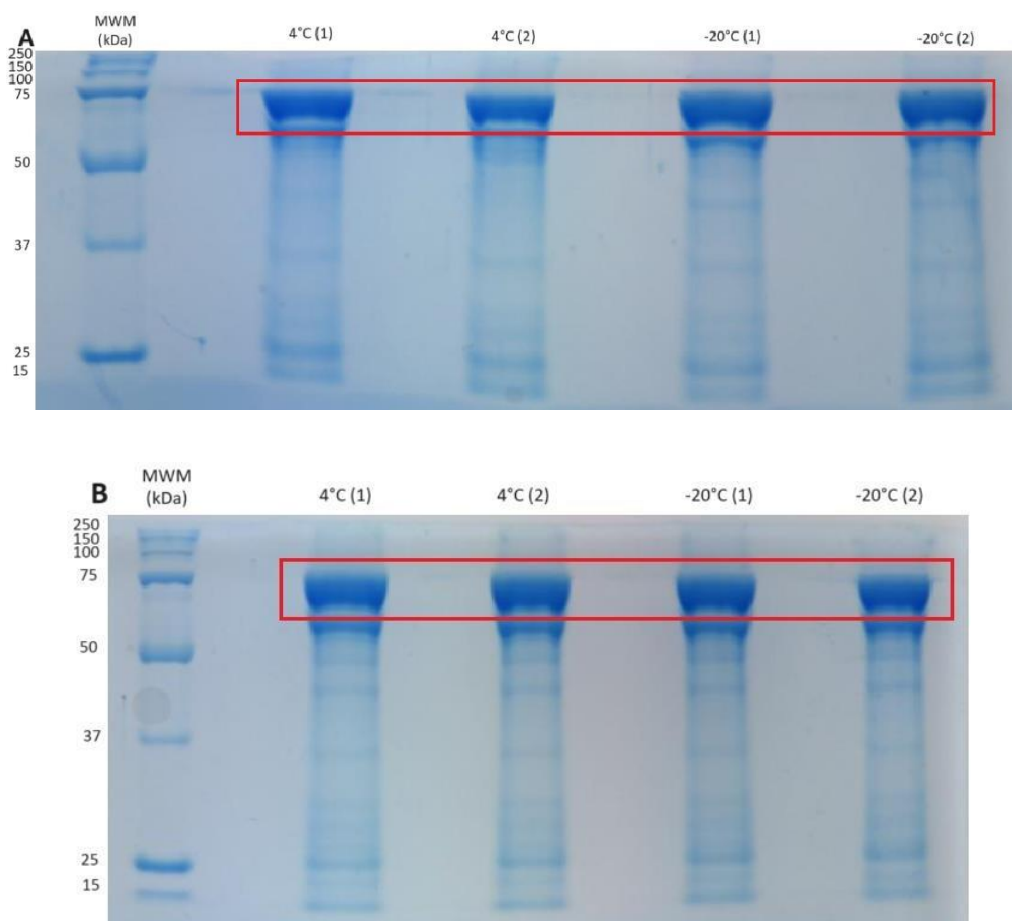


Imagen 3. Identidad de la enzima recombinante MMLV-RT. Gel de electroforesis SDS-PAGE resultantes tras un mes de almacenamiento. De izquierda a derecha se encuentra el marcador de peso molecular (MWM), posteriormente las dos muestras que fueron almacenadas a 4°C y las dos muestras que fueron almacenadas a -20°C. **A.** Lote 1. **B.** Lote 2

Tabla 13. Resultados de la cuantificación por Bradford de la enzima recombinante MMLV-RT tras un mes de almacenamiento del lote 1. En color verde, se observa la concentración de enzima (mg/ml) y en color naranja se observa proteína RT total (mg).

