

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



TESIS

**“RELACIÓN ANTIGÉNICA DE VARIANTES GENÉTICAS
DE ROTAVIRUS”**

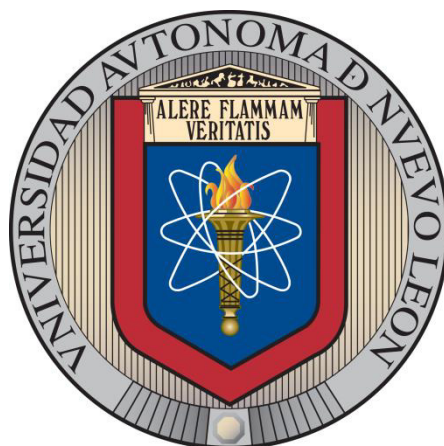
POR

CÉSAR IVÁN ROMO SÁENZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA**

FEBRERO, 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



“Relación antigénica de variantes genéticas de Rotavirus”

Por

M.C. CÉSAR IVÁN ROMO SÁENZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

Con Especialidad en Microbiología

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N.L.

FEBRERO 2017

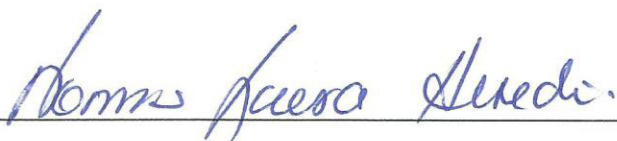
RELACIÓN ANTIGÉNICA DE VARIANTES GENÉTICAS DE ROTAVIRUS

COMITE DE TESIS



Dr. Juan Francisco Contreras Cordero

DIRECTOR DE TESIS



Dra. Norma Laura Heredia Rojas

SECRETARIO



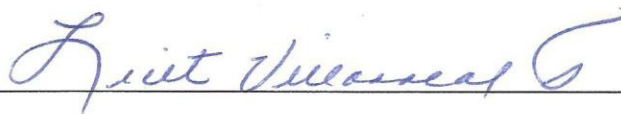
Dr. Santos García Alvarado

VOCAL



Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna

VOCAL



Dra. Licet Villareal Treviño

VOCAL

LUGAR DE TRABAJO

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de inmunología y virología, del departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Juan Francisco Contreras Cordero, con el apoyo del proyecto No. CN1074-11 PAICYT.

“No le pongas excusas a lo que no puedes terminar. Enfócate en todas aquellas razones por las que debes hacer que suceda”.

Ralph Marston

I. AGRADECIMIENTOS

Al **CONACYT** por la beca brindada durante la realización de este proyecto.

A mi director de tesis el **Dr. Juan Francisco Contreras Cordero**, por la confianza que deposito en mí y por apoyarme en la realización de este proyecto, por estar continuamente pendiente de mi formación, a pesar de todos los obstáculos que ambos tuvimos durante la realización de este proyecto. **MUCHAS GRACIAS POR TODO.**

A la **Dra. Cristina Rodríguez Padilla** gracias por permitirme realizar este proyecto en su laboratorio y la constante actualización en temas relacionados con mi proyecto de tesis.

A mi comité de tesis **Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna, Dra. Licet Villar Treviño, Dr. José Santos García Alvarado, Dra. Norma Laura Heredia Rojas**, gracias por los consejos y sobre todo estar al pendiente de los avances y sobre todo de los logros que juntos alcanzamos durante todo este camino. Mi más grande **ADMIRACIÓN** a cada uno de ustedes,

Al **Laboratorio de Inmunología y Virología (LIV)** de la facultad de Ciencias Biológicas de la UANL gracias por el apoyo económico y de infraestructura para la realización de este proyecto.

A mis compañeros de generación gracias por acompañarme durante toda esta aventura, en especial a **Omar Eduardo Tovar Herrera y Claudia Dalila Altamirano Torres**, gracias amigos por estar incondicionalmente para mí cuando tenía dudas de mi proyecto, pero especialmente estar ahí para superar cada obstáculo que se presentó durante estos tres años.

A mis mejores amigos **Yareellys Ramos, Gabriela Linares y Francisco Arzola**, gracias por estar conmigo siempre para darme todo su apoyo, este camino no se pudo lograr sin ustedes, no existen las palabras correctas para expresar lo mucho que los quiero.

A mis amigos **Dra. Roció Infante, Dra. Patricia Tamez, Julián, Claudia Murga, Carlos, Karla, Fernanda, Silvia, Erika, Carmen, Cinthia, Daniel, Marcela, Aida, Gaby, Laiju, Mayra, Ariel, Paul, Elier, Carlos Mario, Luis, Jessica, Nora, Vero** gracias por todas sus muestras de apoyo durante este tiempo, no cabe duda que los buenos amigos se encuentran en todas partes.

Gracias también a **Nora, Claudia, Marla, Yair, Magali, Juan José, Dinorah, Ericka, Lola, Cammy, Karen, Andrea, Habbi, Lizeth, Karina, Brasil, Verónica, Martin y Noel** mis compañeros de laboratorio quienes día con día estuvieron conmigo en los buenos y no tan buenos resultados. Gracias por permitirme formar parte no solo de su formación, sino también de su vida.

A la **SECRETARIA DE POSGRADO DE LA FCB DE LA UANL**, en especial a **MIRTHALA** gracias por todo el **APOYO** brindado durante estos tres años.

II. DEDICATORIA

A mi abuela: **CARMEN GARCÍA CHÁVEZ** por ser una mujer excepcional, a quien admiro sobre todas las cosas, su experiencia, trabajo, disciplina, esfuerzo y sabiduría, no cabe duda que es la mejor de todas, **GRACIAS** por permitirme formar parte de su vida.

A mis hermanos **ALEX, ERICK Y DAVID** gracias por estar siempre apoyándome y presionándome para ser una mejor persona, no cabe duda que mejores hermanos no pude tener.

Para mi **ALYSSA FERNANDA** no cabe duda que la ternura y aprendizaje de vivir cada día a tu lado no la cambiaría por nada, te quiero.

A mi **MADRE** por apoyarme de forma incondicional en todos mis proyectos y sobre todo por mostrarme el camino durante toda mi formación académica y sobre todo personal.

Con todo mi amor y mi cariño.

César Romo

“Si tienes tiempo de mirar hacia el pasado, tienes tiempo para enfocarte en generar un mejor futuro”

III. Índice

Sección	Página
I. AGRADECIMIENTOS	i
II. DEDICATORIA	ii
III. INDICE	iii
IV. INDICE DE TABLAS	vi
V. INDICE DE FIGURAS	vii
VI. ABREVIATURAS	ix
VII. RESUMEN	xi
VIII. ABSTRACT	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Generalidades	3
2.2 Estructura de Rotavirus	3
2.3 Diversidad genética de Rotavirus	4
2.4 Antígenos y marcadores epidemiológicos	4
2.4.1 Grupos y subgrupos	4
2.4.2 Serotipos o serogrupos	5
2.4.2.1 Tipos G	5
2.4.2.2 Tipos P	5
2.4.3 Genotipos	6
2.5 Características genéticas y antigénicas de VP4	6
2.6 Subunidad VP5* de Rotavirus	7
3. JUSTIFICACIÓN	8
4. HIPÓTESIS	9
5. OBJETIVO	10
5.1 OBJETIVOS PARTICULARES	10
6. MATERIALES Y METODOS	11
6.1 Extracción de RNA viral	11
6.2 Electroforesis de RNA	12

6.3 Obtención del cDNA de la subunidad VP5*	12
6.4 Amplificación de la subunidad VP5*	13
6.5 Clonación de la subunidad VP5*	13
6.6 Ligación del producto de PCR y plásmido pGEM-T	14
6.7 Transformación de <i>E. coli</i> DH5a competentes	14
6.8 Purificación de plásmidos de bacterias transformadas	15
6.9 Análisis de plásmidos purificados	15
6.10 Secuenciación de la subunidad VP5*	16
6.11 Análisis de la secuencia interna de la subunidad VP5*	16
6.12 Análisis de la secuencia de la subunidad VP5*	17
6.13 Subclonación	18
6.13.1 Preparación del inserto y plásmido de expresión	18
6.13.2 Ligación del producto de PCR y plásmido pET	18
6.13.3 28 a (+).....	
6.13.3 Transformación de <i>E. coli</i> DH5a competentes	18
6.13.4 Transformación y análisis de <i>E. coli</i> BL 21(DE3) competentes	19
.....	
6.13.5 Inducción de la expresión de proteínas recombinantes	19
6.13.6 Lisis bacteriana.....	20
6.14 Análisis de proteínas recombinantes	20
6.14.1 SDS-PAGE de los lisados bacterianos	20
6.14.2 Western blot	21
6.15 Purificación de proteínas recombinantes	21
6.15.1 Cromatografía de afinidad	21
6.15.2 Electroelución	22
6.16 Esquema de inmunización de ratones con proteínas recombinantes de Rotavirus humano	22
6.17 Ensayo de ELISA	23
7. RESULTADOS	24
7.1 Muestras de heces	24
7.2 Evaluación y selección de muestras	24

7.3 Análisis del RNA viral	26
7.4 Secuenciación de la subunidad VP5*	27
7.5 Análisis de la secuencia de nucleótidos de la subunidad VP5*	29
7.6 Análisis de la secuencia de aminoácidos de la subunidad VP5* ...	37
7.7 Expresión y purificación de las subunidades VP5* y VP8* de la proteína VP4 de rotavirus	38
7.7.1 Subclonación de la subunidad VP5* en el plásmido pET28a (+)	38
7.7.2 Expresión de la subunidad VP5* de Rotavirus	42
7.7.3 Análisis antigénico de lisados de bacterias con la rVP5*	42
7.7.4 Purificación de la subunidad VP5* de Rotavirus	44
7.8 Evaluación de anticuerpos policlonales contra la subunidad VP5* de rotavirus	44
7.9 Análisis de reactividad de anticuerpos policlonales anti- Rotavirus Wa, anti-VP8* P[8], anti-VP5* P[8] en rotavirus circulantes en la cd de Chihuahua	44
8. DISCUSIÓN	50
9. CONCLUSIÓN	54
10. PERSPECTIVAS	55
11. BIBLIOGRAFÍA	56
12. RESUMEN BIOGRÁFICO	64
13. ANEXOS	65
13.1 Artículo publicado	65

IV. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
I Alineamiento de los residuos de aminoácidos en los epítopes antigénicos en VP8 * de rotavirus circulantes en el norte de México y la vacuna rotarix	25
II Análisis genético y antigénico de rotavirus circulante	49

V. Índice de figuras

Figura		Página
1	Esquema general del diseño de primers para la secuenciación de la subunidad VP5* de rotavirus	17
2	Frecuencia de mutaciones en los epítopes neutralizantes de la proteína VP4	26
3	Electroforesis de RNA_{TOTAL} en gel de Poliacrilamida al 10 % extraído de diarreas de Rotavirus	27
4	Electroforesis en gel de agarosa 1.5 % de RT-PCR de la subunidad VP5* de Rotavirus	27
5	Electroforesis en gel de agarosa 1.5 % productos de PCR purificados de la subunidad VP5* de Rotavirus	28
6	Bacterias <i>E. coli</i> DH5α transformadas con la reacción de ligación del plásmido pGEM-T y el inserto de la subunidad VP5* en medio LB/AMPICILINA	28
7	Electroforesis en gel de agarosa 1.0 % de DNAplasmidico de bacterias <i>E. coli</i> DH5α	28
8	Ensayo de restricción en el plásmido pGEM-T/VP5*	29
9	PCR de confirmación en el plásmido pGEM-T/VP5*	29
10	Identificación del sitio de restricción de la enzima BamHI en el cromatograma en el extremo 5' de la subunidad VP5* de la muestra 554	30
11	Identificación del sitio de restricción de la enzima Sall en el cromatograma en el extremo 3' de la subunidad VP5* de la muestra 554	30
12	Análisis de identidad de la secuencia de nucleótidos obtenida del cromatograma de la secuenciación del plásmido pGEM-T/VP5*-554 (extremo 5')	31

	Análisis de identidad de la secuencia de nucleótidos obtenida del	
13	cromatograma de la secuenciación del plásmido pGEM-T/VP5*-554 (extremo 3')	32
14	Electroforesis en gel de agarosa 1.5 % de PCR de región interna de la subunidad VP5* de Rotavirus	33
	Análisis de identidad de la secuencia de nucleótidos obtenida del	
15	cromatograma de la secuenciación de la subunidad interna de VP5* de la muestra 532 (extremo 5').	34
	Análisis de identidad de la secuencia de nucleótidos obtenida del	
16	cromatograma de la secuenciación de la región interna de VP5*-532 (extremo 5')	35
17	Alineamiento de la secuencia de nucleótidos de la subunidad VP5* de las muestras de rotavirus 623 y 532	36
18	Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la subunidad VP5* de las muestras de rotavirus 623 y 532	37
19	Análisis de identificación <i>in-silico</i> de dominios transmembranales de la subunidad VP5* de rotavirus de la muestra 532	38
20	Purificación de plásmidos pGEM-T/VP5* y pET28 (a)	39
21	Análisis de digestión doble del plásmido pGEM-T/VP5*-532 y pET28 (a) con las enzimas BamHI y Sall	39
22	Productos de digestión doble de los plásmidos pET28 (a) y pGEM-T/VP5*-532 purificados	40
23	Bacterias <i>E. coli</i> DH5α transformadas con la reacción de ligación del plásmido pET28 (a) y el inserto de la subunidad VP5* en medio LB/KANAMICINA	40
24	Purificación de DNA^{Plasmidico} de bacterias <i>E. coli</i> DH5α transformadas con el plásmido pET/VP5*	41
25	PCR de confirmación del inserto VP5* en el plásmido de expresión pET28 (a)	41
26	Expresión de la subunidad VP5* de rotavirus en <i>E. coli</i> BL 21 (DE3) en medio 2XYT-Glu 2%	43

27	Análisis antigénico de los lisados de <i>E. coli</i> BL 21 (DE3) con rVP5*	43
28	Precipitación y análisis de la subunidad rVP5* purificada mediante electroelución	44
29	Curva estándar para la cuantificación de la subunidad rVP5* por turbidimetría	44
30	Curva de titulación de anticuerpos anti rVP5* mediante ELISA indirecto	45
31	Análisis antigénico de la subunidad rVP5*	46
32	Evaluación del anticuerpo de captura ΔRV mediante ELISA indirecto tipo HADAS	46
33	Selección de muestras control negativo para los ensayos de ELISA	47
34	Análisis de expresión de la subunidad VP8*	47
35	Análisis de la rVP8* de rotavirus	48
36	Grafica representativa de la reactividad de anticuerpos anti-Wa y anti-VP8* en muestras de campo	48
37	Análisis de reactividad en muestras de campo con los diferentes anticuerpos	49

IV. ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
ABTS	2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	Ácido ribonucleico
BL21(DE3)	Nombre de la cepa de <i>E. coli</i> utilizada para expresar péptidos
DH5 α	Nombre de la cepa de <i>E. coli</i> utilizada para clonación
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
°C	Grados centígrados
HRP	Peroxidasa de rábano
hrs	Horas
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertoni
M	Molaridad
mA	Miliamperes
mg	Miligramos
mM	Milimolar
μ M	Micromolar
min	Minutos
mL	Mililitros
μ L	Microlitros
ng	Nanogramos
nm	Nanometros
pb	Pares de bases de nucleótidos
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PBS A	Solución amortiguadora de fosfatos sin calcio y magnesio
pH	Potencial de hidrogeno (-log [H ⁺])
%	Porcentaje

rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundos
SDS	Duodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
SOC	Medio enriquecido para bacterias calcio competentes
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
U	Unidades enzimáticas
1X	Concentración de trabajo de un stock concentrado (10X, 50X)

VI. RESUMEN

La vacuna de rotavirus fue desarrollada empleando los genotipos G y P de mayor incidencia circulantes en la población infantil. Estudios moleculares muestran que la proteína VP4 de rotavirus es el antígeno con mayor variabilidad genética y antigénica del virus. No obstante, se ha determinado que cambios antigénicos en la proteína VP4 pueden inducir a la emergencia de mutantes que escapan a la neutralización del virus por el sistema inmune. Por lo tanto, este estudio investigó la reactividad homotípica y heterotípica de anticuerpos policlonales anti-Rotavirus Wa, anti-VP8*-P[8] y anti-VP5*-P[8] con muestras de rotavirus circulantes en la población infantil durante el 2004-2011 en la ciudad de Chihuahua, México. Todas las cepas, excepto cinco fueron detectados por los anticuerpos anti-Rotavirus Wa. De igual forma estas muestras y diez más mostraron reactividad negativa por anticuerpos anti-VP8*-P[8]. El análisis de mutaciones en los principales epitopes de VP4 reveló una diferencia entre cepas de reactividad positiva y negativa por anticuerpos anti-Rotavirus Wa, sin embargo algunas cepas negativas y positivas por anticuerpos anti-VP8*-P[8] eran idénticas en la secuencia de la subunidad VP8*. No obstante, el análisis de secuencia de la subunidad VP5* de estas muestras mostró tres cambios de aminoácidos en el extremo carboxilo terminal. Resultados en este estudio muestran la importancia de evaluar las variantes genéticas en la proteína VP4 de rotavirus de campo que podrían ser detectadas y neutralizadas por anticuerpos inducidos por rotavirus con genotipo P[8].

VII. Abstract

The rotavirus vaccine was developed using the most prevalent G and P genotypes circulating in the child population. Molecular studies showed that the rotavirus VP4 protein is the antigen with the greatest genetic and antigenic variability of the virus. However, it has been determined that antigenic changes in the VP4 protein may induce the emergence of mutants escaping virus neutralization by the immune system. Therefore, this study investigated the homotypic and heterotypic reactivity of anti-Rotavirus Wa, anti-VP8*-P[8] and anti-VP5*-P[8] antibodies with Rotavirus circulating in the infantile population during the 2004-2011 in the city of Chihuahua, Mexico. All but five strains were detected by anti-Rotavirus Wa antibodies. Likewise, these samples and ten more showed negative reactivity by anti-VP8*-P[8] antibodies. Analysis of mutations in the major epitopes of VP4 revealed a difference between strains of positive and negative reactivity for anti-Rotavirus Wa, however some strains negative and positive for anti-VP8*-P[8] antibodies were identical in VP8* subunit sequence. However, sequence analysis of the VP5* subunit of these samples showed three amino acid changes at the carboxy terminal. Results in this study show the importance of evaluating the genetic variants in the rotavirus VP4 field protein that could be detected and neutralized by antibody induced rotavirus with P genotype [8].

1. INTRODUCCIÓN

Rotavirus es el principal agente causal de diarreas agudas en infantes menores de cinco años. La tasa anual de mortalidad por este patógeno se estima entre 197,000 hasta 233,000 muertes alrededor del mundo en niños menores de 5 años (Tate *et al.*, 2016). Este virus presenta una gran variabilidad en sus once segmentos génicos. La variabilidad genética del virus es generada principalmente por dos factores; la acumulación de mutaciones durante el proceso replicativo, ya que la RNA polimerasa viral no tiene actividad de *proofreading*, por otra parte, el genoma segmentado de rotavirus durante la co-infección de cepas diferentes a una misma célula pueden generar nuevos arreglos génicos (Afrad *et al.*, 2013; Matthijnsens and Van Rast, 2012; Steyer *et al.*, 2014). Estos cambios pueden generar que las proteínas de superficie (VP4 y VP7), que se expresan en las diferentes cepas circulantes tengan variaciones en su secuencia de aminoácidos. Estas pueden afectar las regiones inmunodominantes de la proteína y generar nuevas variedades con potencial de escapar a la neutralización (Kulkarni *et al.*, 2014, Zeller *et al.*, 2011). Las proteínas VP4 y VP7 inducen la producción de anticuerpos neutralizantes por lo proporcionan protección contra este patógeno (Dormitzer *et al.*, 2002; Dormitzer *et al.*, 2004; Contreras *et al.*, 2011).

Basado en las diferencias genéticas de estas proteínas, Rotavirus se clasifica en genotipos G (basándose en que la proteína VP7 es glicosilada) y genotipos P (basado en que la proteína VP4 es sensible a proteasas). Hasta la fecha se han descrito 27 genotipos G y 38 genotipos P (Santos and Hoshino 2005; Matthijnsens *et al.*, 2011; Fujii *et al.*, 2016). Así mismo los genotipos P se pueden subdividir en linajes, los cuales son determinados por secuencias específicas del segmento 4; actualmente se conocen 4 linajes para el genotipo P[8] y 5 linajes para el genotipo P[4]. Siendo P[8]-3 el linaje predominante en cepas circulantes (da Silva *et al.*, 2013; Espinola *et al.*, 2008; Zeller *et al.*, 2011).

La proteína VP4 es una proteína no glicosilada de 88 kDa formada por 775 aminoácidos codificada por el segmento 4 de rotavirus. Esta proteína forma parte de la cápside externa del virus en forma de espículas (Blanchard *et al.*, 2007). VP4 es considerada la principal proteína del virus, ya que se le han atribuido varias funciones

como la adhesión a la célula hospedero, penetración, hemaglutinación, virulencia y es la más importante en la generación de anticuerpos neutralizantes contra el virus. Durante el proceso infeccioso, esta proteína sufre un corte proteolítico por la tripsina pancreática generando los péptidos VP8* (aminoácido 1-241 aproximadamente) y VP5* (aminoácido 247 a 776), que representan las terminales amino y carboxilo de la proteína (Crawford *et al.*, 2001). Diversos estudios revelan que las regiones antigénicas de VP5* y VP8*, presentan epítopes que pueden neutralizar cepas con características similares (Contreras *et al.*, 2011). Estos análisis muestran a VP8* como la región más inmunogénica de la proteína VP4 (Padilla-Noriega *et al.*, 1992). Estudios adicionales muestran que ambas subunidades presentan epítopes conformacionales identificando cuatro para VP8* y cinco en VP5* (Monnier *et al.*, 2006). VP5* representa la región más conservada de la proteína, estudios previos revelan en VP5* la presencia de los principales epítopes de reactividad cruzada de la proteína VP4, por lo tanto, esta subunidad podría emplearse para la inducción de anticuerpos neutralizantes que podría identificar un mayor número de cepas de campo con el potencial para escapar a la neutralización por anticuerpos generados por el sistema inmune del huésped (Dormitzer *et al.*, 2004). En base a esta información este estudio va dirigido a determinar la relación genética y antigénica de la proteína VP4 de rotavirus humano en cepas mutantes en la subunidad VP5* circulantes que escapan a la neutralización y el impacto que pueden tener estos cambios en la protección generada por la vacuna anti-rotavirus.