Muestras	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs Prome	Densitometria	Enzima (mg/ml)	Vol total (ml)	Proteína total (mg)
(1) 4°C	0,54	0,525	0,512	0,526	74,510	0,377	0,225	0,085
(2) 4°C	0,522	0,546	0,531	0,533	74,510	0,391	0,225	0,088
(1) -20°C	0,518	0,534	0,523	0,525	74,510	0,376	0,225	0,085
(2) -20°C	0,532	0,541	0,56	0,544	74,510	0,412	0,225	0,093

Tabla 14. Resultados de la cuantificación por Bradford de la enzima recombinante MMLV-RT tras un mes de almacenamiento del lote 2. En color verde, se observa la concentración de enzima (mg/ml) y en color naranja se observa proteína RT total (mg).

Muestras	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs Prome	Densitometria	Enzima (mg/ml)	Vol total (ml)	Proteina total (mg)
(1) 4°C	0,443	0,482	0,51	0,478	72,630	0,281	0,225	0,063
(2) 4°C	0,471	0,456	0,499	0,475	72,630	0,275	0,225	0,062
(1) -20°C	0,492	0,484	0,521	0,499	72,630	0,319	0,225	0,072
(2) -20°C	0,48	0,483	0,507	0,490	72,630	0,302	0,225	0,068

Tabla 15. Cuantificación de la extracción de ARN para lote 1 y lote 2 tras un mes de incubación.

Muestras DENV-2 PTE	Lote 1	Lote 2
	ng/uL	ng/uL
ARN 4°C (1)	306,122	55,4
ARN 4°C (2)	28,467	245,595
ARN -20°C (1)	53,154	18,641
ARN -20°C (2)	45,871	187,081

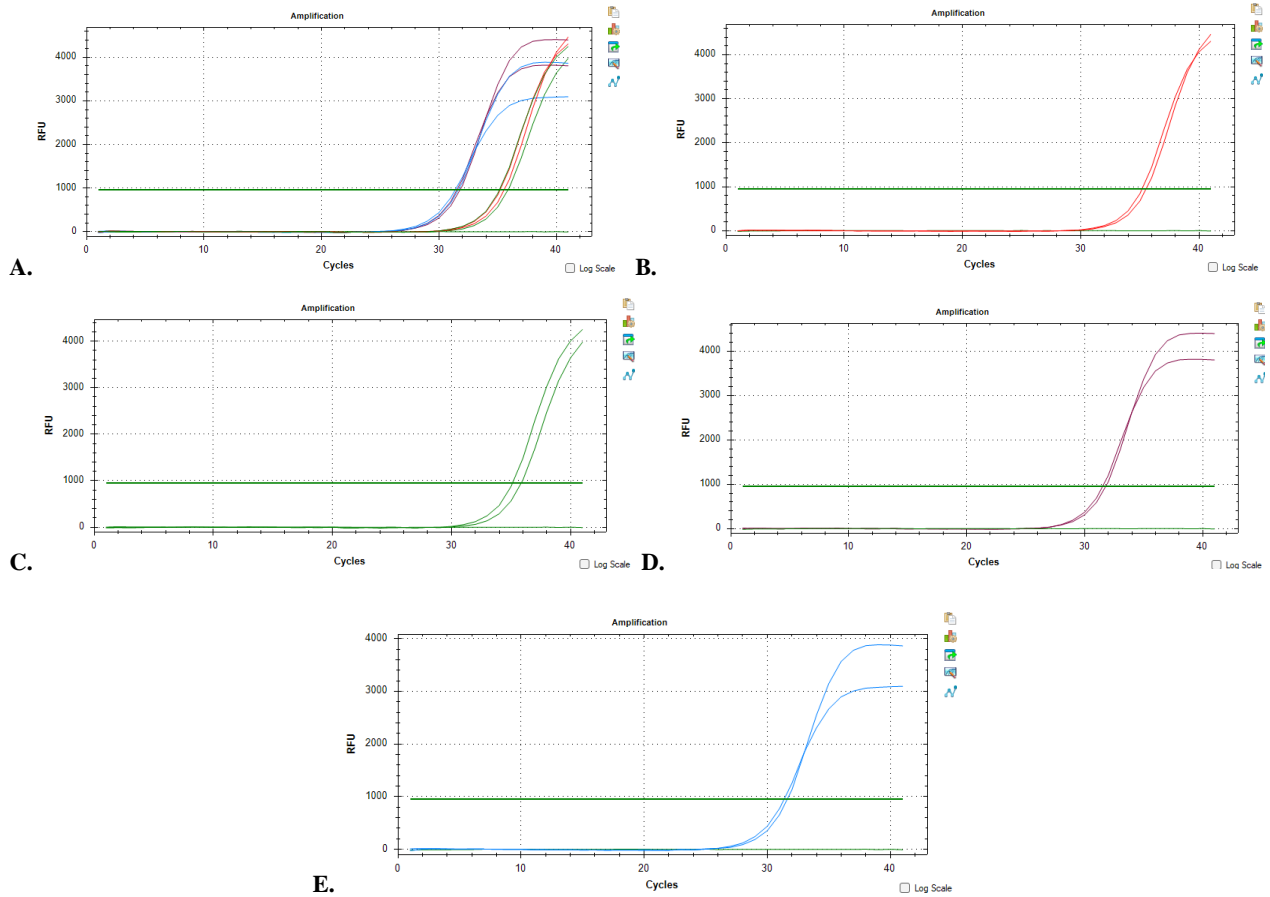


Imagen 5. Resultado de RT-qPCR. Ensayo de actividad biológica de la enzima MMLV-RT Lote 1 tras un mes de incubación. **A.** Todas las muestras de RT. Amplificadas. **B.** Muestra 4°C (1) con su duplicado (Rojo). **C.** Muestra 4°C (2) con su duplicado (Verde). **D.** Muestra -20°C (1) con su duplicado (Morado). **E.** Muestra -20°C (2) con su duplicado (Azul).