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades

Rotavirus es el principal agente causal de gastroenteritis aguda en infantes menores de 5 años alrededor del mundo. Actualmente se estima una tasa de mortalidad de 197,000 hasta 233,000 muertes por año alrededor del mundo (Matthijnssens *et al.*, 2011, Tate *et al.*, 2016). Este virus puede provocar infecciones asintomáticas, hasta una diarrea grave acompañada de una deshidratación severa que puede conducir a la muerte (Richardson *et al.*, 2010). En América Latina este patógeno causa aproximadamente cerca de 75,000 hospitalizaciones y cerca de 15,000 muertes por año (Yen *et al.*, 2011). La incidencia de esta infección es similar en países desarrollados como en vías de desarrollo (Yen *et al.*, 2011). Sin embargo, en países con una tasa de letalidad mayor se ha relacionado a otros factores como la desnutrición y deficiencias en los servicios de salud (Espinola *et al.*, 2008). En países en desarrollo, se ha visto una tasa de infección mayor en infantes entre los 3 y 11 meses de edad, mientras que en países desarrollados se estima una mayor incidencia en el segundo año de vida (Yen *et al.*, 2011). En México actualmente predomina esta infección en comparación con la bacteriana y parasitaria, a pesar de que se ha observado un descenso considerable en la mortalidad infantil por gastroenteritis, esto debido a la implementación de vacunas contra rotavirus. (Quintanar *et al.*, 2011, Esparza-Aguilar *et al.*, 2009).

2.2 Estructura de Rotavirus

Rotavirus es un virus de RNA de doble cadena el cual posee su genoma organizado en segmentos. Este virus pertenece a la familia Reoviridae (Matthijnssens *et al.*, 2011). El genoma viral está compuesto por 11 genes. Entre estos el gen 11 posee la característica de ser policistronico ya que codifica para dos proteínas virales (Esparza-Aguilar *et al.*, 2009). El virión maduro posee tres capas concéntricas de proteínas (Yen *et al.*, 2011). La capa interna del virión se encuentra formada por 60 dímeros de la proteína VP2, los cuales rodean al genoma del virus y por pequeñas cantidades de la RNA polimerasa VP1, así como en menor cantidad por la guanilil-transferasa VP3 (Matthijnssens *et al.*, 2011). La capa intermedia se encuentra formada por la proteína VP6 siendo esta la proteína más

abundante del virión y la responsable de la forma icosaédrica del virus (Steele *et al.*, 2010). La capa externa del virus se encuentra formada por la proteína, VP4 y VP7. En esta capa de proteínas se encuentra una superficie lisa compuesta por alrededor de 780 copias de la glicoproteína VP7, organizada en forma de trímeros (Steele *et al.*, 2010). En esta capa se encuentra también la proteína VP4 la cual se encuentra proyectada hacia el exterior de la superficie viral en forma de espículas, en aproximadamente 60 trímeros por partícula (Matthijssens *et al.*, 2011).

2.3 Diversidad genética de rotavirus

La variabilidad de rotavirus es constante debido a la interacción entre la gran diversidad de las cepas silvestres alrededor del mundo (Usonis *et al.*, 2012). Sin embargo, las cepas que causan las enfermedades diarreicas severas se encuentran cambiando constantemente año con año y en los diferentes países donde se encuentran. Esta diversidad de rotavirus es generada por diferentes mecanismos (Kirwood, 2010). Estos mecanismos incluyen: acumulación de mutaciones puntuales (drift antigénico) que pueden generar cambios antigénicos, rearrreglos genéticos que conducen a la generación de nuevas cepas con características genéticas y antigénicas diferentes a las parentales, transmisión de cepas entre diferentes especies, y genes rearreglantes (deleciones, duplicaciones, inserciones) que pueden generar cambios en las regiones codificantes y no codificantes, afectando a los diferentes genes del virus (Trojnar *et al.*, 2013; Steyer *et al.*, 2013).

2.4 Antígenos y marcadores epidemiológicos

2.4.1 Grupos y subgrupos

Rotavirus se organiza en 8 grupos basándose en los epítopes de la proteína de la Cápside interna VP6 (Steele *et al.*, 2010). De estos se han identificado hasta la fecha en infecciones a humanos a los grupos A, B y C (Tellez-Castillo *et al.*, 2010). El grupo A es el que predomina sobre los demás, siendo este el que presenta una mayor variabilidad (Matthijssens *et al.*, 2011). Los subgrupos se encuentran definidos por epítopes localizados también en la proteína VP6 (Tellez-Castillo *et al.*, 2010). La presencia o ausencia de estos epítopes son responsables de la clasificación de subgrupo. A la fecha,

se conocen cuatro subgrupos (SG) de rotavirus grupo A. Estos subgrupos se denominan SGI (presencia del epítipo) SGII (presencia del epítipo) SGI y II Presencia de los dos epítipes, SG no I y II (ausencia de los dos epítipes) (Yen *et al.*, 2011).

2.4.2 Serotipos o serogrupos

2.4.2.1 Tipos G

La proteína VP7 es uno de los principales antígenos de superficie representando cerca del 30% de proteínas en el virión maduro (Kirwood, 2010). Esta proteína es la segunda más abundante. VP7 forma la superficie lisa del virión junto con 60 espículas aproximadamente de la proteína VP4 (Tellez-Castillo *et al.*, 2010). VP7 es una proteína glicosilada que contiene cadenas de carbohidratos ricos en manosa por N- Glicosilación, la cual es recortada por la pérdida de dos residuos de manosa en los viriones maduros. Esta proteína es codificada por el gen 9 de rotavirus humano (Kirwood, 2010). El rol de esta proteína en la replicación no está muy claro, sin embargo, se cree que puede tener cierta función sobre la actividad de reconocimiento al receptor. Es considerada como el principal antígeno de superficie (Steele *et al.*, 2010). La variabilidad antigénica de esta proteína la ha llevado a ser clasificada en 15 serotipos denominados G (por glicosilación) (Yen *et al.*, 2011).

2.4.2.2. Tipos P

La proteína VP4 es la proteína que se encarga del reconocimiento del receptor (Monnier *et al.*, 2006). Esta proteína se encuentra en forma de espículas proyectadas hacia el exterior. Durante el proceso de infección esta proteína sufre un corte proteolítico que la subdivide en la subunidad VP8* y VP5*(Tellez-Castillo *et al.*, 2010). VP4 es codificada por el segmento 4 del genoma viral (Crawford *et al.*, 2001). Hasta la fecha se han determinado 14 serotipos P denominados así por su susceptibilidad al corte por la tripsina durante la infección (Espinola and Parra, 2008, Yen *et al.*, 2011).

2.4.3 Genotipos

Debido a la falta de anticuerpos específicos de serotipo se procedió a clasificar las cepas de rotavirus en genotipos. Los genotipos se designan con la letra G para serotipos de VP7 (de la misma forma que los serotipos) y genotipos P (seguido de un número en corchete) para los genotipos VP4 (Monnier *et al.*, 2006). Hasta la fecha se han descrito 27 genotipos G y 38 genotipos P. Debido a esta variabilidad y a que las cepas de rotavirus presentan estas dos proteínas de superficie, se procedió a clasificar a las cepas en una nomenclatura dual de acuerdo a la combinación de genotipos prevalentes. A nivel mundial, el genotipo G1P[8] es predominante con el 60% de todas las cepas circulantes, seguido por G2P4 (Steele *et al.*, 2010). Sin embargo, el genotipo P8 es el que presenta una mayor incidencia en combinación con los demás genotipos G alrededor del mundo, ya que puede representar hasta el 80% de todas las cepas de rotavirus circulantes (Kirwood, 2010).

2.5 Características genéticas y antigénicas de VP4

El gen 4 de rotavirus está constituido por aproximadamente 2359 pb, sin embargo, estudios de secuenciación revelan que cepas de origen animal presentan 2362 pb lo cual representa un aminoácido más que las cepas humanas (Blanchard *et al.*, 2007). La región codificante de este gen se encuentra flanqueada por dos regiones no codificantes. La región no codificante 5' la constituye nueve nucleótidos (nt), mientras que en el extremo 3' 25 nt forman esta región (Settembre *et al.*, 2011). La proteína VP4 además de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes, está involucrada en los procesos de unión y penetración a la célula huésped (Blanchard *et al.*, 2007). Durante este proceso la proteína sufre un corte proteolítico por la acción de la tripsina generando dos subunidades proteicas las cuales potencian este proceso. Estas subunidades proteicas se denominan VP8* y VP5*. La subunidad VP8* consta de 247 aminoácidos y la subunidad VP5* de 529 aminoácidos (Settembre *et al.*, 2011). Estudios de secuencias muestran que en la mayoría de las células tanto animales como humanas la tripsina corta el extremo carboxilo de la arginina que se encuentra en la posición 247 (Settembre *et al.*, 2011). A si mismo este tipo de análisis muestra que la variabilidad en esta proteína se encuentra principalmente en el extremo amino el cual corresponde a la subunidad VP8*. Por otra parte, la subunidad

VP5* posee regiones consenso que se infieren participan en el proceso de penetración viral a la célula. Con el proceso de corte por la tripsina, las subunidades no se separan físicamente, sino que se forman un rearrreglo que le permite poseer una estructura más rígida (Crawford *et al.*, 2001). logrando de esta forma la entrada de forma directa para iniciar el proceso replicativo (Dormitzer *et al.*, 2004). Asimismo, estudios iniciales de caracterización antigénica de la proteína VP4 mostraron que dentro de la subunidad VP5* pueden existir epítopes específicos de serotipo y de reacción cruzada que pueden ser utilizados en estudios de campo (Contreras *et al.*, 1995) (Taniguchi *et al.*, 1987). Además, estudios previos también mostraron que el cambio de un solo aminoácido podría alterar la reactividad de esta proteína empleando esos anticuerpos (Taniguchi *et al.*, 1988; Kobayashi *et al.*, 1990).

2.6 Subunidad VP5* de rotavirus

Como se mencionó anteriormente, la subunidad VP5* es generada tras un corte proteolítico de VP4 por la tripsina durante el proceso infectivo a la célula diana. Esta subunidad está conformada por los aminoácidos del 247 al 776 que se encuentran hacia el extremo carboxilo (Crawford *et al.*, 2001). VP5 es la subunidad más conservada de la proteína VP4. Dadas estas características se ha identificado su participación en el proceso de entrada del virus (Monnier *et al.*, 2006). Estudios de secuencia de esta subunidad muestran que posee un dominio hidrófobo conformado por los residuos del 248 al 474 que es responsable de la unión con la membrana de la célula (Glantsova *et al.*, 2004). Por otra parte, también se muestran que esta proteína tiene en el dominio de unión a membrana un ligando para la integrina $\alpha 2\beta 1$ conformada por los aminoácidos DGE en la posición 308-310 (Graham *et al.*, 2006). Esta subunidad es capaz de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes, así como producir anticuerpos capaces de reconocer cepas con diferente genotipo. Es por esto que es importante determinar en cepas de campo con diferentes genotipos co-circulantes cuales son los cambios antigénicos que influyen en las modificaciones antigénicas de esta subunidad y así poder determinar qué cambios pudieran generar cepas mutantes con capacidad a escapar a la neutralización por anticuerpos generados por la cepa vacunal.

3. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años estudios de epidemiología molecular revelan cuales son los genotipos predominantes en la población infantil. No obstante, las mutaciones puntuales acumuladas en la secuencia de la proteína VP4 se han enfocado a subclasificar el virus en linajes. Sin embargo, el impacto que pueden llegar a generar estas mutaciones y la capacidad del virus para recombinarse surgen como un riesgo latente de un posible brote epidémico. Entre los antígenos de superficie la proteína VP4 ha sido clasificada en un mayor número de genotipos. Esta proteína es vital para la replicación del virus ya que participa en varios procesos durante la infección a la célula hospedera. VP5* al ser la subunidad más conservada de este antígeno se considera el mejor candidato para la producción de anticuerpos que permitan estudiar los cambios antigénicos de las cepas con potencial para escapar a la neutralización o el reconocimiento por anticuerpos. Por tal motivo, el determinar los cambios genéticos en cepas que escapan al reconocimiento por anticuerpos generara información para ampliar el conocimiento de las regiones antigénicas de la proteína VP4 que son importantes en la neutralización viral.

4. HIPÓTESIS

Mutaciones no sinónimas presentes en la subunidad VP5* de la proteína VP4 de Rotavirus son responsables de la emergencia de variantes antigénicas que escapan al reconocimiento por anticuerpos.

5. OBJETIVO

Determinar la presencia de mutaciones no sinónimas en VP5* sobre la emergencia de cepas mutantes de rotavirus que escapan al reconocimiento por anticuerpos.

5.1 Objetivos particulares

1. Identificar variantes genéticas del gen 4 en cepas de Rotavirus humano.
2. Producir y evaluar anticuerpos policlonales contra rVP5*.
3. Identificar variantes antigénicas de VP4.
4. Determinar las regiones genéticas en VP4 asociadas a la generación de mutantes que escapan al reconocimiento por anticuerpos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente trabajo se emplearon muestras de heces pertenecientes a niños con gastroenteritis que escapaban a la detección por anticuerpos contra VP8* recombinante. Estas muestras fueron colectadas de niños menores de 5 años en dos hospitales de la ciudad de Chihuahua, Chihuahua durante el periodo del 2004-2011. Se seleccionaron 98 muestras positivas para Rotavirus por Rotaforesis. Para la elaboración de anticuerpos policlonales se empleó la muestra de heces negativa a rotavirus que presentó reactividad negativa a los anticuerpos anti-VP8* que contenía 100% de identidad en la secuencia de aminoácidos de VP8* de otras muestras analizadas con estos anticuerpos, esta subunidad fue inoculada un modelo animal (Murino) para la producción de anticuerpos y posteriormente fueron evaluados mediante ELISA, Dot-Blot y Western Blot. Finalmente, estos anticuerpos fueron empleados para determinar la relación antigénica de las variantes genéticas circulantes en la población infantil.

6.1 Extracción de RNA viral.

Se realizó la extracción de RNA de rotavirus a muestras de heces de niños con gastroenteritis, mediante TRI REAGENT (trizol). Para la obtención del RNA, se preparó una suspensión de heces al 20% en PBS utilizando tubos de microcentrífuga de 1.5 mL. Posteriormente, la suspensión se centrifugó a 14,000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante fue colocado en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. A cada tubo se le añadieron 500 μ L de trizol, se agitó 10 veces por inversión y se incubó en hielo durante 5 min. Posteriormente, se adicionaron 100 μ L de cloroformo y fueron agitados por inversión 10 veces. Los tubos fueron incubados en hielo 3 min y después centrifugados a 12,000 rpm por 15 min a 4⁰C. La fase acuosa fue transferida a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL limpio previamente etiquetado, y luego se adicionaron 400 μ L de alcohol isopropílico. Se mezclaron 5 veces por inversión y los tubos se mantuvieron a -20⁰C durante toda la noche. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 12,000 rpm por 15 min a 4⁰C, y se retiró el alcohol isopropílico utilizando una micropipeta de 200 μ L dejando aproximadamente los últimos 50 μ L en el tubo. Se adiciono 1 mL de alcohol etílico absoluto (frío), se mezcló por inversión 5 veces y se centrifugo a 12,000 rpm por 7 minutos a 4⁰C. Al paquete

resultante se le adicionó 1 mL de alcohol etílico al 75% (frío), se mezcló por inversión 5 veces y se centrifugo a 12,000 rpm por 5 minutos a 4°C. Finalmente se eliminó completamente el alcohol etílico, y el RNA viral se resuspendió con 20 µL de agua nanopura (libre de sales) estéril y se almacenó a -20°C hasta su uso.

6.2 Electroforesis de RNA.

La electroforesis del RNA purificado se realizó en un gel de poliacrilamida 10%. El gel de poliacrilamida se colocó a un corrimiento constante a 100 Volts por 5 horas posteriormente, el gel se sometió a una tinción con nitrato de plata para visualizar el patrón electroforético de RNA característico de rotavirus. Terminada la electroforesis, el gel de poliacrilamida se depositó en 100 mL de una solución fijadora por 30 minutos; después se retiró esta solución y se añadió 100 mL de nitrato de plata 1X, manteniendo el gel en condiciones de obscuridad por 30 minutos. Se retiró el nitrato de plata y se realizaron 3 lavados con agua bidestilada. Posteriormente se adicionaron 100 mL de una solución reveladora permaneciendo el gel en esta solución hasta por 10 minutos, hasta que las bandas del RNA viral fueron visibles. Se retiró la solución reveladora y se adicionaron 50 mL de una solución de ácido acético 5% por 3 minutos. Posteriormente, el gel se lavó 3 veces con agua bidestilada para su conservación.

6.3 Obtención del cDNA de la subunidad VP5*

El RNA viral purificado se sometió a una transcripción inversa con la enzima transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV Reverse Transcriptase[®], (Promega). En este proceso, se empleó el oligonucleótido en sentido VP4 1F (5'-GGCTATAAAATGGCTTCGC -3') diseñado en el laboratorio. El protocolo de la reacción fue en un volumen final de 15 µL. En tubos de microcentrífuga de 0.2 mL se mezclaron 3.75 µL de RNA purificado y 1.5 µL de primer VP4 1F 1 µM. Esta mezcla se colocó en un termociclador (TERMOHYBAID *PCR sprint*) a 94°C por 5 minutos, y después se incubó en hielo. Posteriormente se adicionó una segunda mezcla de reactivos conteniendo 3.0 µL de Buffer RT 5X (Promega), 4.8 µL de una mezcla de dNTP's (ATP,

GTP, CTP, TTP) a una concentración de 2.5 mM cada uno y 0.45 μL de enzima RT 1000 U/ μL (Promega). Los tubos se colocaron en el termociclador a 42⁰C por 60 minutos, seguido de 5 minutos a 94⁰C. Al finalizar el tiempo de reacción, los productos de RT-PCR fueron almacenados a -20⁰C hasta su uso.

6.4 Amplificación de la subunidad VP5*

El cDNA obtenido se sometió a una reacción de PCR utilizando la enzima DNA polimerasa BIOLASE (BIOLINE). Los oligonucleótidos utilizados fueron: VP5F 5'-CACGGATCCCCACCAATTCAAATACTAGA-3' (sentido) y VP5R 5'-CACGTCGACCTCACAACCTTACATTGTAG -3' (anti sentido) los cuales fueron diseñados en el laboratorio. La mezcla de reactivos para una reacción se realizó en tubos de microcentrífuga de 0.2 mL conteniendo 1.5 μL de cDNA, 2.5 μL de Buffer NH₄ 10X, 0.76 μL de MgCl₂ 50mM, 0.5 μL de cada oligonucleótido (VP5F y VP5R) a una concentración de 25 μM cada uno, 4.0 μL de una mezcla de dNTP's a una concentración de 2.5mM cada uno, 0.25 μL de enzima DNA polimerasa 5 U/ μL y 14.99 μL de agua nanopura estéril para completar un volumen final de 25 μL .

Posteriormente la mezcla se colocó en un termociclador (TERMOHYBAID *PCR sprint*) y se realizó la amplificación con un programa de 30 ciclos: 95⁰C/30 seg, 42⁰C/30 seg, 72⁰C/40 seg. finalmente se añadió un tiempo de extensión de 15 minutos. Para analizar la amplificación del producto de PCR, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, a 100 Volts constantes por 50 minutos. El gel de agarosa fue teñido con bromuro de etidio durante 15 minutos y se reveló mediante luz ultravioleta en el UVP, Transilluminator.

6.5 Clonación de la subunidad VP5*.

La clonación del producto de PCR de 1659 pb del gen 4 de rotavirus que codifica para la subunidad VP5* se realizó en el plásmido pGEM-T mediante el Kit de Clonación pGEM-T Vector System (Promega). El producto de PCR fue sometido a una electroforesis en gel de agarosa Low Melting 1.5% a 100 Volts por 50 minutos hora, seguida de una

tinción con bromuro de etidio por 15 minutos. Utilizando una lámpara de luz ultravioleta (UVP, Transilluminator) con baja intensidad se cortó el fragmento de la banda de interés. Estos fragmentos se depositaron en un tubo de centrifuga y posteriormente se purificaron empleando el Kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (Promega).

6.6 Ligación del producto de PCR y plásmido pGEM-T

Para obtener el plásmido pGEM-T con el inserto de 1678 pb, se realizó una mezcla de reacción de ligación en tubos de microcentrifuga de 0.2 mL. Para una reacción, se mezclaron 5.0µL de Buffer T4 DNA Ligasa 2X (Promega), 0.5µL de plásmido pGEM-T (50ng/ µL), 82.95 ng de producto de PCR purificado, 1.0 µL de enzima T4 DNA Ligasa 3 U/ µL y se añadió el volumen restante de agua nanopura estéril para obtener un volumen final de 10.0 µL. Los tubos se incubaron a 4°C toda la noche.

6.7 Transformación de *E.coli* DH5α competentes

Para la transformación de células de *E.coli* DH5α competentes se mezclaron 100 µL (1.2×10^8) de bacterias y 10 µL de la reacción de ligación en un tubo de centrifuga de 0.2 µL. Se agitó suavemente el tubo y se incubó en hielo durante 30 minutos. El tubo fue colocado en un baño de agua previamente calentado a 42°C por 90 segundos e inmediatamente se incubó en hielo por 2 minutos. Se adicionaron 450 µL de medio de cultivo SOC atemperado a 37°C. Se transfirieron a un tubo de ensaye estéril de 13X100. Las bacterias se incubaron a 37°C con agitación a 200 rpm durante 1 hora. Posteriormente se centrifugó un instante a 10,000 rpm en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL. Se retiró el medio de cultivo y el pellet de bacterias fue resuspendió en 50 µL de medio de cultivo SOC. Los 50 µL de bacterias transformadas fueron inoculados en una caja de Agar LB-Ampicilina (50 µL/mL) con un asa triangular. Las cajas se incubaron a 37°C por 12 a 16 horas.

6.8 Purificación de plásmidos de bacterias transformadas

Para realizar la extracción y purificación de plásmidos de bacterias transformadas, se inocularon las colonias de bacterias en tubos de ensayo de 13X100 con 3 mL de Caldo LB/Ampicilina (50 µg/mL) utilizando palillos de madera estériles. Estos tubos se incubaron a 37°C con agitación de 200 rpm por toda la noche. Posteriormente en condiciones de esterilidad se tomaron 2 mL de cultivo de bacterias y se transfirieron a tubos de microcentrifuga de 1.5 mL. Los tubos se centrifugaron a 8,000 rpm por 5 minutos y se retiró el medio de cultivo. La purificación de plásmidos se realizó a partir del pellet de bacterias utilizando el Kit Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System (Promega) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

6.9 Análisis de plásmidos purificados

Para determinar la presencia del inserto de interés en el plásmido pGEM-T se analizó el DNA plasmídico (DNAP) mediante un ensayo de PCR y una reacción de restricción con las enzimas de restricción *Bam*H I y *Sal* I.