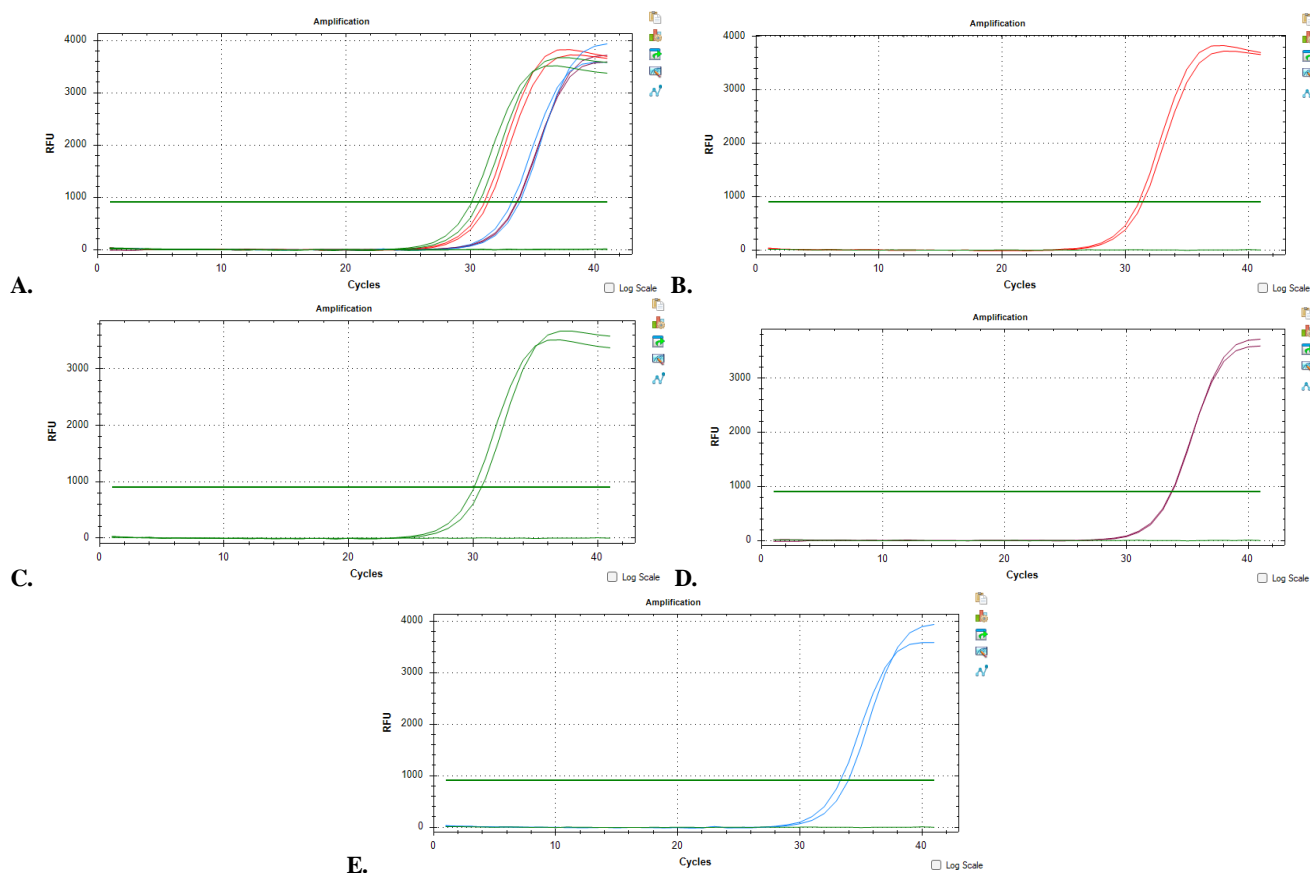


Imagen 6. Resultado de RT-qPCR. Ensayo de actividad biológica de la enzima MMLV-RT Lote 2 tras un mes de incubación. **A.** Todas las muestras de RT. Amplificadas. **B.** Muestra 4°C (1) con su duplicado (Rojo). **C.** Muestra 4°C (2) con su duplicado (Verde). **D.** Muestra -20°C (1) con su duplicado (Morado). **E.** Muestra -20°C (2) con su duplicado (Azul).

Tabla 16. Ciclo umbral (Cq) RT-qPCR Ensayo de actividad biológica de la enzima MMLV-RT Lote 1 y 2 a tiempo cero.

Muestras DENV-2	Lote 1		Lote 2	
	Cq		Cq	
ADNc 4°C (1)	35,61	35,26	31,43	31,12
ADNc 4°C (2)	35,20	35,95	30,67	30,09
ADNc -20°C (1)	31,60	31,87	33,76	33,70
ADNc -20°C (2)	31,71	31,46	33,32	33,97

Después de un mes de almacenamiento en los lotes 1 y 2, no se observaron diferencias significativas al comparar las muestras obtenidas al inicio y tras este período. Tanto en el análisis mediante gel de SDS-PAGE (véase imagen 3) las bandas principales se mantuvieron consistentes, sin la aparición de nuevas bandas por debajo de la principal. Esto indica que no hubo productos de degradación de la enzima, sugiriendo que no ocurrieron eventos de inestabilidad asociados a las condiciones de almacenamiento. También, en la cuantificación de proteínas (véase tablas 13 y 14), los resultados muestran una notable consistencia. En el gel, las bandas de las muestras son idénticas, lo cual se corrobora al analizar las concentraciones de

proteínas mediante el método de Bradford y densitometría; un mes después, estas concentraciones continúan manteniéndose en un rango entre 0.08 y 0.10 mg de proteína total para el lote 1, y entre 0.06 y 0.08 mg de proteína total para el lote 2. Este nivel de estabilidad refleja un resultado altamente satisfactorio en términos de conservación de las muestras, además de evidenciar que el lote 1 tuvo una mayor cantidad de enzima que el lote 2 desde el inicio.