El análisis de PCR se realizó empleando los oligonucleótidos específicos de la regio codificante de VP5* (VP5F y VP5R), la mezcla de reactivos para una reacción se realizó en tubos de microcentrífuga de 0.2 mL conteniendo 1.5 µL de DNAP, 2.5 µL de Buffer NH₄ 10X, 0.76 µL de MgCl₂ 50mM, 0.5 µL de cada oligonucleótido (VP5F y VP5R) a una concentración de 25 µM cada uno, 4.0 µL de una mezcla de dNTP's a una concentración de 2.5mM cada uno, 0.25 µL de enzima DNA polimerasa 5 U/µL y 14.99 µL de agua nanopura estéril para completar un volumen final de 25 µL. Posteriormente la mezcla se colocó en un termociclador (TERMOHYBAID *PCR sprint*) y se realizó la amplificación con un programa de 30 ciclos: 95⁰C/30 seg, 42⁰C/30 seg, 72⁰C/40 seg. finalmente se añadió un tiempo de extensión de 15 minutos. Para analizar la amplificación del producto de PCR, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, a 100 Volts constantes por 50 minutos. El gel de agarosa fue teñido con bromuro de etidio durante 15 minutos y se reveló mediante luz ultravioleta en el UVP, Transilluminator.

Para realizar el análisis de restricción, el DNAp se mezcló las enzimas de restricción *BamH I* y *Sal I* simultáneamente. La mezcla de reactivos para una reacción se realizó en tubos de microcentrífuga de 0.6 mL utilizando 0.5 µL del buffer E 10X de la enzima *BamH I* (Promega), 1000 µgr de DNAp purificado, 0.5 µL de enzima *BamH I* 10 U/ µL (Promega), 0.5 µL de enzima *Sal I* 10 U/ µL (Promega) y agua nanopura estéril para completar un volumen final de 10.0 µL. La mezcla de reactivos se incubó a 37°C por 1.0 horas y posteriormente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1.5%, a 100 Volts constantes por 50 minutos. El gel fue teñido con bromuro de etidio por 15 minutos y fue revelado con luz ultravioleta (UVP, Translluminator).

6.10 Secuenciación de la subunidad VP5*.

Las clonas de bacterias *E. coli* DH5α con el plásmido pGEM-T/VP5* se inocularon en tubos de ensaye de 13X100 con 3 mL de caldo LB/Ampicilina (50 µg/mL) y fueron incubados a 37°C con agitación a 200 rpm toda la noche. Posteriormente se purifico todo el cultivo de bacterias (3 mL), utilizando el Kit Wizard^R Plus SV Miniprep DNA Purification System (Promega) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Posteriormente se realizó una electroforesis de los plásmidos en gel de agarosa 1%, a 100 Volts constantes por 1 hora, para verificar la integridad del DNAp. Después, se cuantifico el DNAp mediante Nanodrop.

La concentración final de DNAp para enviar a secuenciar fue ajustada a 750 ng/ µL en agua nanopura estéril. La secuencia de nucleótidos fue realizada en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM, en Cuernavaca, Morelos, mediante el método basado en fluorescencia Taq FS Dye Terminador, utilizando el secuenciador ABIPRISM 310TM Genetic Analyzer.

6.11 Análisis de la secuencia interna de la subunidad VP5*

La secuencia de nucleótidos que se obtuvo por el método antes descrito proporciona una eficiencia de la lectura de nucleótidos de alrededor de 700 nucleótidos. Por lo tanto, se mandó secuenciar la región interna de la secuencia de nucleótidos de la

subunidad VP5* de rotavirus empleando el mismo método que se utilizó para la subunidad completa utilizando los primers VP5iF ‘5- CACGGATCCCATTATGGAAAGAAATGC -3’ y VP5iR 5’-CACGTCGACCATTTGAAACATTAGTCC -3’. Este par de oligonucleótidos flanquean una región de 1029 pb (Figura 1)

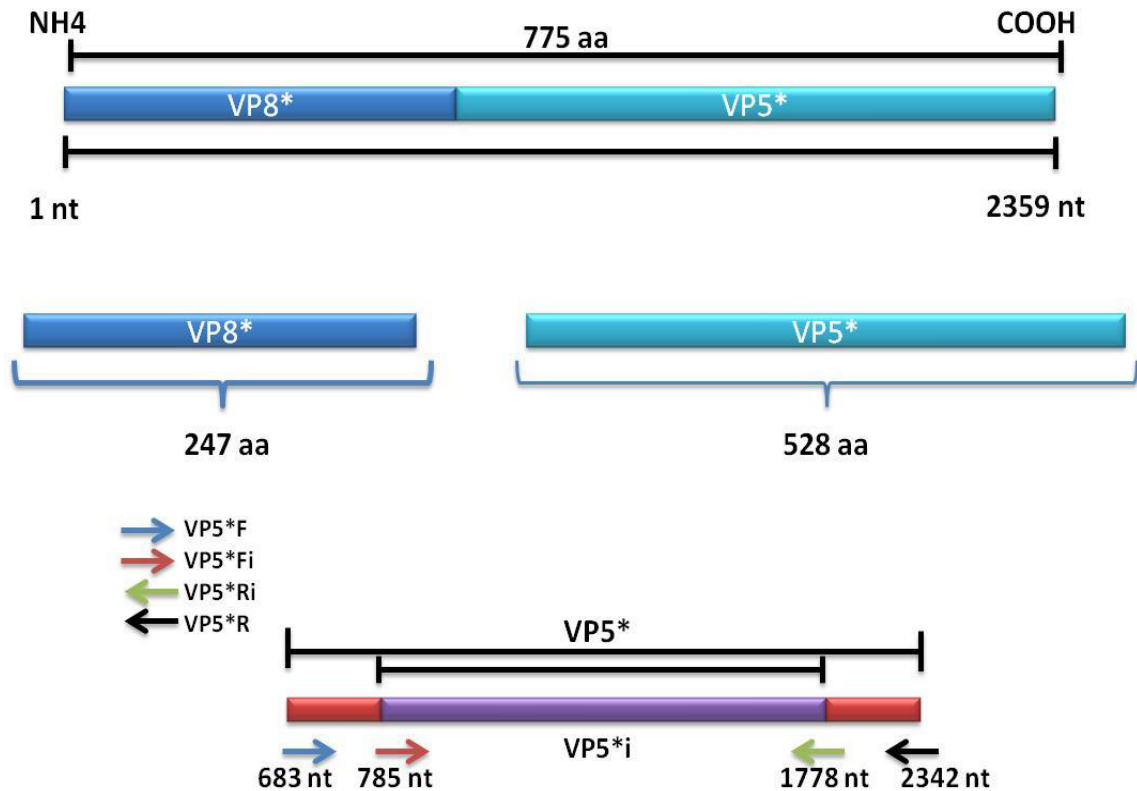


Figura 1. Esquema general del diseño de primers para la secuenciación de la subunidad VP5* de rotavirus.

6.12 Análisis de la secuencia de nucleótidos de la subunidad VP5*

Las secuencias de nucleótidos de las cepas de campo se analizaron empleando la herramienta BLAST nucleotide (NCBI) para comprobar que la región flanqueada corresponde a Rotavirus. En seguida, se realizó una comparación de la secuencia de nucleótidos y la secuencia deducida de aminoácidos utilizando el programa CLUSTAL W/BioEdit Sequence Alignment Editor v7.0 (Hall, 1999).

6.13 Subclonación

6.13.1 Preparación del inserto y plásmido de expresión

El plásmido pGEM-T/VP5* y el plásmido de expresión pET28 (a) fueron digeridos utilizando las enzimas de restricción BamH I y Sal I. La mezcla de reactivos se realizó en tubos de microcentrífuga de 0.6 mL utilizando el mismo protocolo previamente descrito para el análisis de DNAs purificados. La mezcla de reactivos fue incubada a 37°C por 1.0 horas y posteriormente se realizó una electroforesis de todo el volumen de reacción de restricción en gel de agarosa 1.5 % low melting a 100 volts constantes por 1 hora. El gel fue teñido con bromuro de etidio por 15 minutos y la banda correspondiente fue visualizada en un transiluminador UV (UVP, Translluminator). Observando con intensidad de luz UV baja se cortó el fragmento de gel que corresponden a la región de VP5* liberado del plásmido pGEM-T y el plásmido pET28 (a) linealizado. Los fragmentos del gel fueron depositados en un tubo de microcentrífuga y se purificaron con el Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (Promega). El inserto con extremos cohesivos BamHI/SalI y pET28 (a) linealizado se almacenaron a -20°C hasta su uso.

6.13.2 Ligación del producto de PCR y plásmido pET-28a (+)

En un tubo de centrifuga de 0.2 mL, se preparó la siguiente mezcla de reacción: 1.0 µL de Buffer T4 DNA Ligasa 2X (Promega), 46.9 ng de inserto, 50 ng de plásmido pET-28a (+) lineal), 1.0 µL de enzima T4 DNA Ligasa 10U/ µL (Invitrogen) y agua nanopura estéril para completar un volumen final de 10.0 µL. La reacción de ligación fue incubada a 4 °C toda la noche.

6.13.3 Transformación de *E.coli* DH5a competentes

Las bacterias se transformaron utilizando el protocolo previamente descrito utilizando los 10 µL de reacción de ligación. Las bacterias transformadas se inocularon en

una caja de Agar LB/Kanamicina (50 µg/mL) y se incubaron a 37 °C por 12 horas. El DNAp de las clonas transformadas fue purificado utilizando el Kit Wizard Plus SV Minipeps DNA System de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (Promega) y mediante una reacción de restricción y/o PCR se analizó la presencia de inserto de VP5* (1659 pb) utilizando la metodología (sección 5.2.3).

6.13.4 Transformación y análisis de *E.coli* BL21 (DE3) competentes.

La transformación de bacterias de *E.coli* BL21 (DE3), se realizó mezclando en un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL, 100 µL de bacterias y 1.0 µL de plásmido pET-28/VP5*. Después se continuó con el protocolo de transformación descrito para las bacterias *E.coli* DH5α. Las bacterias transformadas se inocularon en Agar LB/Kanamicina (50 µg/mL) y se incubaron a 37°C por 12 horas. El DNAp de las bacterias BL 21 (DE3) transformadas con el plásmido pET28/VP5* se purifico bajo el protocolo empleado en pasos anteriores.

6.13.5 Inducción de la expresión de proteínas recombinantes

Tres asadas del cultivo de bacterias BL21 (DE3) transformadas se inocularon en tubos de ensaye 13X100 con 3 mL de caldo LB/Kanamicina (50 µg/mL), y se incubaron a 37°C con agitación de 200 rpm durante la noche. Posteriormente, se inocularon 120 mL de caldo LB (sin antibiótico) con 1.2 mL de cultivo de bacterias durante toda la noche, realizando una dilución 1:100, las bacterias se mantuvieron en agitación a 250 rpm a 37°C por 2 horas. Posteriormente se monitoreó la densidad óptica del cultivo y se tomó una alícuota de 1 mL para medir la absorbancia de 590 nm. El matraz continuó en agitación constante hasta que la densidad óptica alcanzó entre 0.4-0.6 de Absorbancia. Cuando el cultivo presente la densidad requerida, fue suspendida la incubación un instante para tomar una alícuota de 10 mL de cultivo, el cual se utilizó como control de bacterias no inducidas, esta alícuota permaneció almacenada a 4°C. Al resto del cultivo se le adicionó IPTG a una concentración final de 1 mM para inducir la expresión de la proteína VP5* recombinante. Se continuó con la incubación a 37°C con agitación de 250 rpm por 5 horas.

Las bacterias inducidas y las no inducidas se transferirán a tubos cónicos de 50 mL y se centrifugaron a 5,000 rpm a 4°C por 10 minutos. El caldo LB fue decantado y el pellet de bacterias se pesó para resuspenderlo en el buffer Binding. Por cada gramo de pellet de bacterias, se adicionaron 10 mL de este buffer. Las bacterias resuspendidas se almacenaron a 20°C hasta su uso.

6.13.6 Lisis bacteriana

La proteína VP5* en las bacterias BL21 (DE3) son producidas en el citoplasma, por lo cual, se realizó un análisis de las bacterias en dos etapas. Primero se comenzó la lisis enzimática con lisozima de clara de huevo (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 0.2 mg/mL, agitándose por 30 minutos a temperatura ambiente. El extracto de las bacterias fue dispensado en alícuotas de 1 mL en tubos de centrifuga de 1.5 mL. Para realizar una lisis mecánica se empleó un sonicador durante 15 minutos. Para disolver los posibles cuerpos de inclusión que se formen por la producción de proteínas recombinantes que impedían que se solubilizara la proteína se adicionaron al extracto de bacterias urea a una concentración final de 8 M. Los extractos de las bacterias se mantuvieron a 4°C hasta su uso.

6.14 Análisis de Proteínas recombinantes

6.14.1 SDS-PAGE de los lisados bacterianos

Se realizó una electroforesis de proteínas en geles discontinuos de poliacrilamida (gel concentrador 4%; gel separador al 11%) en condiciones desnaturizantes de los lisados para analizar la presencia de la proteína recombinante. La electroforesis se realizó a 10 mA constantes por 20 minutos y a 20 mA constantes por 40 minutos. El gel se tiñó con Azul de Coomassie durante toda la noche.

6.14.2 Western-blot

Para identificar la presencia de la subunidad VP5* recombinante (rVP5*) que mantendrían sus características antigénicas, se realizó un ensayo de Western-blot utilizando anticuerpos anti-Rotateq inducidos en conejo y un anticuerpo monoclonal anti-VP5* (1A10). Los lisados bacterianos/rVP5* se sometieron a una electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) en geles discontinuo de poliacrilamida (gel concentrador 4%; gel separador al 12%) utilizando las mismas condiciones de electroforesis. Posteriormente se realizó la transferencia de proteínas a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 micras (Sigma-Aldrich) a 60 volts constantes por 3 horas. Al terminar este tiempo, la membrana de nitrocelulosa se lavó rápidamente con PBS y se incubó a temperatura ambiente y agitación de 80 rpm por 1 hora en PBS-Tween 2%, posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS y se añadieron los anticuerpos primarios incubándose a 4°C toda la noche. Al siguiente día la membrana se lavó tres veces con PBS-Tween 0.01 % por espacio de 10 minutos cada lavado. En seguida se adicionó la proteína A unida a peroxidasa de rábano (Amersham) en una dilución 1:2000 y se incubó a 37°C por 1 hora con agitación constante (80 rpm). La membrana se lavó tres veces y después se adicionaron 1 mL de sustrato TMB (PROMEGA) mezclando suavemente hasta que observemos la aparición de las bandas positivas de color Azul. La reacción se detuvo lavando la membrana con agua destilada.

6.15 Purificación de proteínas recombinantes

6.15.1 Cromatografía de afinidad

Se realizó mediante una cromatografía de afinidad utilizando las columnas de purificación HisTrap FF Crude (GE Healthcare), debido a que las proteínas recombinantes presentaran 6 Histidinas en tándem en el extremo amino. La cromatografía se realizó bajo condiciones desnaturizantes por lo que los reactivos utilizados contenían urea a una concentración final de 4M. Para realizar la cromatografía, primero se lavó una columna nueva con 20 mL de agua bidestilada para eliminar el etanol 20% (solución de

almacenaje); después se adicionaron 10 mL de buffer B2 para equilibrar la columna. Posteriormente se transfirió todo el volumen de extracto de bacterias lisadas previamente ajustado a un pH de 7.4. Se colocó todo el eluente para posteriores purificaciones. En seguida se lavó con 20 mL de buffer B3 para eliminar la unión inespecífica de proteínas bacterianas y después se adicionaron 5 mL de buffer de elución colectándose 5 fracciones cromatografías de 1 mL cada una en tubos de microcentrifuga de 1.5 mL. Por último, se aplicaron 10 mL de buffer B2 para lavar y equilibrar la columna. Las fracciones cromatografías y las columnas de afinidad se almaceno a 4°C hasta su uso.

6.15.2 Electroelución

La electroelución de la subunidad VP5* de rotavirus se realizó a partir de ocho SDS-PAGE de los lisado bacterianos/VP5*. La banda correspondiente al tamaño de la subunidad rVP5* de rotavirus fue retirada con un bisturí y colocada en el microelutor (Biorad) en buffer de transferencia a 100 Volts durante 2 horas. Posteriormente la proteína electroeluida fue succionada por vacío y colocada en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL limpios y estériles. La rVP5* electroeluida fue concentrada empleando Acetona 80% incubándose a -20 °C toda la noche. Posteriormente los tubos con la proteína se centrifugaron a 12, 000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Finalmente, se realizaron 3 lavados con PBS para retirar los residuos de acetona y el pellet se resuspendió en buffer binding/Urea 8M. La proteína se guardó a 4°C hasta su uso.

6.16 Esquema de inmunización de ratones con proteínas recombinantes de rotavirus humano

Se obtuvo sangre de los conejos y ratones antes de iniciar la inmunización y el suero se analizó por ELISA/Dot-Blot. Después del análisis, se comenzó con la inmunización de la siguiente manera: 3 inoculaciones vía intraperitoneal con intervalo de 8 días, la primera con Adyuvante completo de Freud (FAC) y las siguientes con Adyuvante incompleto Freud (FAI). El inoculo será de un volumen final de 300 µL; 150 µL de adyuvante correspondiente y 150 µL de la VP5* recombinante. Después de estas

inoculaciones el suero se analizó por ELISA y Dot-Blot. Se realizó el sangrado final a los 30 días.

6.17 Ensayo de ELISA

Placas de 96 pozos fueron sensibilizadas con anticuerpos policlonales de cabra anti-VP5* diluidos en buffer de carbonato-bicarbonato pH 9.6 las cuales se incubaron a 4°C toda la noche. Antes del lavado con Buffer Salino de Fosfatos (PBS), las placas se bloquearon con una solución de leche descremada 5 % en PBS-Tween 0.1% a 37°C durante 1.5 horas. Después de 4 lavados con PBS-Tween 0.1 %, se le adicionó una suspensión de heces al 20 % de niños con gastroenteritis y se incubaron a 37° C durante 2 horas. Después de 4 lavados se adicionó anti-VP5* policlonal de conejo y se incubó a 37°C por 1 hora. Luego de 4 lavados se adicionaron 75 µL de Proteína A-Peroxidasa de rábano (Amersham) diluida 1:2,500 y se incubara a 37°C por 1 hora. Se retiró la proteína A-HRP, se lavó 4 veces y se adicionaron 100 µL de sustrato ABS (Zymed) preparado en buffer de citratos 0.1M pH 4.1. Se incubó a 37°C por 3° minutos. La reacción colorimétrica se midió en un lector de ELISA (Digital and Analog Systems S.R.L modelo A2) a una longitud de 595 nm. El criterio para determinar el título de anticuerpos IgG contra las proteínas recombinantes fue la dilución del suero, cuando la absorbancia sea 2 veces mayor al promedio de la absorbancia del control negativo (Contreras *et al.*, 2011).

7. RESULTADOS

Este estudio fue enfocado a determinar las variaciones genéticas en la proteína de superficie VP4 de Rotavirus tipo A y su posible influencia a niveles antigénicos. El objetivo fue identificar las mutaciones no sinónimas en subunidad VP5* y evaluar el efecto de estos cambios en el reconocimiento de cepas de rotavirus circulantes en la población infantil por anticuerpos policlonales contra esta subunidad. Para lograr este objetivo se empleó la colección de muestras diarreicas proporcionada por la coproteca de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua de un periodo de colecta comprendido del 2004 al 2011.

7.1 Muestras de heces

Las 98 muestras seleccionadas para estudio proceden de niños menores de 5 años con un cuadro de gastroenteritis, procedentes de dos hospitales de la ciudad de Chihuahua durante el 2004-2011.

7.2 Evaluación y selección de muestras

Para la secuenciación de la subunidad VP5* se procedió a realizar previamente un análisis *in-silico* de la distribución de mutaciones entre la subunidad VP8* de rotavirus circulantes en la ciudad de Chihuahua que mostraron anteriormente una reactividad positiva o negativa por anticuerpos policlonales específicos de genotipo P[8] o P[4] y la cepa de rotavirus Wa. Este análisis se realizó a partir de 33 muestras previamente reportadas en el GeneBank (JX012330 al JX012347). El estudio entre las secuencias de la subunidad VP8* mostro 58 variaciones de aminoácidos entre cepas con genotipo P[8] y P[4]. El análisis de los cambios encontrados identifico 37 sustituciones de aminoácidos con propiedades similares. Entre los aminoácidos con cambios, se identificaron 15 cambios de carga (Y19H, E28K, T75K, N89D, N113T/D/S, D116N, S131R/E, D133E/S, D135N, N160D, N193D, C215R, K245R/T/N, N250K y E251K), mientras que 6 cambios de residuos con implicaciones estructurales (flexibilidad o constricción conformacional) de las proteínas (G38S, P71S, P114Q, G145S, G195N y P236S). Por otro lado la comparación de los principales epítopes con capacidad neutralizantes reportados para esta subunidad entre P[8] y P[4] se identificaron diferencias entre 3 de los 4 epitopes. Este

análisis mostro en los epítopes 8-1 y 8-3 cambios de 5 y 8 aminoácidos respectivamente, mientras que solo el genotipo P[4] mostraba diferencias en el epitope 8-4 (Tabla 1).