Por otro lado, se llevó a cabo la evaluación cualitativa de la actividad enzimática utilizando RT-qPCR mediante la extracción de ARN viral del virus DENV-2 (véase tabla 13). Los resultados revelan un funcionamiento óptimo de la enzima, ya que las curvas correspondientes al gen tipo C del dengue se amplificaron en todas las muestras analizadas. Este hallazgo subraya la funcionalidad y viabilidad del ARN viral extraído, confirmando así la eficacia de la técnica empleada para evaluar la actividad enzimática cualitativa y, a su vez, la actividad de la RT.

Sin embargo, para el lote 1 se observaron diferencias significativas entre la amplificación del ARN del lote procesado con retrotranscriptasa conservada a 4°C (véase imagen 5, B y C) y el lote procesado con retrotranscriptasa conservada a -20°C (véase imagen 5, D y E). Según la tabla 16 del ciclo umbral, que hace referencia al ciclo de amplificación en el que la señal de fluorescencia detectada alcanza un umbral de amplificación, en el caso de la retrotranscriptasa almacenada a 4°C, el gen amplificó entre los ciclos 35-36, mientras que con la retrotranscriptasa conservada a -20°C, la amplificación ocurrió entre los ciclos 31-32. En el caso del lote 2, ocurrió lo contrario; con la retrotranscriptasa almacenada a 4°C (véase imagen 6, B y C), el ciclo umbral fue entre los ciclos 30-31 (véase imagen 6, D y E), y con la retrotranscriptasa almacenada a -20°C, el ciclo umbral fue entre los ciclos 33-34.

Estas fueron las únicas diferencias encontradas entre los lotes conservados a diferentes temperaturas tras un mes de almacenamiento. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, los ciclos en que amplifica el gen del virus DENV-2 no están directamente relacionados con la funcionalidad de la enzima retrotranscriptasa. Este fenómeno depende más de la condición del virus y la cantidad de partículas virales que se obtengan, es decir, su agresividad o pasividad. Un virus fuerte puede amplificar desde el ciclo 8, mientras que un virus más suave, como en este caso, amplifica después del ciclo 30. Por lo tanto, no se puede concluir que alguna de las temperaturas sea la indicada para la amplificación; en realidad, ambas temperaturas fueron óptimas para la amplificación del gen.

Además, es importante considerar otros factores que podrían influir en la diferencia observada

en los ciclos de amplificación. Entre estos factores se encuentra la variación en la calidad inicial de las muestras y la diferencia en la cuantificación de la extracción del ARN. Cada muestra puede tener una cantidad diferente de material genético, lo que puede llevar a diferencias significativas en los resultados. Por lo tanto, es esencial que el material genético extraído tenga una uniformidad cuantificada para que el proceso de amplificación sea reproducible. Aunque se realicen cálculos para normalizar, pueden existir variaciones en las muestras. Asimismo, la eficiencia de otros reactivos utilizados durante el proceso de RT-qPCR puede afectar los resultados. La precisión en el control de estos factores es crucial para garantizar la reproducibilidad y fiabilidad de los resultados obtenidos.

Se realizó el proceso utilizando la enzima comercial para comparación, pero al igual que inicialmente, el gen del DENV-2 no amplificó, lo que sugiere que la enzima no está en óptimas condiciones. Esta falta de amplificación podría deberse a degradación de la enzima por condiciones de almacenamiento inadecuadas, o contaminación durante el manejo. Estos hallazgos subrayan la importancia de mantener condiciones de almacenamiento adecuadas y realizar controles de calidad rigurosos para asegurar la integridad y funcionalidad de las enzimas en el laboratorio.

Se recomienda llevar a cabo un estudio a largo plazo para determinar con mayor precisión la temperatura óptima de almacenamiento para la enzima MMLV RT, lo que permitiría discernir diferencias más significativas entre las temperaturas seleccionadas. Es importante tener en cuenta que la enzima MMLV RT comercial suele almacenarse óptimamente entre -30°C y -10°C ²⁶. Por el momento, los hallazgos de este estudio indican que la enzima puede conservarse de manera satisfactoria durante un mes tanto a 4°C como a -20°C .

Sin embargo, un análisis prolongado sería necesario para establecer cuál de estas temperaturas ofrece un rendimiento continuo más favorable y qué variaciones pueden surgir a lo largo del tiempo. Según la norma de la ICH Q1F²⁰, es necesario realizar un estudio de al menos seis meses para obtener resultados significativos. En estudios a largo plazo, que abarcan 12 meses, si se observa un cambio significativo durante las pruebas de almacenamiento acelerado, se deben realizar pruebas adicionales en condiciones de almacenamiento intermedio, que comprenden seis meses. En este contexto, se evaluarán los criterios de cambio significativo, los cuales deben comprender un mínimo de datos recolectados durante seis meses dentro de un estudio de doce meses bajo condiciones intermedias. Además, es necesario llevar a cabo pruebas de degradación

forzada. Estas pruebas contribuyen a establecer las vías de degradación y la estabilidad intrínseca de la molécula, validando la capacidad indicativa de estabilidad de los procedimientos analíticos empleados. Realizar estas pruebas adicionales es fundamental para asegurar la robustez y la fiabilidad de los resultados a largo plazo, garantizando que la enzima MMLV RT mantenga su eficacia y seguridad bajo diferentes condiciones de almacenamiento.

5. CONCLUSIONES

- Se logró producir con éxito la enzima retrotranscriptasa recombinante en *Escherichia coli* BL21(DE3) a escala de laboratorio. Además, se optimizó el proceso de purificación al unir tres fracciones de elución, lo que resultó en una mayor cantidad de enzima en comparación con el uso de una sola fracción de eluido.
- Se logró desarrollar una formulación que demostró estabilidad durante un mes a dos temperaturas diferentes: 4°C y -20°C. Esta formulación permitió mantener la integridad y funcionalidad de la enzima durante el periodo de prueba, lo cual es crucial para su almacenamiento y uso en aplicaciones posteriores.
- Se evaluaron los atributos de calidad de la enzima tanto al inicio del estudio (tiempo 0) como después de un mes de incubación. En cuanto a la identidad de la proteína, el análisis mediante gel SDS-PAGE no mostró cambios significativos, manteniéndose la intensidad de la banda similar a la observada en el tiempo 0. Además, la cuantificación de proteínas por el método de Bradford se mantuvo en los mismos rangos, con valores para el lote 1 entre 0.085 y 0.093, y para el lote 2 entre 0.062 y 0.072. Finalmente, la actividad de la enzima fue evaluada mediante amplificación de muestras en la RT-qPCR, demostrando que la enzima permaneció funcional a lo largo del periodo de incubación.
- Este proyecto logró producir y purificar eficientemente la enzima MMLV RT, desarrollar una formulación estable para su almacenamiento, y confirmar la calidad y funcionalidad de la enzima a lo largo de un mes, estableciendo así las bases para futuros estudios o aplicaciones.

6. AGRADECIMIENTOS

Primero, queremos agradecerle a Dios, nuestros padres, hermanos y toda nuestra familia, ya que ellos han sido nuestro apoyo en todo el camino de nuestra formación profesional y personal,

también han sido motivación en nuestras vidas para lograr nuestros sueños y metas. Segundo, damos muchas gracias a nuestros tutores Steven A. David Jiménez y Álvaro Barrera Ocampo, por acompañarnos y apoyarnos durante todo este proceso y además por brindarnos la oportunidad de introducirnos en el mundo de la investigación científica. Finalmente, agradecemos infinitamente a nuestros compañeros del semillero de biotecnología, los cuales aportaron en nuestro desarrollo profesional enseñándonos técnicas y resolviéndonos inquietudes.