Tabla 1. Alineamiento de los residuos de aminoácidos en los epítopes antigénicos en VP8* de rotavirus circulantes en el norte de México y la vacuna rotarix

Numero de acceso Genebank	Cepas	8-1										8-2					8-3					8-4						
		100	146	148	150	188	190	192	193	194	195	196	180	183	113	114	115	116	125	131	132	133	135	87	88	89		
ACN29984	Rotarix-P[8]-1	D	S	S	N	S	S	S	A	N	L	N	N	N	E	R	N	P	V	D	S	S	N	D	N	N	T	N
ACN29985	W-a-P[8]-1	D	S	S	N	S	S	S	A	N	L	N	N	N	E	R	N	P	V	D	S	S	N	D	N	N	T	N
ACN29986	MX04-29-P[8]-1	T
AFN88489	MX05-43-P[8]-3	G	N	G	N	R	.	.	D	.	.	.
ACN29988	MX05-51-P[8]-3	G	N	.	.	.	G	N	R	.	.	D	.	.	.
AFN88489	MX05-54-P[8]-1	T	E
ACN29988	MX05-68-P[8]-3	G	N	.	.	.	G	N	R	.	.	D	.	.	.
ACN29987	MX05-87-P[8]-3	G	N	.	.	.	G	N	R	.	.	D	.	.	.
AFN88490	MX05-100-P[8]-1	T
AFN88491	MX05-227-P[8]-3	G	N	.	.	.	G	N	R	.	.	D	.	.	.
AFN88492	MX05-276-P[8]-1	G	T
ACN29989	MX07-531-P[8]-3	G	N	.	.	.	G	D	.	.	N	N	R	.	.	D	.	.	.
ACN29990	MX07-532-P[8]-3	G	N	.	.	.	G	D	.	.	N	N	R	.	.	D	.	.	.
AFN88493	MX07-550-P[8]-3	G	N	.	.	.	G	D	.	.	N	N	R	.	.	D	.	.	.
AFN88494	MX07-553-P[8]-3	G	N	.	.	.	G	D	.	.	N	N	R	.	.	D	.	.	.
ACN29991	MX07-554-P[8]-3	G	N	.	.	.	G	D	.	.	N	N	R	.	.	D	.	.	.
ACN29992	MX07-555-P[8]-3	G	N	.	.	.	G	D	.	.	N	N	R	.	.	D	.	.	.
ACN29993	MX07-557-P[8]-3	G	N	.	.	.	G	D	.	.	N	N	R	.	.	D	.	.	.
AFN88495	MX07-575-P[8]-1	T
AFN88496	MX07-577-P[8]-3	G	N	.	.	.	G	D	.	.	.	N	R	.	.	D	.	.	.
AFN88497	MX07-588-P[8]-3	G	N	.	.	.	G	D	.	.	.	N	R	.	.	D	.	.	.
AFN88498	MX07-623-P[8]-3	G	N	.	.	.	G	D	.	.	N	N	R	.	.	D	.	.	.
ACN29994	MX08-659-P[8]-3	G	N	.	.	.	G	D	.	.	.	N	R	.	.	D	.	.	.
ADU54595	MX08-674-P[8]-3	G	N	.	.	.	G	D	.	.	.	N	R	.	.	D	.	.	.
ADU54596	MX08-680-P[8]-3	G	N	.	.	.	G	D	.	.	.	N	R	.	.	D	.	.	.
ADU54597	MX08-737-P[8]-3	G	N	.	.	.	G	D	.	.	.	N	R	.	.	D	.	.	.
ACN29995	MX08-740-P[8]-3	G	N	.	.	.	G	D	.	.	.	N	R	.	.	D	.	.	.
AFN88499	MX05-216-P[4]-5	.	.	.	S	.	N	.	D	S	Q	T	N	N	E	.	S	D	.	D	.	
AFN88500	MX05-217-P[4]-5	.	.	.	S	.	N	.	D	S	Q	T	N	N	E	.	S	D	.	D	.	
AFN88501	MX05-234-P[4]-5	.	.	.	S	.	N	.	D	S	Q	T	N	N	E	.	S	D	.	D	.	
AFN88502	MX05-241-P[4]-5	.	.	.	S	.	N	.	D	S	Q	T	N	N	E	.	S	D	.	D	.	
AFN88503	MX05-271-P[4]-5	.	.	.	S	.	N	.	D	S	Q	T	N	N	E	.	S	D	.	D	.	
AFN88504	MX05-294-P[4]-5	.	.	.	S	.	N	.	D	S	Q	T	N	N	E	.	S	D	.	D	.	
AFN88505	MX06-300-P[4]-5	.	.	.	S	.	N	.	D	S	Q	T	N	N	E	.	S	D	.	D	.	
AFN88506	MX06-337-P[4]-5	.	.	.	S	.	N	.	D	S	Q	T	N	N	E	.	S	D	.	D	.	

##

Mientras que un análisis de frecuencias de 342 muestras del gen 4 de rotavirus publicadas de diferentes partes del mundo (Argentina, Australia, Bangladesh, Bélgica, Cameron, China, Alemania, India, Indonesia, Italia, Japón, Kenia, Corea, Malawi, Nepal, Nicaragua, Pakistán, Rusia, Eslovenia, África del sur, Tailandia, Túnez, Turquía, USA, Vietnam) en el GenBank mostraron los cambios de aminoácidos frecuentes entre las cepas de rotavirus, mostrando mayor variación en los epítopes de VP8* (Figura 2).

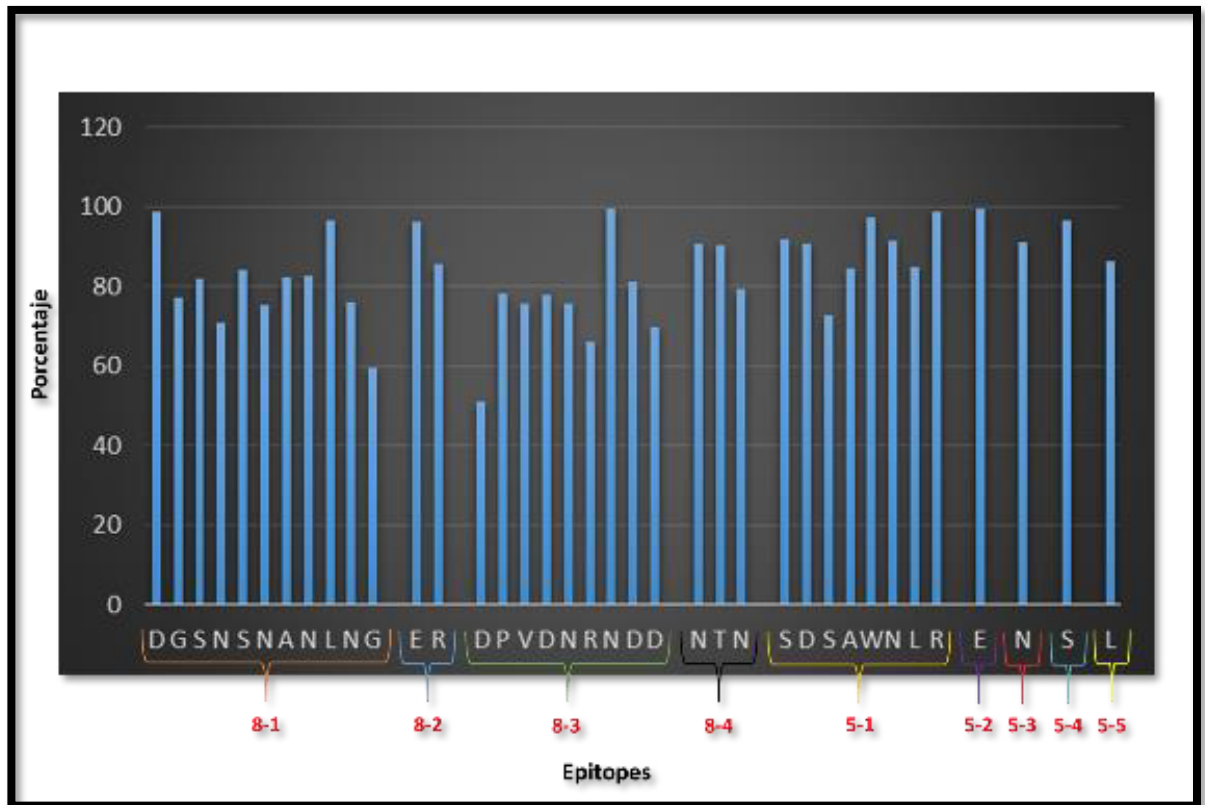


Figura 2. Frecuencia de mutaciones en los epítopes neutralizantes de la proteína VP4.

7.3 Análisis del RNA Viral

Seleccionadas las muestras a secuenciar, se procedió a realizar una extracción de RNA por el método de Trizol. Obtenido el RNA_{TOTAL} se realizó una rotaforesis para evaluar la integridad del RNA y determinar la presencia del genoma de rotavirus en las muestras seleccionadas (Figura 3). Posteriormente las muestras seleccionadas fueron cuantificadas con un nanodrop y almacenadas a -20°C hasta su uso.

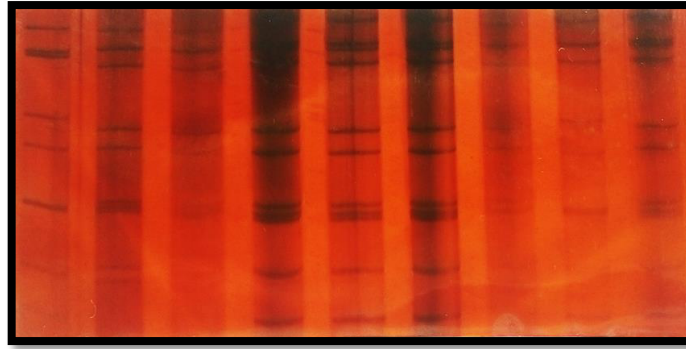


Figura 3. Electroforesis de RNA_{TOTAL} en gel de Poliacrilamida al 10 % extraído de diarreas de Rotavirus.

7.4 Secuenciación de la subunidad VP5*

El RNA_{TOTAL} de las muestras seleccionadas fue sometido a una RT-PCR con los primers VP5F/VP5R obteniendo un producto de 1659 pb correspondientes al fragmento de la proteína VP4 que codifica para la subunidad VP5*(Figura 4).

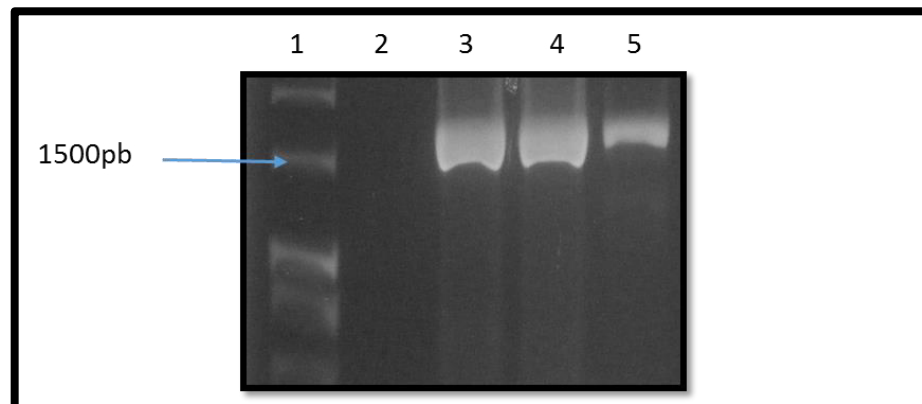


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa 1.5 % de RT-PCR de la subunidad VP5* de Rotavirus. Carril 1: Marcador de pares de base (MPB) HyperLadder I; Carril 2: Control negativo (agua miliQ); Carril 3: Muestra 623; Carril 4: Muestra 532; Carril 5: Muestra 217.

Una vez obtenido, el producto de 1659 pb fue sometido a una electroforesis en agarosa Low melting para su posterior purificación y ligación en el plásmido pGEM-T (Figura 5).

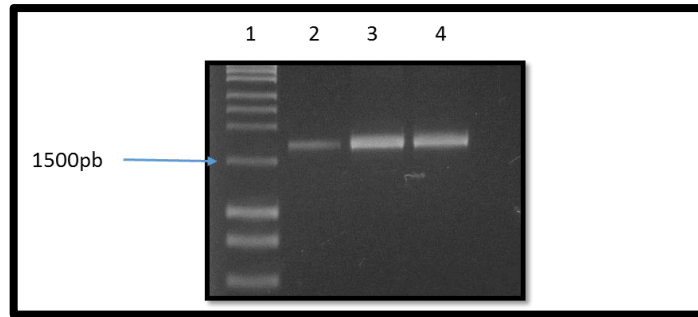


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa 1.5 % productos de PCR purificados de la subunidad VP5* de Rotavirus. Carril 1: Marcador de pares de base (MPB) HyperLadder I; Carril 2: Muestra 623; Carril 3: Muestra 532; Carril 4: Muestra 217.

Consecutivamente se transformaron bacterias *E. coli* DH5 α calcio competentes con el pGEM-T/VP5*, obteniendo a las 16 horas clonas resistentes a ampicilina (Figura 6). Posteriormente se procedió a purificar el DNA_{Plasmidico} (Figura 7).



Figura 6. Bacterias *E. coli* DH5 α transformadas con la reacción de ligación del plásmido pGEM-T y el inserto de la subunidad VP5* en medio LB/AMPICILINA.

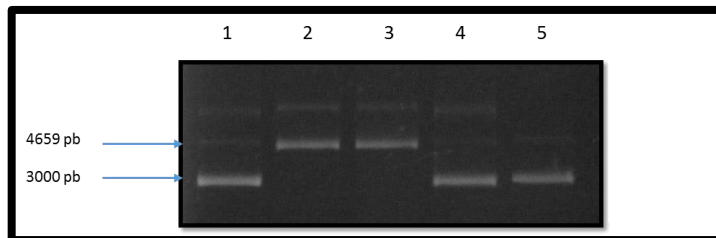


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa 1.0 % de DNA_{plasmidico} de bacterias *E. coli* DH5 α Carril 1: Plásmido pGEM-T sin inserto (control sin inserto); Carril 2: Plásmido clona 1; Carril 3: Plásmido clona 2; Carril 4: Plásmido clona 3; Carril 5: Plásmido clona 5.

Una vez purificado fue analizado mediante un ensayo de restricción empleando las enzimas *Bam*HI/*Sal*I (Figura 8) y por PCR utilizando los primers VP5F/VP5R (Figura 9).

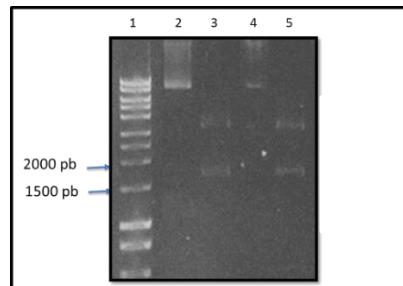


Figura 8. Ensayo de restricción en el plásmido pGEM-T/VP5*. Carril 1; Marcador de pares de base (MPB) HyperLadder I; Carril 2: Plásmido pGEM-T/VP5*532 sin cortar (control); Carril 3: Plásmido pGEM-T/VP5*532 cortado; Carril 4: Plásmido pGEM-T/VP5*217 sin cortar (control); Carril 5: Plásmido pGEM-T/VP5*217 cortado.

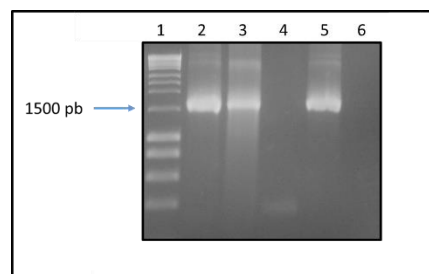


Figura 9. PCR de confirmación en el plásmido pGEM-T/VP5*. Carril 1: Marcador de pares de bases (MPB) HyperLadder I; Carril 2: Plásmido pGEM-T/VP5*532 C1; Carril 3: Plásmido pGEM-T/VP5*217; Carril 4: Plásmido pGEM-T/VP5*554; Carril 5: Plásmido pGEM-T/VP5*623; Carril 6: Control negativo (agua MiliQ).

7.5 Análisis de la secuencia de nucleótidos de la subunidad VP5*.

La secuencia de nucleótidos del producto de PCR de la subunidad VP5* se obtuvo a partir del cromatograma obtenido por pirosecuenciación de los extremos 5' y 3' en el IBT de la UNAM. Posteriormente los cromatogramas fueron analizados mediante el software Bioedit, observando los sitios de restricción de la enzima *Bam*HI (extremo 5') y *Sal*I (extremo 3') para posteriormente emplearse en la subclonación al plásmido de expresión (Figura 10 y 11).

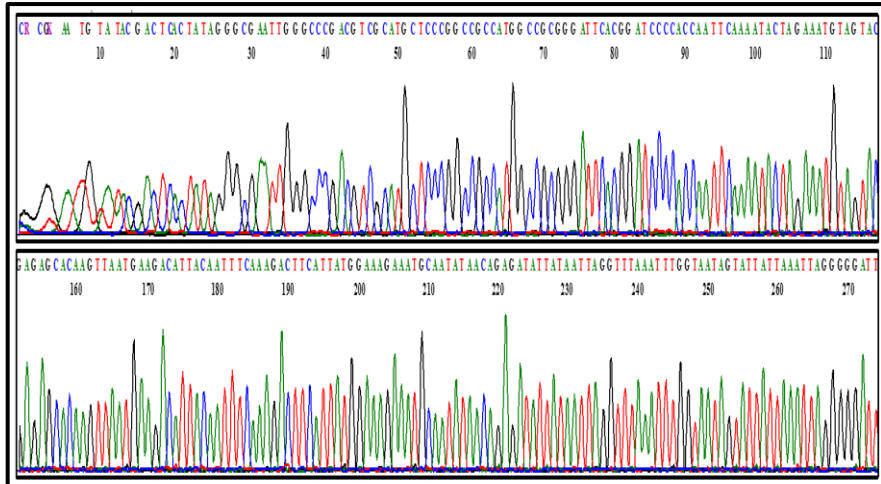


Figura 10. Identificación del sitio de restricción de la enzima *Bam*HI en el cromatograma en el extremo 5' de la subunidad VP5* de la muestra 554.

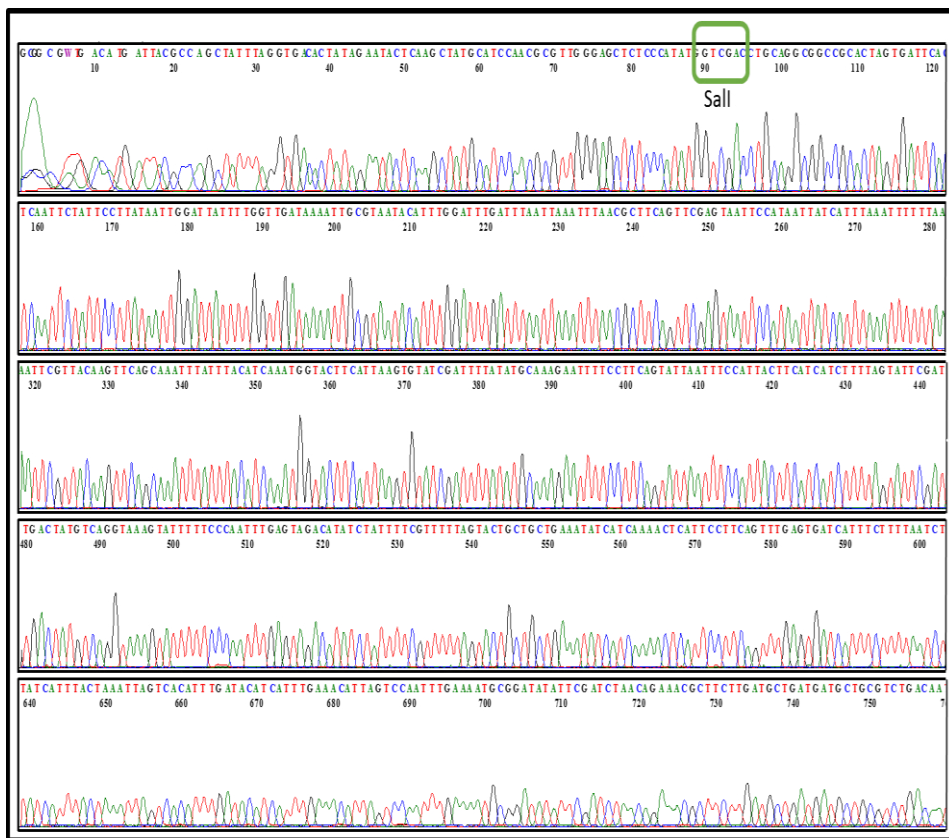
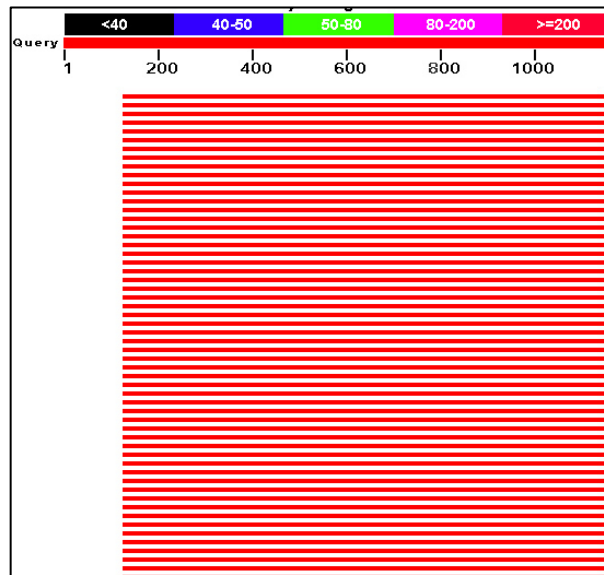


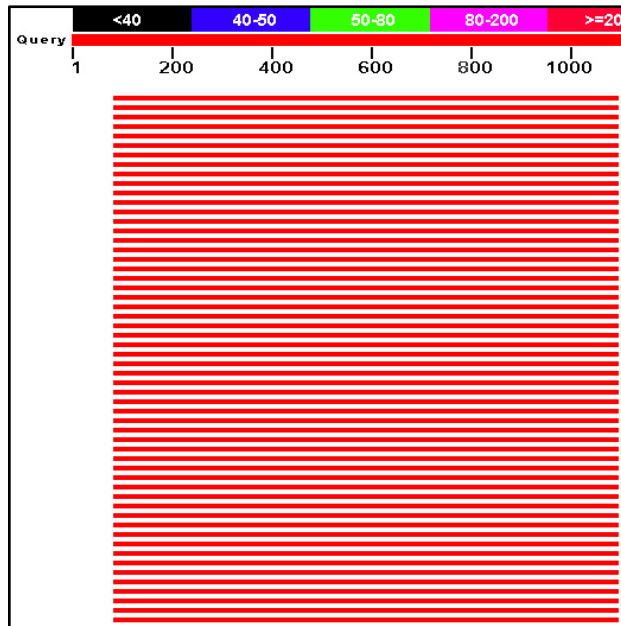
Figura 11. Identificación del sitio de restricción de la enzima *Sall* en el cromatograma en el extremo 3' de la subunidad VP5* de la muestra 554.

Ambas secuencias obtenidas de los extremos secuenciados de la subunidad fueron analizadas empleando la herramienta BLAST nucleotide (NCBI) y determinar la identidad de la secuencia obtenida mostrando rangos del 98-99% con las secuencias de VP4 ya publicadas en la base de datos (Figura 12 y Figura 13).



Accession	score	score	cover	value	ident	Accession
Rotavirus A human/Vanderbilt/VU06-07-7/2006/G1P[8] segment 4 outer capsid protein VP4 (VP4) gene, complete cds	1759	1759	88%	0.0	98%	JF490893.1
Rotavirus A human/Vanderbilt/VU05-06-69/2005/G1P[8] segment 4 outer capsid protein VP4 (VP4) gene, complete cds	1742	1742	88%	0.0	97%	JF490806.1
Human rotavirus G1P[8] strain SK438 outer capsid protein (VP4) gene, complete cds	1742	1742	88%	0.0	97%	EU839956.1
Human rotavirus A strain RVA/Human-wt/CAN/RT060-09/2009/G9P[8] spike protein (P) gene, complete cds	1736	1736	88%	0.0	97%	JQ069696.1
Human rotavirus G9P[8] strain DH396 outer capsid protein (VP4) gene, complete cds	1736	1736	88%	0.0	97%	EU839959.1
Rotavirus A strain RVA/Human-wt/BGD/Matlab36/2002/G11P[8] VP4 gene, complete cds	1714	1714	88%	0.0	97%	GU199506.1
Rotavirus A strain RVA/Human-wt/PRY/467/2000/G9P[8] segment 4 outer capsid spike protein VP4 (VP4) gene, complete cds	1709	1709	88%	0.0	97%	KJ626908.1
Rotavirus A human/Victoria/CK00012/2004/G1P[8] segment 4 outer capsid protein VP4 (VP4) gene, complete cds	1709	1709	88%	0.0	97%	JF490201.1
Rotavirus A human/Victoria/CK00009/2004/G1P[8] segment 4 outer capsid protein VP4 (VP4) gene, complete cds	1709	1709	88%	0.0	97%	JF490178.1
Rotavirus A human/Victoria/CK00002/2004/G1P[8] segment 4 outer capsid protein VP4 (VP4) gene, complete cds	1709	1709	88%	0.0	97%	JF490102.1
Rotavirus A human/Victoria/CK00001/2004/G1P[8] segment 4 outer capsid protein VP4 (VP4) gene, complete cds	1709	1709	88%	0.0	97%	JF490091.1
Rotavirus A strain RVA/Human-wt/ZAF/MRC-DPRU822/2005/G1P[8] segment 4 outer capsid spike protein VP4 (VP4) gene, complete cds	1703	1703	88%	0.0	97%	KJ751974.1
Rotavirus A strain RVA/Human-wt/PRY/472/2000/G9P[8] segment 4 outer capsid spike protein VP4 (VP4) gene, complete cds	1703	1703	88%	0.0	97%	KJ627130.1
Rotavirus A strain RVA/Human-wt/PRY/2SR/2002/G9P[8] segment 4 outer capsid spike protein VP4 (VP4) gene, complete cds	1703	1703	88%	0.0	97%	KJ626885.1
Rotavirus A strain RVA/Human-wt/PRY/469/2000/G9P[8] segment 4 outer capsid spike protein VP4 (VP4) gene, complete cds	1703	1703	88%	0.0	97%	KJ626674.1
Rotavirus A strain RVA/Human-wt/PRY/475/2000/G9P[8] segment 4 outer capsid spike protein VP4 (VP4) gene, complete cds	1703	1703	88%	0.0	97%	KJ626663.1
Rotavirus A human/Victoria/CK00006/2004/G1P[8] segment 4 outer capsid protein VP4 (VP4) gene, complete cds	1703	1703	88%	0.0	97%	JF490146.1
Rotavirus A strain RVA/Human-wt/PRY/468/2000/G9P[8] segment 4 outer capsid spike protein VP4 (VP4) gene, complete cds	1698	1698	88%	0.0	97%	KJ626821.1
Rotavirus A strain RVA/Human-wt/PRY/473/2000/G9P[8] segment 4 outer capsid spike protein VP4 (VP4) gene, complete cds	1698	1698	88%	0.0	97%	KJ626630.1
Rotavirus A strain RVA/Human-wt/PRY/464/2000/G9P[8] segment 4 outer capsid spike protein VP4 (VP4) gene, complete cds	1698	1698	88%	0.0	97%	KJ559348.1
Human rotavirus G1P[8] strain DH402 outer capsid protein (VP4) gene, complete cds	1698	1698	88%	0.0	97%	EU839958.1
Human rotavirus G2P[8] strain SK424 outer capsid protein (VP4) gene, complete cds	1698	1698	88%	0.0	97%	EU839954.1
Rotavirus A human/Vanderbilt/VU05-06-74/2005/G12P[8] outer capsid protein VP4 (VP4) gene, complete cds	1696	1696	88%	0.0	97%	JF790309.1
Human rotavirus A strain RVA/Human-wt/BRA/RJ12419/2006/G12P[8] VP4 (VP4) gene, complete cds	1692	1692	88%	0.0	97%	KF907291.1

Figura 12. Análisis de identidad de la secuencia de nucleótidos obtenida del cromatograma de la secuenciación del plásmido pGEM-T/VP5*-554 (extremo 5').



	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Rotavirus A human/Vanderbilt/VU06-07-7/2006/G1P[8] segment 4 outer capsid protein VP4 (VP4) gene_complete cds	1827	1827	85%	0.0	99%	JF490893.1
Rotavirus A human/Vanderbilt/VU05-06-69/2005/G1P[8] segment 4 outer capsid protein VP4 (VP4) gene_complete cds	1810	1810	85%	0.0	99%	JF490806.1
Human rotavirus G1P[8] strain SK438 outer capsid protein (VP4) gene_complete cds	1810	1810	85%	0.0	99%	EU839956.1
Human rotavirus A strain RVA/Human-wt/CAN/RT060-09/2009/G9P8 spike protein (P) gene_complete cds	1805	1805	85%	0.0	99%	JQ069696.1
Human rotavirus G9P[8] strain DH396 outer capsid protein (VP4) gene_complete cds	1805	1805	85%	0.0	99%	EU839959.1
Rotavirus A strain RVA/Human-wt/BGD/Matlab36/2002/G11P[8] VP4 gene_complete cds	1783	1783	85%	0.0	99%	GU199506.1
Rotavirus A strain RVA/Human-wt/PRY/467/2000/G9P[8] segment 4 outer capsid spike protein VP4 (VP4) gene_complete cds	1777	1777	85%	0.0	99%	KJ626908.1
Rotavirus A human/Victoria/CK00012/2004/G1P[8] segment 4 outer capsid protein VP4 (VP4) gene_complete cds	1777	1777	85%	0.0	99%	JF490201.1
Rotavirus A human/Victoria/CK00009/2004/G1P[8] segment 4 outer capsid protein VP4 (VP4) gene_complete cds	1777	1777	85%	0.0	99%	JF490178.1
Rotavirus A human/Victoria/CK00002/2004/G1P[8] segment 4 outer capsid protein VP4 (VP4) gene_complete cds	1777	1777	85%	0.0	99%	JF490102.1
Rotavirus A human/Victoria/CK00001/2004/G1P[8] segment 4 outer capsid protein VP4 (VP4) gene_complete cds	1777	1777	85%	0.0	99%	JF490091.1
Rotavirus A strain RVA/Human-wt/PRY/472/2000/G9P[8] segment 4 outer capsid spike protein VP4 (VP4) gene_complete cds	1772	1772	85%	0.0	98%	KJ627130.1
Rotavirus A strain RVA/Human-wt/PRY/2SR/2002/G9P[8] segment 4 outer capsid spike protein VP4 (VP4) gene_complete cds	1772	1772	85%	0.0	98%	KJ626885.1
Rotavirus A strain RVA/Human-wt/PRY/469/2000/G9P[8] segment 4 outer capsid spike protein VP4 (VP4) gene_complete cds	1772	1772	85%	0.0	98%	KJ626674.1
Rotavirus A strain RVA/Human-wt/PRY/475/2000/G9P[8] segment 4 outer capsid spike protein VP4 (VP4) gene_complete cds	1772	1772	85%	0.0	98%	KJ626663.1
Rotavirus A strain RVA/Human-wt/ZAF/MRC-DPRU822/2005/G1P[8] segment 4 outer capsid spike protein VP4 (VP4) gene_complete cds	1766	1766	85%	0.0	98%	KJ751974.1
Rotavirus A strain RVA/Human-wt/PRY/473/2000/G9P[8] segment 4 outer capsid spike protein VP4 (VP4) gene_complete cds	1766	1766	85%	0.0	98%	KJ626630.1
Rotavirus A human/Victoria/CK00006/2004/G1P[8] segment 4 outer capsid protein VP4 (VP4) gene_complete cds	1766	1766	85%	0.0	98%	JF490146.1
Human rotavirus G9P[8] strain DH375 outer capsid protein (VP4) gene_complete cds	1766	1766	85%	0.0	98%	EU839962.1
Human rotavirus G1P[8] strain DH402 outer capsid protein (VP4) gene_complete cds	1766	1766	85%	0.0	98%	EU839958.1
Human rotavirus G2P[8] strain SK424 outer capsid protein (VP4) gene_complete cds	1766	1766	85%	0.0	98%	EU839954.1
Rotavirus A strain RVA/Human-wt/BGD/Dhaka16/2003/G1P[8] VP4 gene_complete cds	1766	1766	85%	0.0	98%	DQ492672.1
Rotavirus A strain RVA/Human-wt/PRY/468/2000/G9P[8] segment 4 outer capsid spike protein VP4 (VP4) gene_complete cds	1760	1760	85%	0.0	98%	KJ626821.1
Rotavirus A strain RVA/Human-wt/PRY/464/2000/G9P[8] segment 4 outer capsid spike protein VP4 (VP4) gene_complete cds	1760	1760	85%	0.0	98%	KJ559348.1

Figura 13. Análisis de identidad de la secuencia de nucleótidos obtenida del cromatograma de la secuenciación del plásmido pGEM-T/VP5*-554 (extremo 3’).

Una vez confirmado la identidad del inserto de la subunidad VP5* en el plásmido pGEM-T/VP5*, se procedió a secuenciar la región interna de la subunidad VP5* empleando los primers diseñados en el laboratorio (VP5iF/VP5iR) por una PCR del plásmido pGEM-T/VP5* previamente secuenciado (Figura 14).

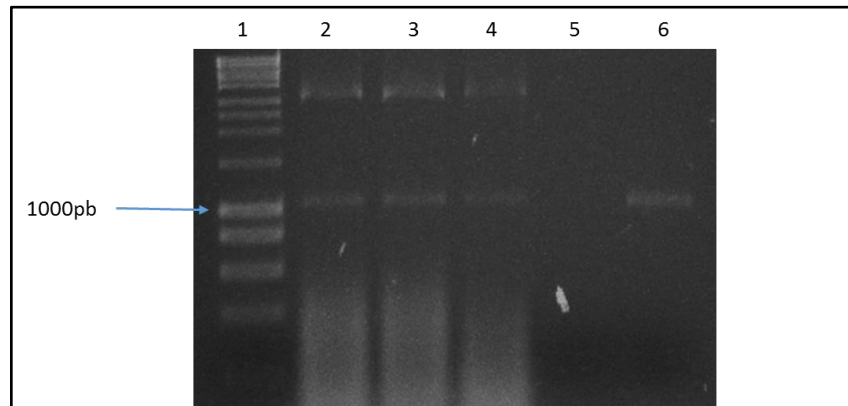


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa 1.5 % de PCR de región interna de la subunidad VP5* de Rotavirus. Carril 1: Marcador de pares de base (MPB) HyperLadder I; Carril 2: Muestra pGEM/VP5*-623; Carril 3: Muestra 217; Carril 4: Muestra pGEM/VP5*-532; Carril 5: Control negativo (agua miliQ); Carril 6: PCR muestra 554.

Una vez obtenido el producto de PCR correspondiente a esta zona se procedió a su secuenciación. La secuencia de nucleótidos obtenida (Figura 15) fue analizada mediante la herramienta BLAST nucleotide (NCBI) y fue determinada una identidad de 99-100% en comparación con las secuencias reportadas en la base de datos (Figura 16).

La secuencia de nucleótidos de la subunidad VP5* de las muestras con reactividad positiva (532) y negativa (623) fueron analizadas mediante el software Bioedit V7.0/ Clustal W identificándose cuatro cambios de nucleótidos (Figura 17), posterior a la traducción a aminoácidos de estas secuencias se observaron tres cambios de aminoácidos (Figura 18).

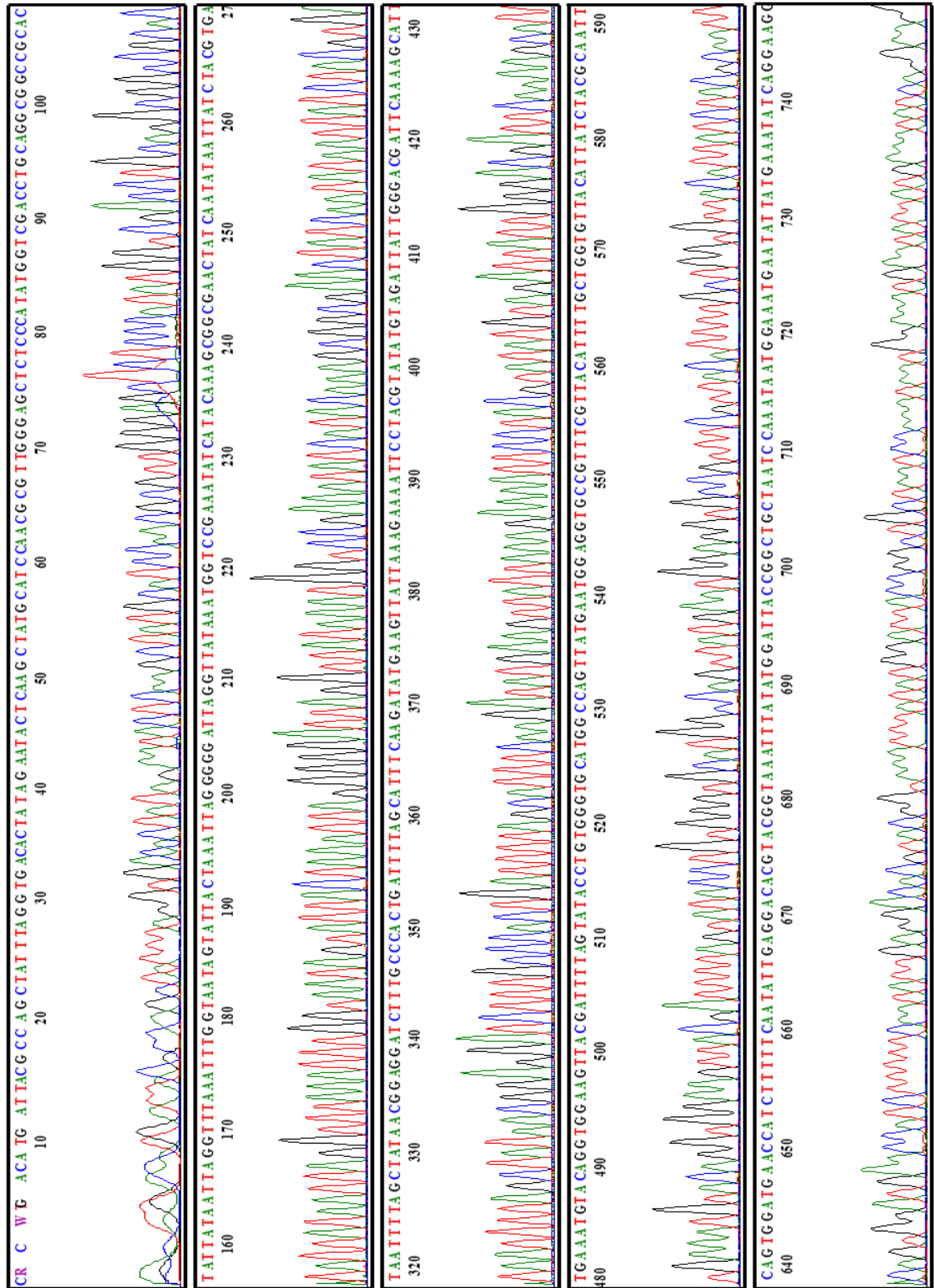
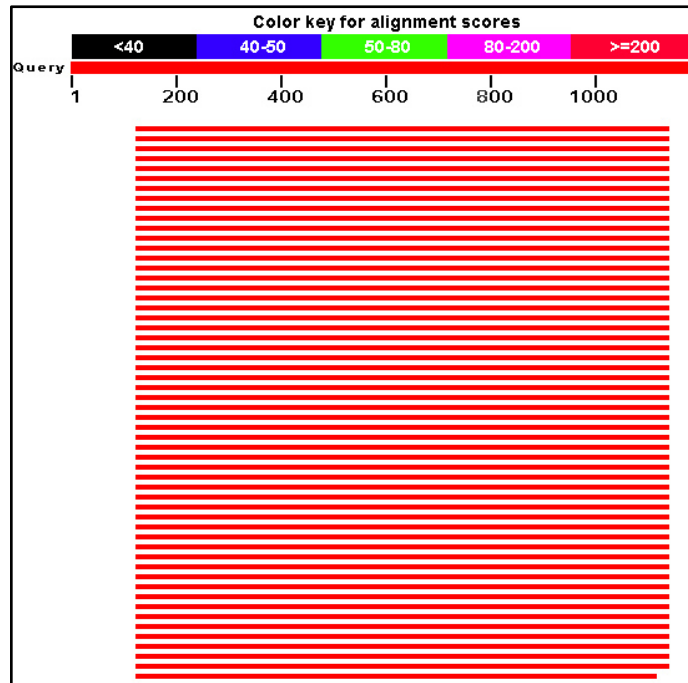


Figura 15. Análisis de identidad de la secuencia de nucleótidos obtenida del cromatograma de la secuenciación de la subunidad interna de VP5* de la muestra 532 (extremo 5').



	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Rotavirus A human/Vanderbilt/VU06-07-7/2006/G1P[8] segment 4 outer capsid protein VP4 (VP4) gene, complete cds	1814	1814	85%	0.0	99%	JF490893.1
Rotavirus A human/Vanderbilt/VU05-06-69/2005/G1P[8] segment 4 outer capsid protein VP4 (VP4) gene, complete cds	1797	1797	85%	0.0	99%	JF490806.1
Human rotavirus G1P[8] strain SK438 outer capsid protein (VP4) gene, complete cds	1797	1797	85%	0.0	99%	EU839956.1
Human rotavirus A strain RVA/Human-wt/CAN/RT060-09/2009/G9P8 spike protein (P) gene, complete cds	1792	1792	85%	0.0	99%	JQ069696.1
Human rotavirus G9P[8] strain DH396 outer capsid protein (VP4) gene, complete cds	1792	1792	85%	0.0	99%	EU839959.1
Rotavirus A strain RVA/Human-wt/BGD/Matlab36/2002/G11P[8] VP4 gene, complete cds	1770	1770	85%	0.0	98%	GU199506.1
Rotavirus A strain RVA/Human-wt/PRY/467/2000/G9P[8] segment 4 outer capsid spike protein VP4 (VP4) gene, complete cds	1764	1764	85%	0.0	98%	KJ626908.1
Rotavirus A human/Victoria/CK00012/2004/G1P[8] segment 4 outer capsid protein VP4 (VP4) gene, complete cds	1764	1764	85%	0.0	98%	JF490201.1
Rotavirus A human/Victoria/CK00009/2004/G1P[8] segment 4 outer capsid protein VP4 (VP4) gene, complete cds	1764	1764	85%	0.0	98%	JF490178.1
Rotavirus A human/Victoria/CK00002/2004/G1P[8] segment 4 outer capsid protein VP4 (VP4) gene, complete cds	1764	1764	85%	0.0	98%	JF490102.1
Rotavirus A human/Victoria/CK00001/2004/G1P[8] segment 4 outer capsid protein VP4 (VP4) gene, complete cds	1764	1764	85%	0.0	98%	JF490091.1
Rotavirus A strain RVA/Human-wt/PRY/472/2000/G9P[8] segment 4 outer capsid spike protein VP4 (VP4) gene, complete cds	1759	1759	85%	0.0	98%	KJ627130.1
Rotavirus A strain RVA/Human-wt/PRY/2SR/2002/G9P[8] segment 4 outer capsid spike protein VP4 (VP4) gene, complete cds	1759	1759	85%	0.0	98%	KJ626885.1
Rotavirus A strain RVA/Human-wt/PRY/469/2000/G9P[8] segment 4 outer capsid spike protein VP4 (VP4) gene, complete cds	1759	1759	85%	0.0	98%	KJ626674.1
Rotavirus A strain RVA/Human-wt/PRY/475/2000/G9P[8] segment 4 outer capsid spike protein VP4 (VP4) gene, complete cds	1759	1759	85%	0.0	98%	KJ626663.1
Human rotavirus G1P[8] strain DH402 outer capsid protein (VP4) gene, complete cds	1757	1757	85%	0.0	98%	EU839958.1
Human rotavirus G2P[8] strain SK424 outer capsid protein (VP4) gene, complete cds	1757	1757	85%	0.0	98%	EU839954.1
Rotavirus A strain RVA/Human-wt/ZAF/MRC-DPRU822/2005/G1P[8] segment 4 outer capsid spike protein VP4 (VP4) gene, complete cds	1753	1753	85%	0.0	98%	KJ751974.1
Rotavirus A strain RVA/Human-wt/PRY/468/2000/G9P[8] segment 4 outer capsid spike protein VP4 (VP4) gene, complete cds	1753	1753	85%	0.0	98%	KJ626821.1
Rotavirus A strain RVA/Human-wt/PRY/473/2000/G9P[8] segment 4 outer capsid spike protein VP4 (VP4) gene, complete cds	1753	1753	85%	0.0	98%	KJ626630.1
Rotavirus A strain RVA/Human-wt/PRY/464/2000/G9P[8] segment 4 outer capsid spike protein VP4 (VP4) gene, complete cds	1753	1753	85%	0.0	98%	KJ593348.1
Rotavirus A human/Victoria/CK00006/2004/G1P[8] segment 4 outer capsid protein VP4 (VP4) gene, complete cds	1753	1753	85%	0.0	98%	JF490146.1
Human rotavirus G9P[8] strain DH375 outer capsid protein (VP4) gene, complete cds	1753	1753	85%	0.0	98%	EU839962.1
Rotavirus A strain RVA/Human-wt/BGD/Dhaka16/2003/G1P[8] VP4 gene, complete cds	1753	1753	85%	0.0	98%	DQ492672.1

Figura 16. Análisis de identidad de la secuencia de nucleótidos obtenida del cromatograma de la secuenciación de la región interna de VP5*-532 (extremo 5').