7. REFERENCIAS:

1. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard | WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data. <https://covid19.who.int/>.
2. Du, J. *et al.* Optimal diagnostic test allocation strategy during the COVID-19 pandemic and beyond. *Stat Med* **41**, 310–327 (2022).
3. Semanal, B. E. 20-26 dic 2020. *Boletín Epidemiológico Semana* 52.
4. J. Farfán, B. M. BIOLOGÍA MOLECULAR APLICADA AL DIAGNÓSTICO CLÍNICO. *Revista Médica Clínica Las Condes* **26**, 788–793 (2015).
5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>.
6. Cebador. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Primer>.
7. ¿Cuál es el papel del MgCl₂ en las reacciones de amplificación por PCR? <https://www.excedr.com/resources/what-is-the-role-of-mgcl2-in-pcr>.
8. Van Pelt-Verkuil, E., Van Belkum, A. & Hays, J. P. *Principles and technical aspects of PCR amplification. Principles and Technical Aspects of PCR Amplification* (Springer Netherlands, 2008). doi:10.1007/978-1-4020-6241-4.
9. PCR: principio, pasos, tipos, componentes y aplicaciones de la PCR. <https://byjus.com/biology/pcr/>.
10. Maga, G. Reverse Transcriptase. *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition* 222–223 (2013) doi:10.1016/B978-0-12-374984-0.01326-7.
11. Coffin, J. M. & Fan, H. The Discovery of Reverse Transcriptase. *Annu Rev Virol* **3**, 29–51 (2016).
12. Baneyx, F. & Mujacic, M. Recombinant protein folding and misfolding in Escherichia coli. *Nature Biotechnology* vol. 22 1399–1407 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nbt1029> (2004).
13. Rosano, G. L. & Ceccarelli, E. A. Recombinant protein expression in Escherichia coli: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology* vol. 5 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172> (2014).
14. Park, J. H., Park, H. H., Choi, S. S. & Park, T. H. Stabilization of enzymes by the recombinant 30Kc19 protein. *Process Biochemistry* **47**, 164–169 (2012).
15. A Crommelin Robert D Sindelar Bernd Meibohm Editors Fundamentals, D. J. *Pharmaceutical Biotechnology*.
16. Bes, M. T., Gomez-Moreno, C., Guisan, J. M. & Fernandez-Lafuente, R. Selective oxidation: stabilisation by multipoint attachment of ferredoxin NADP⁺ reductase, an interesting cofactor recycling enzyme. *J Mol Catal A Chem* **98**, 161–169 (1995).
17. Umaña, P., Kellis, J. T. & Arnold, F. H. Recombinant Protein Stabilization through Engineered Metal-Chelating Sites. in 102–108 (1993). doi:10.1021/bk-1993-0516.ch007.
18. Benzaghoul, I., Bougie, I. & Bisailon, M. Effect of metal ion binding on the structural stability of the hepatitis C virus RNA polymerase. *J Biol Chem* **279**, 49755–49761 (2004).
19. Information on Rapid Molecular Assays, RT-PCR, and other Molecular Assays for Diagnosis of Influenza Virus Infection | CDC. <https://www.cdc.gov/flu/professionals/diagnosis/molecular-assays.htm>.
20. Annex 10. http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/quality_assurance/.

21. Resolución No. 3157 de 2018.
22. Quick Start™ Bradford Protein Assay Instruction Manual.
23. Álvarez Díaz, D. A. *et al.* An updated RT-qPCR assay for the simultaneous detection and quantification of chikungunya, dengue and zika viruses. *Infection, Genetics and Evolution* **93**, 104967 (2021).
24. De Ciencias, F. & Filosofía, Y. UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA 'ALBERTO CAZORLA TALLER'. (2022).
25. Kong, Y. Y., Thay, C. H., Tin, T. C. & Devi, S. Rapid detection, serotyping and quantitation of dengue viruses by TaqMan real-time one-step RT-PCR. *J Virol Methods* **138**, 123–130 (2006).
26. Transcriptasa inversa M-MLV. <https://worldwide.promega.com/products/pcr/rt-pcr/m-mlv-reverse-transcriptase/?catNum=M170>