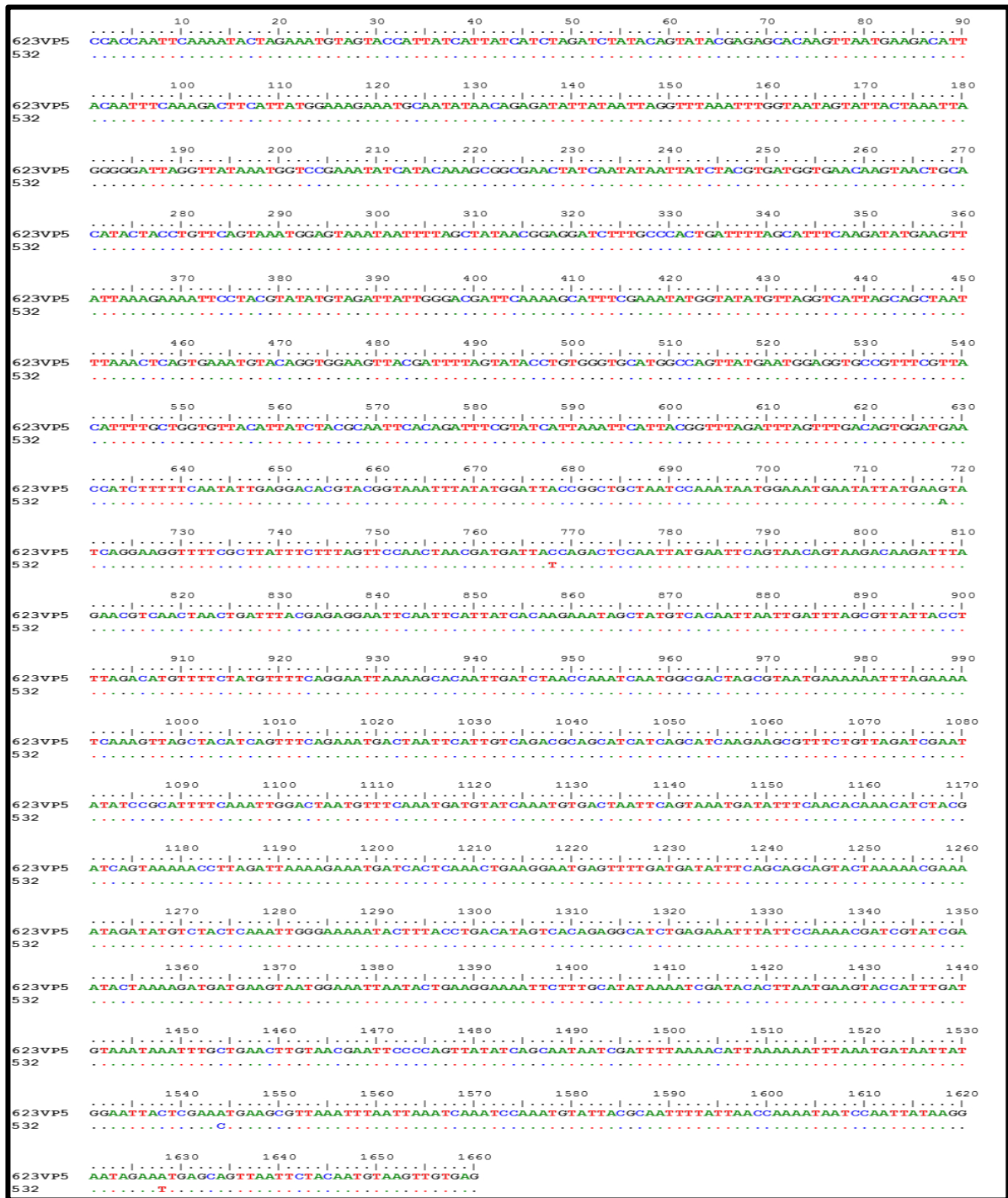


Figura 17. Alineamiento de la secuencia de nucleótidos de la subunidad VP5* de las muestras de rotavirus 623 y 532.

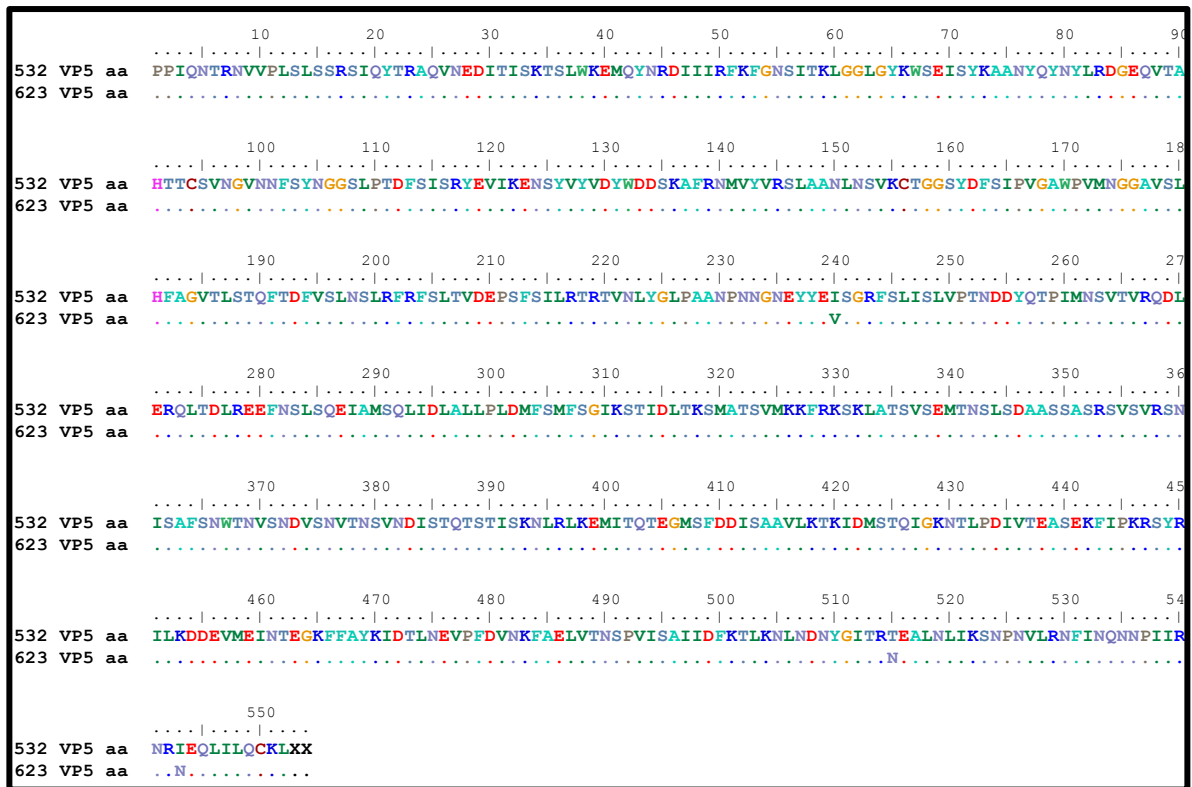


Figura 18. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la subunidad VP5* de las muestras de rotavirus 623 y 532.

7.6 Análisis de la secuencia de aminoácidos de la subunidad VP5*

El análisis de la composición aminoacídica en la secuencia de aminoácidos de la muestra 532 fue analizada mediante la herramienta ExPASy Bionformatics Resource Portal determinando un pI de 8.31, con un peso molecular de 62.01 KD. El porcentaje de solubilización de la proteína se determinó mediante la herramienta Recombinant Protein Solubility Prediction de la Universidad de Oklahoma, EUA determinando un coeficiente de 27.7% de solubilidad cuando es sobre expresada esta secuencia en *E. coli*. El análisis de dominios transmembranales fue realizado con la herramienta DAS transmembrane prediction mostró 4 grupos de aminoácidos involucrados en interacción transmembranal teniendo un coeficiente de 1.7 indicando la ubicación exacta de estos dominios (Figura 19).

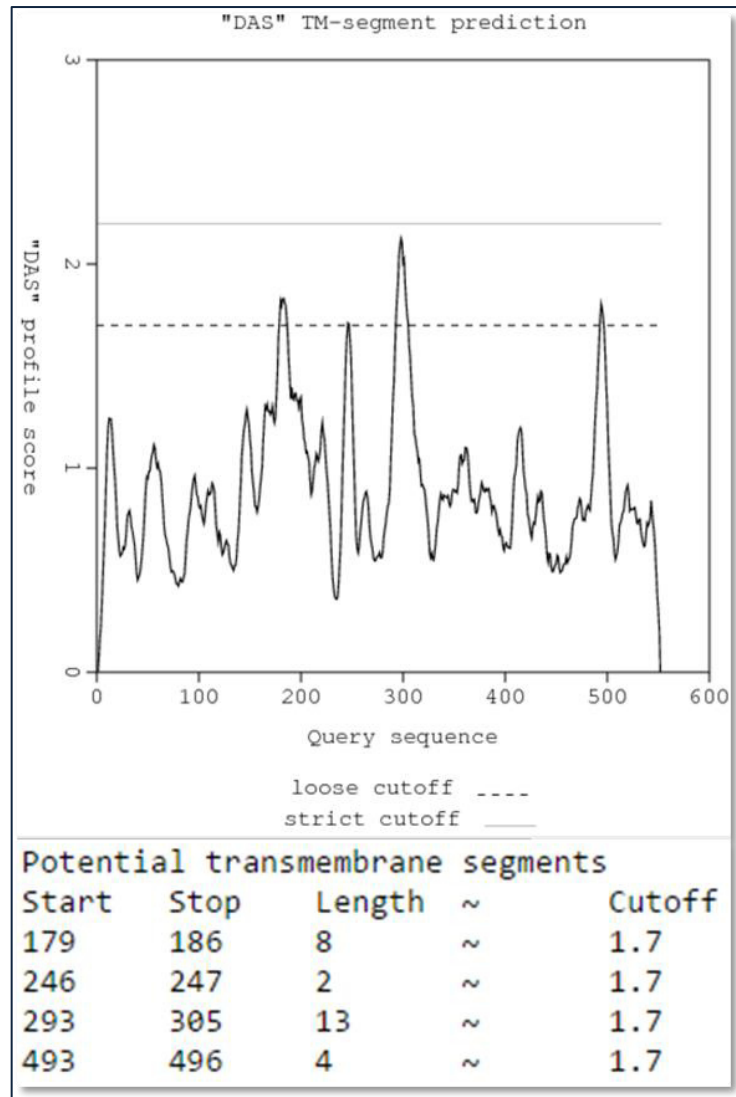


Figura 19. Análisis de identificación *in-silico* de dominios transmembranales de la subunidad VP5* de rotavirus de la muestra 532

7.7 Expresión y purificación de las subunidades VP5* y VP8* de la proteína VP4 de Rotavirus

7.7.1 Subclonación de la subunidad VP5* en el plásmido pET28 a (+)

Identificada la secuencia de la región de VP4 que codifica para VP5* por ensayo de restricción, PCR y secuenciación se procedió a subclonar esta región en el plásmido de expresión pET28 a (+). Las clonas con los plásmidos pET28 a (+) y el plásmido pGEM-T/VP5* fueron cultivadas en medio LB con Kanamicina y Ampicilina respectivamente

por 16 horas a 37°C, después el DNA_{Plasmidico} fue purificado y cuantificado por nanodrop (Figura 20). Para el ensayo de Subclonación ambos plásmidos fueron sometidos a una digestión doble durante 1 hora a 37°C empleando las enzimas de restricción *Bam*HI/*Sal*I para posteriormente sitio dirigir el inserto del plásmido de clonación al plásmido de expresión (Figura 21).

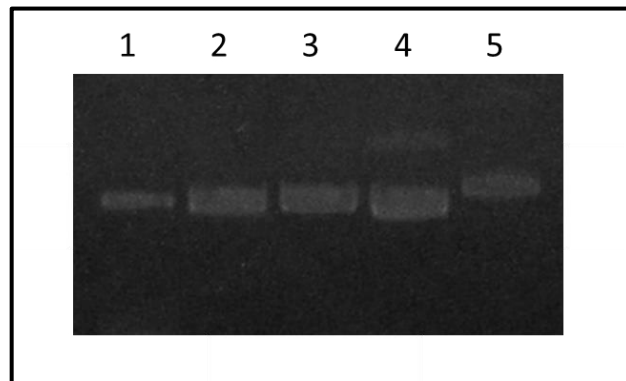


Figura 20. Purificación de plásmidos pGEM-T/VP5* y peT28 (a). Carril 1: Muestra pGEM-T/VP5*-532; Carril 2: Muestra pGEM-T/VP5*-623; Carril 3: Muestra pGEM-T/VP5*-217; Carril 4: Muestra pGEM-T/VP5*-216; Carril 5: Muestra pET 28(a).

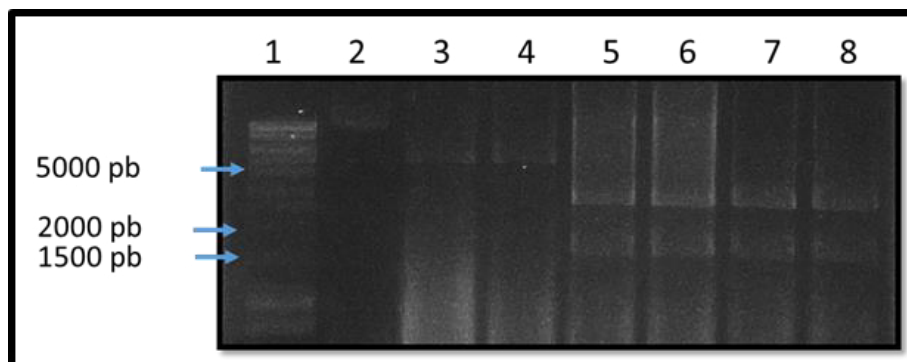


Figura 21. Análisis de digestión doble del plásmido pGEM-T/VP5*-532 y peT28 (a) con las enzimas *Bam*HI y *Sal*I. Carril 1: Marcador de pares de base (MPB) HyperLadder I; Carril 2: Control pET28 (a) sin digerir; Carril 3: pET28 (a) (digerido); Carril 4: Muestra pGEM-T/VP5*-532 (sin digerir); Carril 5 y 6: Muestra 532 (digerido); Carril 7 y 8; Muestra 623 (digerido).

Posteriormente los productos de digestión (plásmido pET28 a (+) lineal con extremos cohesivos e inserto de VP5* con extremos cohesivos) fueron purificados y consecutivamente ligados (Figura 22).

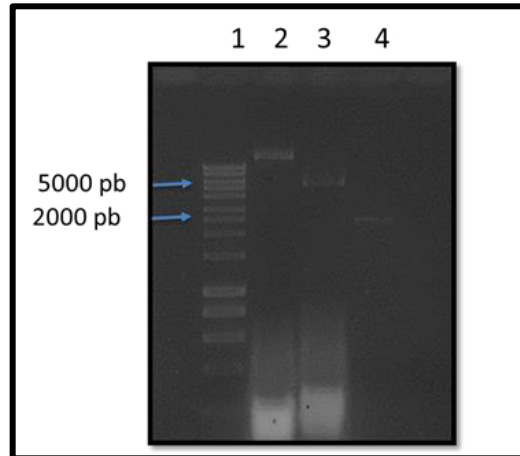


Figura 22. Productos de digestión doble de los plásmidos pET28 (a) y pGEM-T/VP5*-532 purificados. Carril 1: Marcador de pares de base (MPB) HyperLadder I; Carril 2: Control pET28 (a) sin digerir; Carril 3: pET28 (a) (digerido); Carril 4: Muestra VP5*-532.

Después de un periodo de 16 horas a 4°C se transformaron bacterias *E. coli* DH5 α calcio competente con el plásmido pET/VP5* obteniendo a las 16 horas clonas resistentes a Kanamicina (Figura 23).

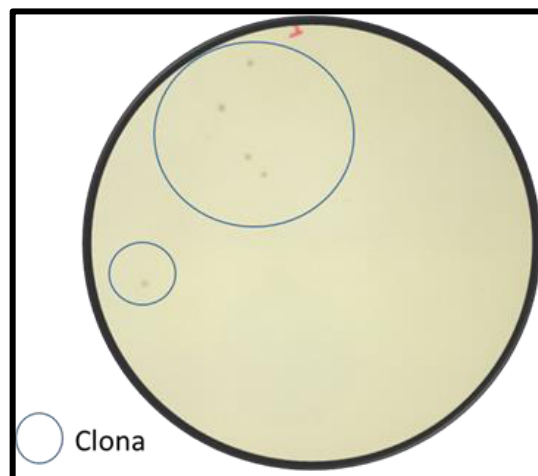


Figura 23. Bacterias *E. coli* DH5 α transformadas con la reacción de ligación del plásmido pET28 (a) y el inserto de la subunidad VP5* en medio LB/KANAMICINA.

Posteriormente se procedió a purificar el DNA_{Plasmidico} mediante lisis alcalina (Figura 24).

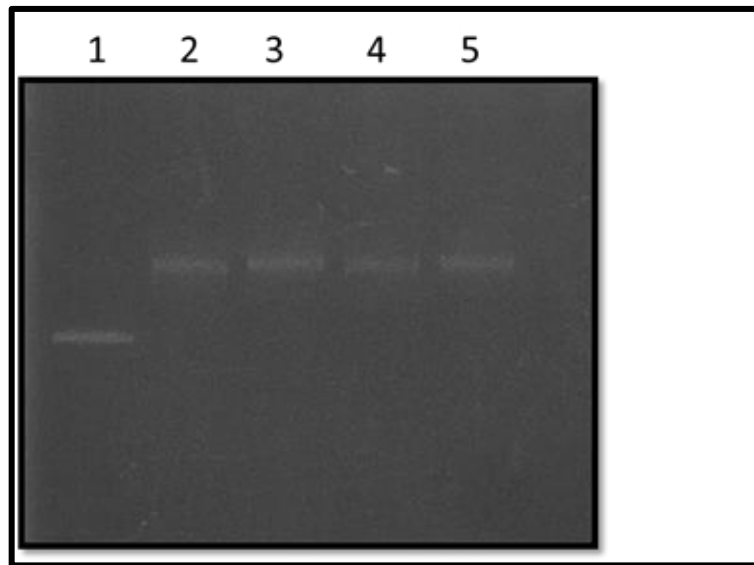


Figura 24. Purificación de DNA_{Plasmidico} de bacterias *E. coli* DH5 α transformadas con el plásmido pET/VP5*. Carril pET28 (a) sin inserto 1: Carril 2: Clona 1 pET/VP5*; Carril 3: Clona 2 pET/VP5*; Carril 4: Clona 3 pET/VP5*; Carril 4: Clona 4 pET/VP5*.

Finalmente fue analizado mediante un ensayo de PCR VP5F/VP5R (Figura 25).

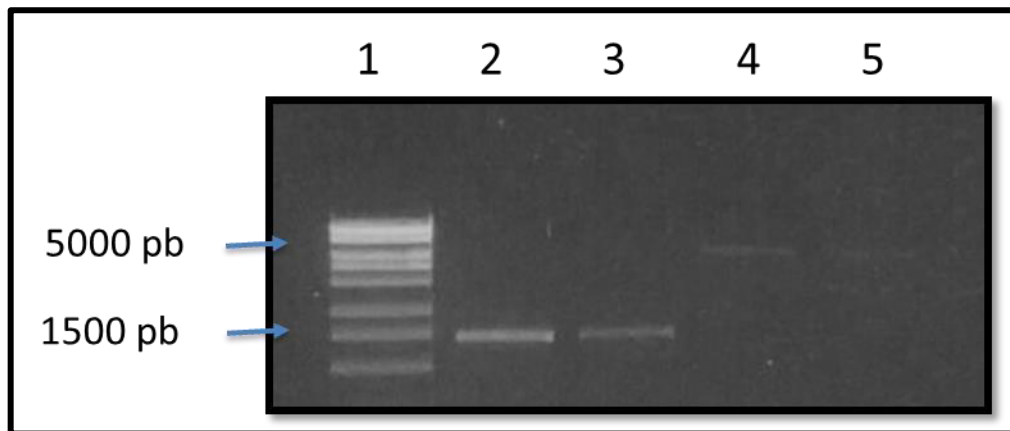


Figura 25. PCR de confirmación del inserto VP5* en el plásmido de expresión pET28 (a). Carril 1: Marcador de pares de base (MPB) HyperLadder I; Carril 2: Clona 1 pET/VP5*; Carril 3: Clona 2 pET/VP5*; Carril 4: Clona 3 pET/VP5*; Carril 5: Clona 4 pET/VP5*.

7.7.2 Expresión de la subunidad VP5* de rotavirus

Bacterias *E. coli* BL21 (DE3) fueron transformadas utilizando el plásmido pET/VP5*. Una vez obtenidas las clonas resistentes a Kanamicina, se realizó una purificación de DNA_{Plasmidico}. El DNA purificado fue sometido a una PCR para confirmar la presencia del plásmido en esta cepa de bacterias. Posteriormente se activaron bacteria *E. coli* BL21 (DE3) pET/VP5* positivas durante toda la noche a 37°C en caldo LB/Kanamicina. Al día siguiente se agregaron 400 µg/mL de pellet de bacterias en 100 mL de caldo 2XYT-Glucosa 2% pH 7 durante 2 horas a 37°C/250 rpm. Transcurrido el tiempo de incubación se tomaron 10 mL del cultivo sin inductor, inmediatamente se agregó IPTG (inductor) a una concentración final de 1mM, después se incubó durante 4 horas a 37°C/ 250 rpm, transcurrido el tiempo de incubación el cultivo fue almacenado a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente las bacterias fueron lisadas mediante un método químico (Lisozima) y un método físico (Sonicación). El lisado bacteriano se resuspendió en urea 8M, para después analizarse mediante un SDS-PAGE, para confirmar la presencia de la VP5* recombinante (VP5*_r) (Figura 26).

7.7.3 Análisis antigénicos de lisados de bacterias con la subunidad VP5 recombinante

Una vez obtenidos los lisados con la rVP5* se analizaron mediante un Western-blot para confirmar la identidad de la subunidad, utilizando un anticuerpo monoclonal dirigido contra la subunidad VP5* y a la par anticuerpos policlonales inducidos contra la cepa de la vacuna Rotateq. Una vez revelada la membrana, la inmunodetección se observó una banda de 62.01 KD la cual corresponde a la subunidad VP5* de rotavirus (Figura 27).

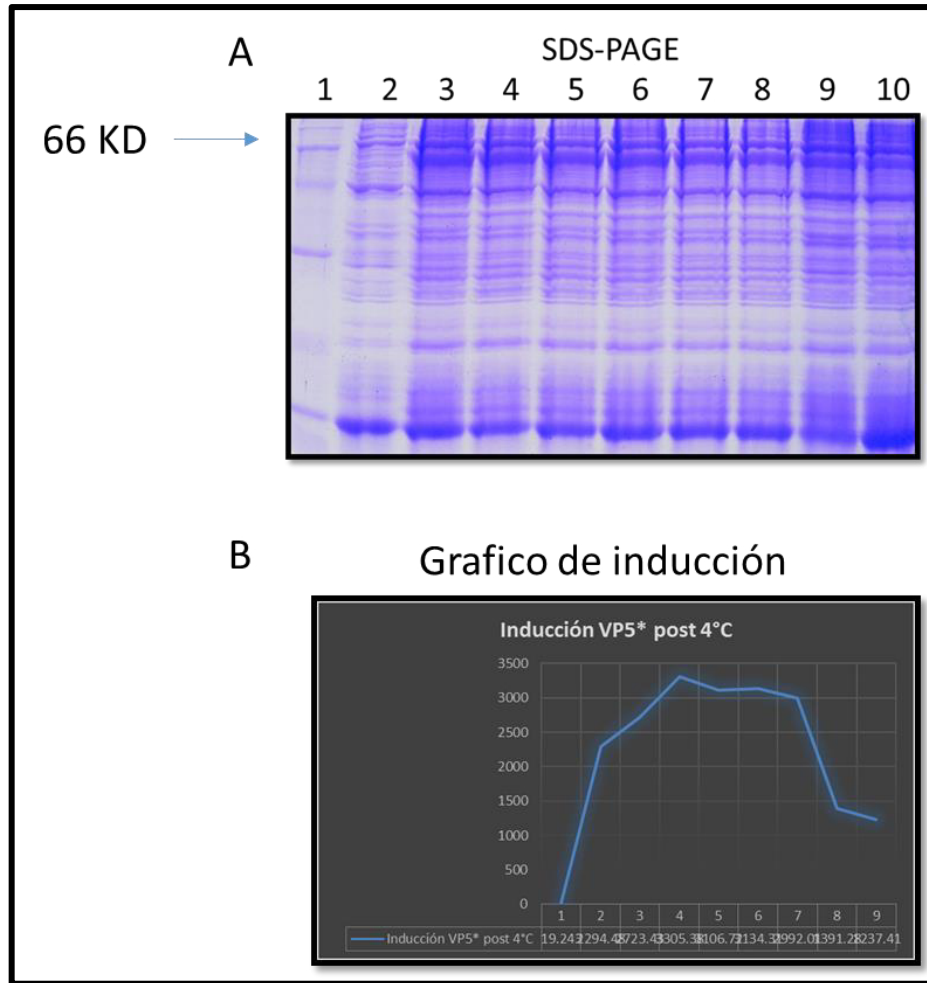


Figura 26. Expresión de la subunidad VP5* de rotavirus en *E. coli* BL 21 (DE3) en medio 2XYT-Glu 2%. A) Curva de inducción de la subunidad VP5* de Rotavirus. B) Análisis densitométrico de la curva de inducción de la subunidad VP5*.

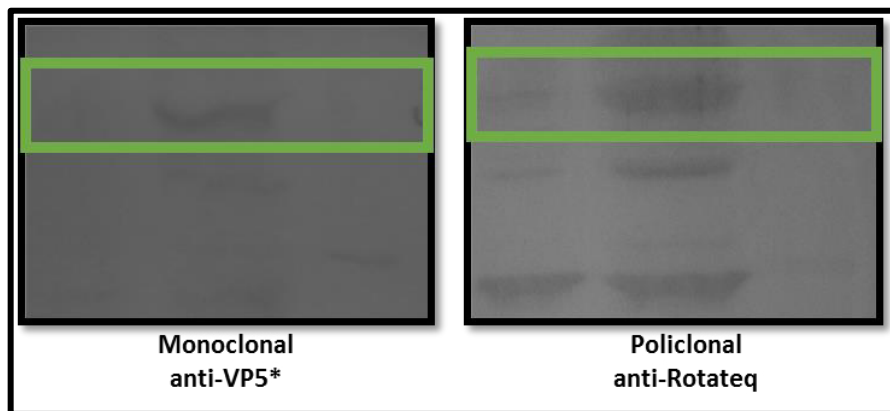


Figura 27. Análisis antigénico de los lisados de *E. coli* BL 21 (DE3) con rVP5*.

7.7.4 Purificación de la subunidad VP5* de rotavirus

Para la purificación de la proteína VP5*_r se realizó empleando los lisados de bacterias/ VP5*_r. Una vez realizada la electroforesis de los lisados, se tiñeron los geles con azul de coomassie. Identificada la banda correspondiente al tamaño esperado y de mayor intensidad en comparación con lisado no inducido fue cortada del gel. Esta banda fue electroeluida y precipitada con acetona al 80% (Figura 28).

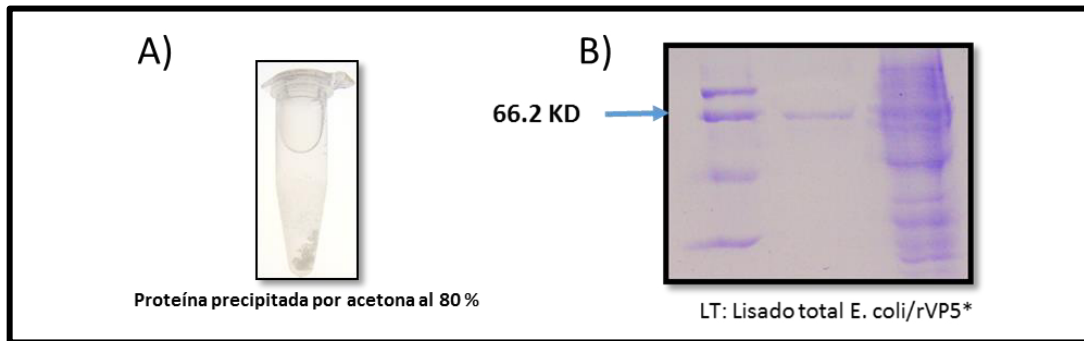


Figura 28. Precipitación y análisis de la subunidad rVP5* purificada mediante electroelución.

La banda electroeluida fue suspendida en buffer binding/Urea 8M. La VP5*_r purificada fue cuantificada mediante un ensayo turbidimétrico a base de azul de coomassie utilizando como calibrador de concentración albumina obteniendo una concentración de 90.07 $\mu\text{gr/mL}$ (Figura 29).

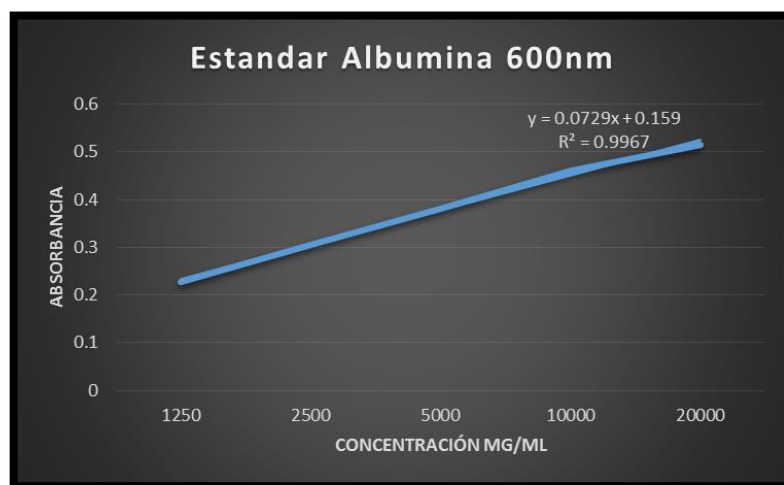


Figura 29. Curva estándar para la cuantificación de la subunidad rVP5* por turbidimetría.

7.8 Evaluación de anticuerpos policlonales contra la subunidad VP5* de rotavirus

La inducción de anticuerpos policlonales anti-VP5*_r se realizó en un modelo murino de la línea Bal/C en un ratón macho de 4 semanas de edad. Los sueros policlonales obtenidos fueron evaluados mediante un ELISA indirecto obteniendo un título de trabajo de hasta 1:4000 (Figura 30).

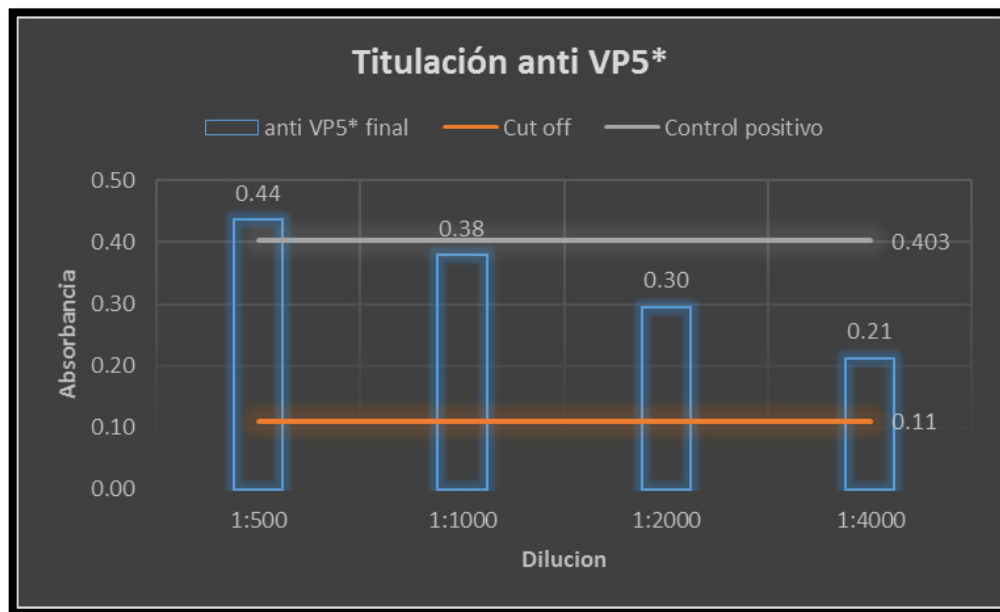


Figura 30. Curva de titulación de anticuerpos anti rVP5* mediante ELISA indirecto.

Una vez determinada la reactividad de estos anticuerpos se procedió a realizar un Western-Blot y un dot blot con estos anticuerpos el cual mostró reactividad específica de la rVP5* en el reconocimiento de la subunidad purificada. De igual forma fueron evaluados anticuerpos monoclonales anti-VP5* y anti-6 HIS Tag para la caracterización antigénica de la proteína purificada (Figura 31).

7.9 Análisis de reactividad de anticuerpos policlonales anti-Rotavirus Wa, anti-VP8* P[8], anti-VP5* P[8] en rotavirus circulantes en la cd de Chihuahua

Una placa de poliestireno para EIA fue sensibilizada con anti- Δ RV a una dilución de 1:2000, 1:2500 y 1:3000 por duplicado en buffer de carbonatos pH 9.6 durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente de la incubación se emplearon diferentes muestras de

rotavirus positivas por PAGE y RT-PCR, empleando como control negativo una muestra negativa por estos ensayos. La reactividad por anti- Δ RV no mostró diferencias entre las diferentes diluciones (Figura 32)

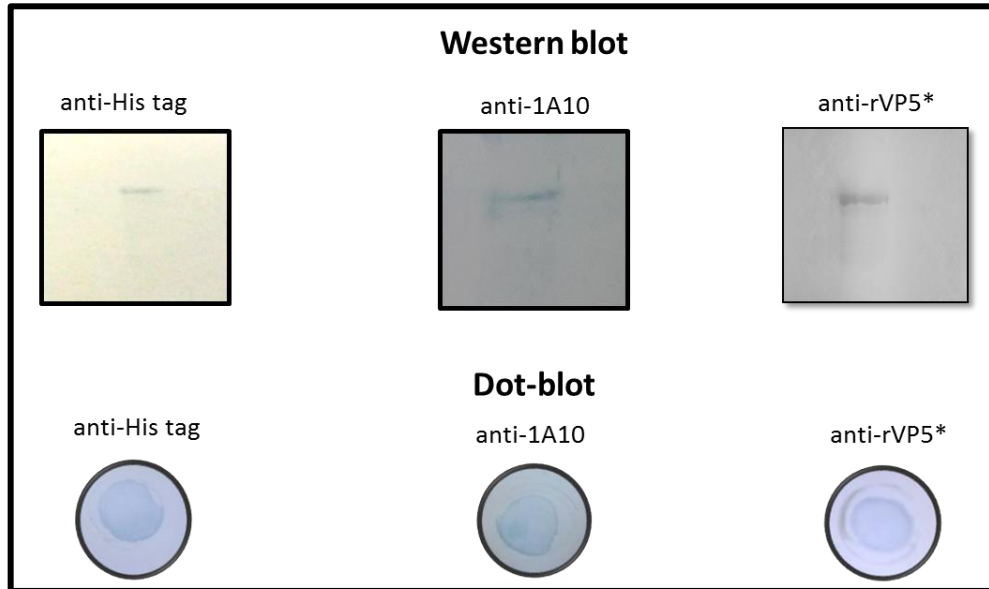


Figura 31. Análisis antigénico de la subunidad rVP5*.



Figura 32. Evaluación del anticuerpo de captura Δ RV mediante ELISA indirecto tipo HADAS.

Una vez determinada la dilución de trabajo del anticuerpo de captura del sistema de ELISA se indujo la subunidad VP8* genotipo P[8] a partir del plásmido pET-28/VP8* en bacterias BL21 (DE3). Mediante una curva de inducción se determinó que a partir de la 3 hora de inducción se alcanzó su máximo umbral de expresión (Figura 33).

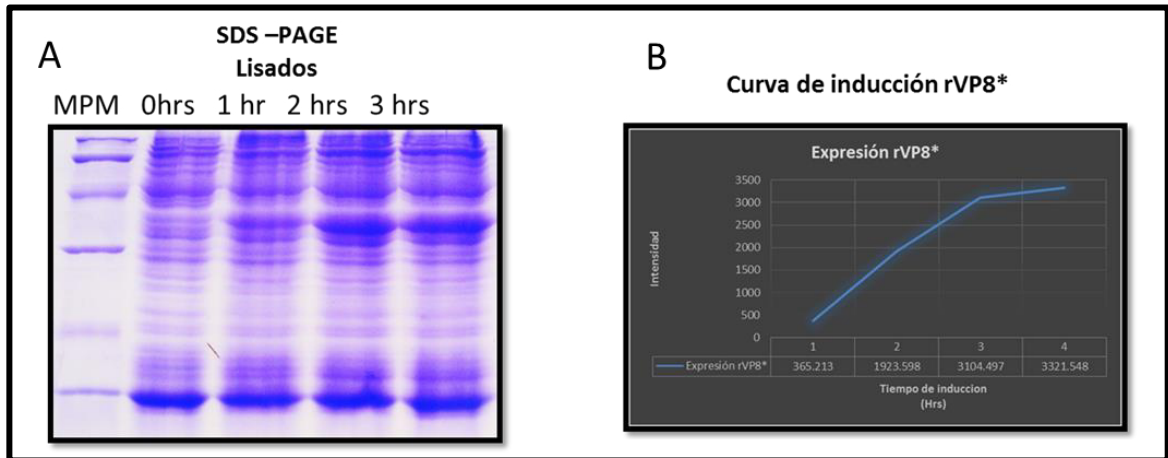


Figura 33. Análisis de expresión de la subunidad VP8*. A) Curva de inducción de la subunidad VP8*. B) Análisis de densitometría de la curva de inducción de la subunidad VP8*.

Una vez determinado el tiempo de inducción se procedió a purificar la subunidad mediante una columna de afinidad (Figura 34).

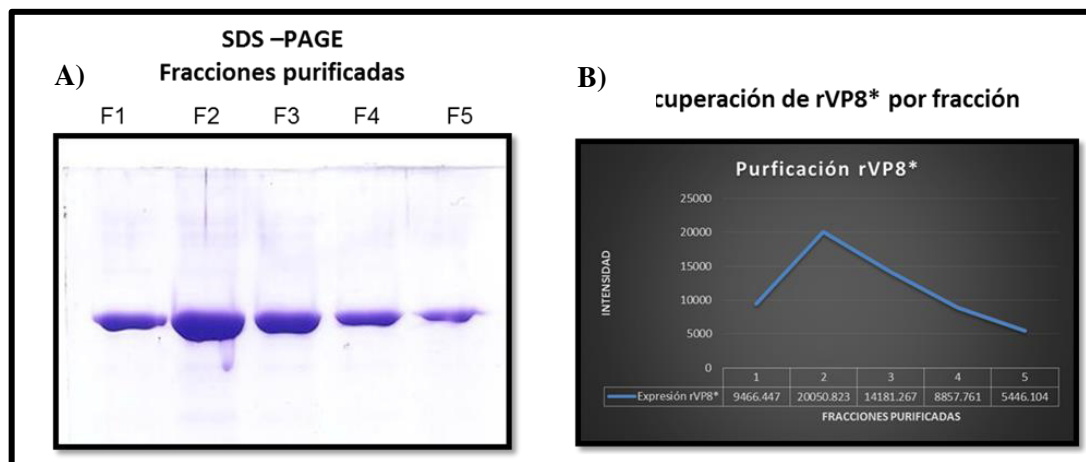


Figura 34. Análisis de la rVP8* de rotavirus. A) SDS-PAGE de fracciones de rVP8* purificadas por cromatografía de afinidad. B) Análisis de densitometría de las fracciones purificadas de rVP8* por cromatografía de afinidad.

Las muestras de rotavirus obtenidas de la coproteca fueron analizadas por duplicado mediante un ELISA tipo HADAS, seleccionando los controles negativos muestras que fueron colectadas en temporadas diferentes y que mostraran reactividad negativa por estos anticuerpos (Figura 35).

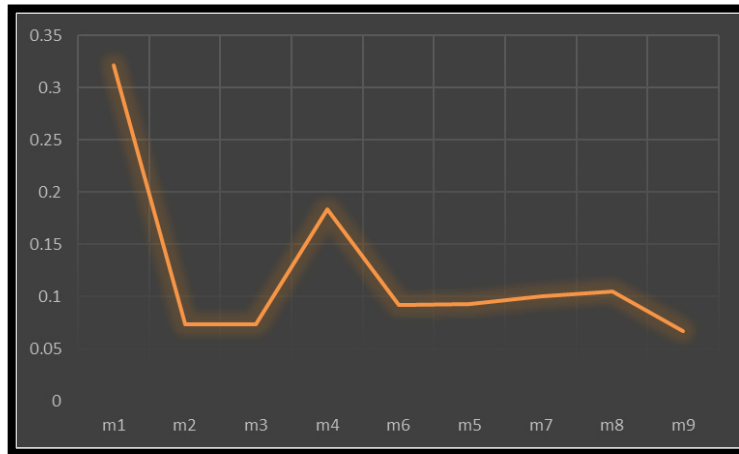


Figura 35. Selección de muestras control negativo para los ensayos de ELISA.

Las 98 muestras seleccionadas fueron evaluadas mediante la combinación de anticuerpos anti-Rotavirus Wa/anti- Δ RV y anti-VP8*-P[8]/anti- Δ RV como se describió anteriormente en la metodología, empleando como control un lisados de células Ma-104 por Rotavirus y la subunidad VP8* recombinante purificada (Figura 36).

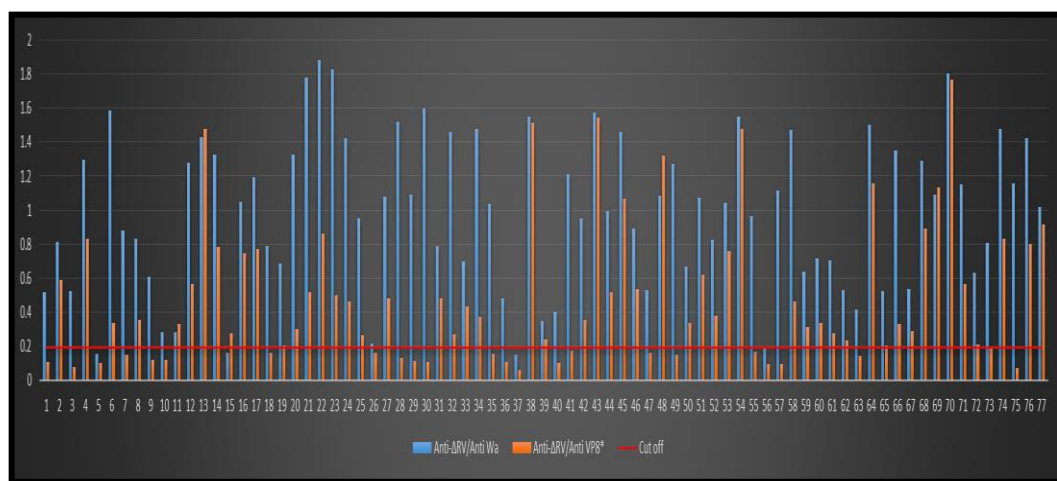


Figura 36. Grafica representativa de la reactividad de anticuerpos anti-Wa y anti-VP8* en muestras de campo.

Las muestras analizadas mostraron una reactividad de 92.8 % con los anticuerpos anti-Rotavirus Wa, mientras que en el análisis con anticuerpos anti-VP8*-P[8] solo se identificó un 69.4 % de reactividad (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis genético y antigénico de rotavirus circulante				
Elisa				
Genotipos	αWa		αVP8*	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
P[8]	58	5	48	15
P[4]	18	0	12	6
P[8]P[4]	14	0	8	6
NEG	1	2	0	3
Total	91 (92.8 %)	7 (7.2 %)	68 (69.4 %)	30 (30.6%)

Una vez determinadas las variaciones antigénicas entre cepas de rotavirus con el mismo genotipo, se seleccionaron al azar diferentes muestras para evaluar su reactividad con anticuerpos inducidos contra la subunidad VP5*. Los anticuerpos anti-rVP5* mostraron reactividad por diferentes muestras de rotavirus, así como por la cepa vacunal Rotateq (Figura 37).

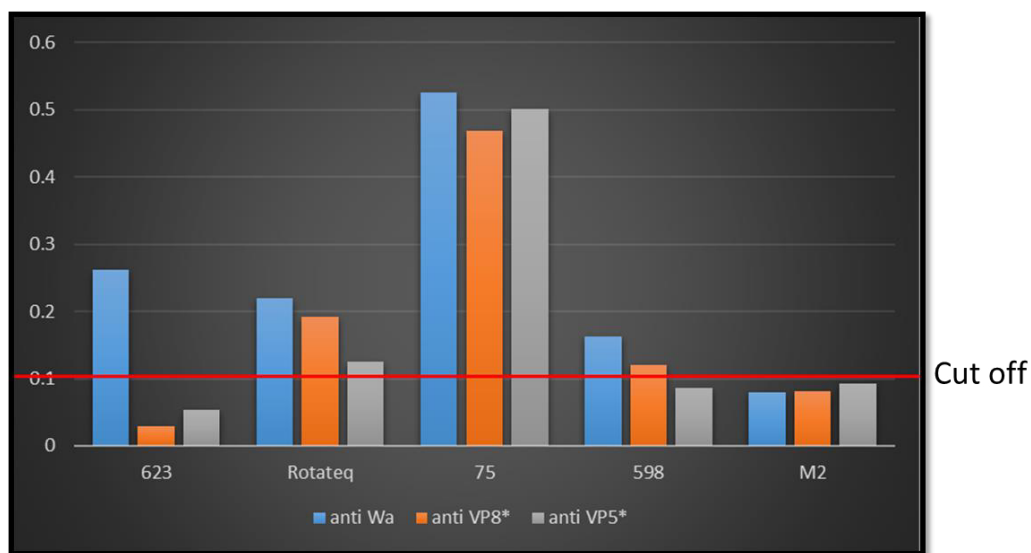


Figura 37. Análisis de reactividad en muestras de campo con los diferentes anticuerpos.

8. DISCUSIÓN

Rotavirus fue reconocido como un patógeno importante de gastroenteritis en niños menores de 5 años a partir de 1973 (Bishop et al., 1973). Posteriormente, estudios de epidemiología molecular en base a los antígenos de superficie VP7 y VP4 han clasificado a este virus en una nomenclatura dual, identificando múltiples combinaciones de los genotipos G/P respectivamente (Matthijnssens et al., 2011). A pesar de la gran variabilidad de este patógeno, las combinaciones de genotipos G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] son frecuentemente identificados en la población infantil y en menor extensión el genotipo G12P[8] (Hungerford et al., 2016; Mandile et al., 2014; Mijatovic-Rustempasic et al., 2014). En el presente trabajo los genotipos P[8] y P[4] fueron detectados en más del 90% de las muestras, indicando la misma prevalencia de estos genotipos alrededor del mundo (Tate et al., 2016). Una vez identificada la distribución de genotipos en la población infantil, estudios de vigilancia epidemiológica se han enfocado en evidenciar entre las cepas circulantes y las cepas vacunales las mutaciones en los sitios antigénicos reportados en las proteínas de superficie con el fin de predecir el posible impacto de los cambios que pudieran tener alteraciones en la protección generada por la vacunación (Kulkarni et al., 2014; Steyer et al., 2014; Afrad et al., 2012; Alam et al., 2012). En México, dos vacunas Rotarix (Monovalente) y Rotateq (Pentavalente) han sido empleadas a partir del 2006, siendo Rotateq la que actualmente se encuentra dentro del programa de salud mexicano (Patel et al., 2013). Diferentes estudios indican que la cepa prototipo Wa posee las mismas características antigénicas que la cepa vacunal Rotarix, la cual se empleó en el sistema de vacunación durante el periodo de colecta en este proyecto (Dennehy, 2008, Wen et al., 2015). En base a esta información, se evaluó la reactividad de anticuerpos policlonales contra la cepa completa de Rotavirus Wa, el reconocimiento de rotavirus circulantes en la población infantil. En el presente trabajo, fue posible identificar la reactividad homotípica y heterotípica de rotavirus con genotipos P[8] y P[4] utilizando los anticuerpos anti-Rotavirus Wa. Estos resultados se correlacionan con estudios realizados en Asia, donde anticuerpos policlonales anti-Rotavirus SA-11 detectaban cerca del 90% de los rotavirus presentes en las muestras analizadas (Ali et al., 2008). Sin embargo, nuestros resultados muestran que cepas circulantes, incluso con el

mismo genotipo no son reconocidos por anticuerpos inducidos contra cepas completas. En este sentido, cinco de las siete muestras con reactividad negativa mostraron el mismo genotipo de la cepa Rotavirus Wa. Estudios moleculares han mostrado que el gen 4 de rotavirus presenta la mayor variabilidad de genotipos en comparación con los otros genes del virus, identificándose a la fecha 38 genotipos P (Fujii et al., 2016). La proteína VP4 de rotavirus codificada por este gen, es activada por un corte proteolítico generado por la tripsina, este corte produce dos subunidades proteicas; VP8* (extremo amino) y VP5* (extremo carboxilo) (Estes and Greenberg, 2003). Basándose en esto, diversos estudios se han enfocado en determinar las regiones de VP4 capaces de inducir anticuerpos con estas características. Actualmente, nueve sitios antigénicos capaces de inducir anticuerpos neutralizantes han sido caracterizados, identificándose cuatro epitopes en la subunidad VP8* (8-1 to 8-4) y cinco en la subunidad VP5* (5-1 to 5-5) (Dormitzer et al., 2002; Dormitzer et al., 2004). En base a esto, se realizó un análisis de secuencia de la subunidad VP8* identificándose la mayoría de las sustituciones de aminoácidos entre la posición 106 y 199 siendo esta región donde se encuentra el epitope más expuesto de esta subunidad (8-3). Esos resultados están acorde a otros reportes que muestran que la mayoría de las mutaciones se encuentran en este epitope cuando son comparadas con las cepas vacunales (Kulkarni et al., 2014, Steyer et al., 2014, Afrad et al., 2012, Alam et al., 2012, Bucardo et al., 2012, Hemming and Vesikari, 2013, Mc Donals et al., 2012, Medici et al., 2014, Morozova et al., 2015, Shintani et al., 2012). Sin embargo, en el análisis de la secuencia entre cepas de rotavirus P[8] con reactividad positiva y negativa por estos anticuerpos, se identificó un cambio de aminoácidos (T113N/D) en el epitope 8-3. Este cambio de reactividad entre rotavirus circulantes con genotipo P[8] pudiera estar involucrado a nivel estructural y generar un cambio en la reactividad por anticuerpos. Debido a esto se procedió a evaluar anticuerpos policlonales anti-VP8*-P[8] con las muestras de rotavirus. Este análisis mostró un 69.4% de reactividad en las cepas analizadas, indicando una reactividad homotípica y heterotípica detectando cepas tanto con genotipo P[8] como genotipo P[4], sin embargo, nuevamente, muestras de genotipo P[8] mostraron una reactividad negativa por estos anticuerpos. En el análisis comparativo en la secuencia de la subunidad VP8* entre muestras negativas y positivas por la capacidad de ser reconocidas por anticuerpos anti-VP8*-P[8] se observó una identidad del 100% entre la

secuencia deducida de aminoácidos ellas. Observando estos resultados se procedió a determinar la secuencia de aminoácidos en la subunidad VP5* entre las muestras que mostraran reactividad positiva o negativa por anticuerpos anti-VP8*-P[8] y que tuvieran la misma secuencia de aminoácidos en VP8*. Una vez obtenidas las secuencias de la subunidad VP5* de las diferentes muestras, el análisis identificó solo dos cambios (T515N y I543N) en el extremo carboxilo de la subunidad VP5* los cuales podrían estar relacionados con la variación de la reactividad por anticuerpos anti-VP8*-P[8], esto debido, a la posible implicación de un cambio a niveles estructurales. Según esta información, se procedió a realizar un análisis de los 9 sitios antigénicos de la proteína VP4 en secuencias del gen 4 de rotavirus de diferentes partes del mundo obtenidas del GenBank, en el cual se determinó que en los epitopes de VP5* con capacidad de inducir anticuerpos neutralizantes se encuentran conservados en más del 93%. Por lo tanto, en este estudio se procedió a inducir anticuerpos policlonales contra la subunidad VP5* y así evaluar su reactividad en cepas de campo. Es por ello que la secuencia de la subunidad VP5* de rotavirus fue expresada en el plásmido pET-28 (a) para la producción de anticuerpos policlonales y poder evaluar su reactividad con muestras de rotavirus circulantes. Esta subunidad ha sido expresada en *E. coli* para determinar sus funciones en el ciclo de replicación, su estabilidad antigénica a diferentes rearrreglos durante la entrada a la célula, así como determinar su antigenicidad heterotípica y homotípica en cepas de referencia (Moreno et al., 2013, Greenberg, 2016). Sin embargo, ha sido poco explorada en determinar su reactividad con cepas circulantes en la población infantil. En este estudio, la expresión de esta subunidad en el plásmido pET 28 (a) alcanzó un aumento del 12% de proteína total en comparación con el lisado no inducido, cuando fue expresada en medio 2XYT-Glucosa 2%-IPTG 1mM, a diferencia de reportes anteriores que reportaron un aumento de un 6% de proteína total en los lisados celulares (Dennisova et al., 1999, Dowling et al., 2000, Moreno et al., 2013). Una vez expresada la subunidad VP5* y evaluada con anticuerpos específicos del virus, se implementó el método de electrolución/precipitación con acetona al 80% para la purificación de la proteína y finalmente inducir los anticuerpos policlonales en un modelo murino. La reactividad de los anticuerpos policlonales anti-VP5* fue evaluada con la cepa de Rotavirus Wa por ELISA y posteriormente evaluada su reactividad mediante Dot-ELISA y Western Blot.

Una vez determinada su reactividad por la cepa de referencia, el reconocimiento de los rotavirus circulantes mostró una reactividad positiva por muestras de genotipo P[8] y P[4], así como con la cepa vacunal Rotateq, lo cual está relacionado con diferentes estudios antigénicos que demuestran que los principales epítopes de reactividad cruzada se encuentran en esta subunidad (Yoder et al., 2006). Sin embargo, una de las muestras positivas por anticuerpos anti-VP8* no mostró reactividad por anticuerpos anti-VP5*. Esta información indica la necesidad de realizar un monitoreo completo de reactividad por anticuerpos policlonales anti-VP5* y anti-VP4 en muestras de rotavirus circulantes. Lo anterior debido a que cepas vacunales y de referencia tuvieron reactividad por anticuerpos policlonales anti-VP5*, además de que estudios anteriores a base de anticuerpos monoclonales identificaron la mayoría de sitios de reactividad cruzada con actividad neutralizante en esta subunidad, sin embargo, no fueron evaluados en cepas de rotavirus circulantes (Greenberg, 2016). Finalmente, en base a estos resultados, el análisis de variación entre las secuencias de la proteína VP4 revelaron cambios de aminoácidos en otras regiones que se encuentran fuera de los nueve dominios antigénicos mencionados. Lo cual remarca la importancia de analizar las diferentes mutaciones no sinónimas en la secuencia de VP4 ya que la reactividad por anticuerpos podría variar incluso entre cepas de rotavirus con el mismo genotipo debido al impacto antigénico de un solo cambio de aminoácidos en la proteína completa (Kobayashi et al., 1990). Por lo tanto, es importante extender los estudios de variabilidad genético/antigénico entre cepas de rotavirus circulantes con el mismo genotipo, para poder establecer el posible papel de residuos superficiales o de interacción como N/D/S/T en la subunidad VP8* o en la subunidad VP5* y residuos con implicaciones en la evasión del reconocimiento por anticuerpos, que por consecuencia generen cepas de rotavirus circulantes que escapen a la neutralización generada por la vacunación en la población infantil.

9. CONCLUSIONES

Genotipos de Rotavirus P[8] y P[4] prevalecen en más del 95% entre las muestras analizadas.

Rotavirus de campo pueden ser detectados en un 92.8% de manera homotípica y heterotípica por anticuerpos producidos contra cepas de Rotavirus con genotipo G1P[8].

Cepas de rotavirus circulantes podrían no ser reconocidos por anticuerpos dirigidos contra cepas completas del mismo genotipo.

La mayoría de las mutaciones de la subunidad VP8* entre las cepas de rotavirus analizadas se encuentran en el epítopo 8-3 de la proteína VP4.

Cambios genéticos en T113N/D de la proteína VP4 podría estar relacionado con la reactividad de anticuerpos policlonales inducidos por la vacunación.

Cepas de rotavirus idéntica en la subunidad VP8* muestran variación en la reactividad por anticuerpos específicos de genotipo P[8].

Anticuerpos policlonales anti-VP5* muestran reactividad positiva tanto por cepas de rotavirus circulantes como por cepas vacunales.

Cambios genéticos en el extremo carboxilo de la subunidad VP5* de rotavirus podrían estar relacionados con la emergencia de cepas circulantes que escapan al reconocimiento por anticuerpos.

10. PERSPECTIVAS

1. Evaluar anticuerpos policlonales anti-Rotateq, anti-VP4 y anti-VP7 en muestras de rotavirus circulantes.
2. Determinar el efecto de las mutaciones de rotavirus de la subunidad VP5* en la reactividad de anticuerpos.
3. Evaluar la incidencia de mutaciones en los principales dominios antigénicos de la proteína VP4 y VP7 de muestras circulantes en la población infantil actualmente.

11. BIBLIOGRAFÍA

Afrad MH, Hassan Z, Farjana S, Moni S, Barua S, Das SK, Faruque AS, Azim T, Raham M .2013. Changing profile of rotavirus genotypes in Bangladesh, 2006-2012. *BMC Infectious Diseases* 13:320-326.

Alam MM, Khurshid A, Shaukat S, Suleman RM, Sharif S, Angez M, Malik SA, Ahmed TM, Aamir UB, Naeem M, Zaidi SS. 2013. Epidemiology and genetic diversity of rotavirus strains in children with acute gastroenteritis in Lahore, Pakistan. *PLoS One* 8:e67998.

Bishop R. F., Davidson G.P., Holmes I.H., Ruck B.J. 1973. Virus Particles In Epithelial Cells Of Duodenal Mucosa From Children With Acute Non-Bacterial Gastroenteritis. *Lancet*. 302, 1281-1283.

Blanchard H., Yu X., Coulson B.S., Von Itzstein M. 2007. Insight into Host Cell Carbohydrate-recognition by Human and Porcine Rotavirus from Crystal Structures of the Virion Spike Associated Carbohydrate-binding Domain (VP8*). *Journal of Molecular Biology* 367, 1215-1226.

Bucardo F., Rippinger C., Svensson L., Patton J. 2012. Vaccine-Derived NSP2 Segment in Rotaviruses from Vaccinated Children with Gastroenteritis in Nicaragua. *Infection, Genetics and Evolution* 12(6): 1282–1294.

Contreras JF., Menchaca GE., Padilla-Noriega L., Tamez RS., Greenberg HB., López S., Arias CF. 1995. Heterogeneity of VP4 neutralization epitopes among serotype P1A human rotavirus strain. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 2:506-508.

Contreras JF., Menchaca GE., Infante R., Hernandez CE, Rodriguez CR., Tamez S. Evidence of conserved epitopes in variable region of VP8* subunit of VP4 protein of rotaviruses of P[8]-1 and P[8]-3 lineages. *Acta virológica* 55: 273 – 278, 2011.

Crawford SE., Mukherjee SK., Estes MK., Lawton JA., Shaw AL., Ramig RF., Prasad BV. 2001. Trypsin cleavage stabilizes the rotavirus VP4 spike. *Journal of Virology* 75:6052–6061.

Desselberg U. 2014. Rotaviruses. *Virus Research* 190:75–96.

da Silva FM, Gómez MM, Rose TL, Volotão Edem, Carvalho-Costa FA, Bello G, Leite JP. 2013. VP8* P[8] lineages of group A rotaviruses circulating over 20 years in Brazil: Proposal of six different sub-lineages for P[8]-3 clade. *Infection, Genetics and Evolution* 16:200-205.

Dennehy P.H. 2008. Rotavirus Vaccines: an Overview. *Clinical Microbiology Reviews*. 198–208.

Dormitzer PR., Nason EB., Prasad BV., Harrison SC. 2004. Structural rearrangements in the membrane penetration protein of a non-enveloped virus. *Nature* 430:1053-1058.

Dormitzer PR., Sun ZY., Wagner G., Harrison SC. 2002. The rhesus rotavirus VP4 sialic acid binding domain has a galectin fold with a novel carbohydrate binding site. *EMBO Journal* 21:885-897.

Espinola EE., Amarilla A., Arbiza J., Parra GI. 2008. Sequence and phylogenetic analysis of the VP4 gene of human rotaviruses isolated in Paraguay. *Archives of Virology*. 153: 1067-1073.

Espinola EE., Parra GI. 2008. Genetic diversity of the VP4 and VP7 genes affects the genotyping of rotaviruses: Analysis of Paraguayan strains. *Infection, Genetics and Evolution*. 1567-1348/\$.

Esparza-Aguilar M., Bautista-Márquez A., González-Andrade MC., Richardson-López-Collada VL. 2009. Mortalidad por enfermedad diarreica en menores, antes y después de la introducción de la vacuna contra el rotavirus. *Salud Publica Mex* 2009;51:285-290.

Estes MK., Greenberg HB., 2013. Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM (eds) *Fields Virology*, 6th ed. Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA, pp 1347-1401.

Fujii Y., Mitake H., Yamada D., Nagai M., Okadera K., Ito N., Okada K., Nakagawa K., Mizutani T., Sugiyama M. 2016. Genome sequences of rotavirus A strains Ty-1 and Ty-3, isolated from turkeys in Ireland in 1979. *Genome Announcements* 4(1):e01565-15.

Glantsova NE., Gorbunova EE., Mackow ER. 2004. Discrete Domains within the Rotavirus VP5* Direct Peripheral Membrane Association and Membrane Permeability. *Journal of Virology* p. 2037–2044.

Graham KL., Takada Y., Coulson BS. 2006. Rotavirus spike protein VP5* binds $\alpha 2\beta 1$ integrin on the cell surface and competes with virus for cell binding and infectivity. *Journal of General Virology*. 87, 1275–1283.

Greenberg H. 2016. Innate And Acquired Immunity To Rotavirus Infection. 2nd Symposium On Molecular Aspects Of Virology. México, octubre 18-21.

Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. *Nucleic Acids Symp* 41:95-98

Hemming M. and Vesikari T. 2013. Genetic diversity of G1P[8] rotavirus VP7 and VP8* antigens in Finland over a 20-year period: No evidence for selection pressure by universal mass vaccination with RotaTeq vaccine. *Infection, Genetics and Evolution* 19 (2013) 51–58.

Hungerford D., Vivancos R., EuroRotaNet network members, Read JM., Pitzer VE., Cunliffe N., French N., Iturriza-Gómara M. 2016. In-season and out-of-season variation of rotavirus genotype distribution and age of infection across 12 European countries before the introduction of routine vaccination, 2007/08 to 2012/13. *European surveillance journal*. 21:30106.

Kirkwood CD. 2010. Genetic and Antigenic Diversity of Human Rotaviruses: Potential Impact on Vaccination Programs. *The Journal of Infectious Diseases*. 202(S1):S43–S48.

Kobayashi N., Taniguchi K., Urasawa S. 1990. Identification of operationally overlapping and independent cross-reactive neutralization regions on human rotavirus VP4. *Journal of General Virology*. 71:2615-2623.

Kulkarni R., Arora R., Arora R., Chitambar SD. 2014. Sequence analysis of VP7 and VP4 genes of G1P[8] rotaviruses circulating among diarrhoeic children in Pune, India: A comparison with Rotarix and RotaTeq vaccine strains. *Vaccine* 32:A75-A83.

Mc Donald SM., McKell MO., Rippinger CM., Mc Allen JK., Akopov A., Kirkness EF., Payne DC., Edwards KM., Chappell JD., Patton JT. 2012. Diversity and Relationships of Cocirculating Modern Human Rotaviruses Revealed Using Large-Scale Comparative Genomics. *Journal of Virology* p. 9148–9162.

Mandile MG., Esteban LE., Argüelles MH., Mistchenko A., Glikmann G., Castello AA. 2014. Surveillance of group A Rotavirus in Buenos Aires 2008-2011, long lasting circulation of G2P[4] strains possibly linked to massive monovalent vaccination in the región. *Journal of Clinical Virology*. 60:282-289.

Matthijnssens J., Ciarlet M., McDonald SM., Attouid H., Bányai K., Brister JR., Buesa J., Esona MD., Estes MK., Gentsch JR., Iturriza-Gómara M., Johne R., Kirkwood CD., Martella V., Mertens PPC., Nakagomi O., Parreño V., Rahman M., Ruggeri FM., Saif LJ., Santos N., Steyer A., Taniguchi KM., Patton JT., Desselberg U., Van Ranst M. 2011.

Uniformity of Rotavirus Strain Nomenclature Proposed By the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Archives of Virology*. 156(8):1397-1413.

Matthijnssens J, Van Ranst M. 2012. Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans. *Current Opinion in Virology* 2:426-433.

Medici MC., Tummolo F., Guerra P., Arcangeletti MC., Chezzi C., De Conto F., Calderaro A. 2014. Evidence of VP7 and VP4 intra-lineage diversification in G4P[8] Italian human rotaviruses. *Virus Genes* 48:361–365.

Mijatovic-Rustempasic S., Teel EN., Kerin TK., Hull JJ., Roy S., Weinberg GA., Payne DC., Parashar UD., Gentsch JR., Bowen MD. 2014. Genetic analysis of G12P[8] rotaviruses detected in the largest U.S. G12 genotype outbreak on record. *Infection, Genetics and Evolution* 21: 214–219.

Monnier N, Higo-Moriguchi K, Sun Z-YJ, Venkataram-Prasad BV., Taniguchi K., Dormitzer PR. 2006. High-resolution molecular and antigen structure of the VP8* core of a sialic acid-independent human rotavirus strain. *Journal of Virology*. 80:1513-1523.

Moreno Y., Guerrero L., Arturo C., Acosta O. 2013. Expresión y purificación de las proteínas estructurales VP5* y VP8* de rotavirus en bacterias *E. coli* BL21(DE3). *Revista Colombiana de Biotecnología* Vol. XV No. 1 Julio 2013 82-97.

Morozova OV., Sashina TA., Fomina SG., Novikova NA. 2015. Comparative characteristics of the VP7 and VP4 antigenic epitopes of the rotaviruses circulating in Russia (Nizhny Novgorod) and the Rotarix and RotaTeq vaccines. *Archives of Virology* 160:1693–1703.

Patel MM., Parashar UD., Santosham M., Richardson V. 2013. The Rotavirus Experience in Mexico: Discovery to Control. *Clinical Infectious Diseases*. 56(4):548–51

Padilla-Noriega L., Fiore L., Rennels MB., Losonsky GA., Mackow ER., Greenberg HB. 1992. Humoral immune responses to VP4 and its cleavage products VP5* and VP8* in infants vaccinated with rhesus rotavirus. *Journal of Clinical Microbiology* 30:1392-1397.

Quintanar SM., Yen C., Richardson V., Esparza AM., Parashar U., Patel M. 2011. Impact of rotavirus vaccination on diarrhea-related hospitalizations among children, 5 years of age in Mexico. *Pediatric Infectious Disease Journal* 30:S11–15.

Richardson V., Hernandez P.J., Quintanar S.M., Esparza A.M., Johnson B., Gomez A.C.M., Parashar U., Patel M. 2010. Effect of rotavirus vaccination on death from childhood diarrhea in Mexico. *New England Journal of Medicine*. 362:299–305.

Santos N., Hoshino Y. 2005. Global distribution of rotavirus serotypes/ genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Reviews in Medical Virology* 15:29-56.

Settembre EC., Chen JZ., Dormitzer PR., Grigorieff N., Harrison SC. 2011. Atomic model of an infectious rotavirus particle. *EMBO Journal*. 30,408-416.

Shintani T., Ghosh S., Wang Y-H., Zhou X., Zhou D-J., Kobayashi N. 2012. Whole Genomic Analysis of Human G1P[8] Rotavirus Strains From Different Age Groups in China. *Viruses* 4:1289-1304.

Steele DA., Page N., De Beer M., Sawadogo S. 2010. Antigenic and Molecular Characterization Of Unusual Rotavirus Strains In Burkina Faso in 1999. *Journal of Infectious Diseases* 202:S225–S230.

Steyer A, Sagadin M, Kolenc M, Poljšak-Prijatelj M. 2014. Molecular characterization of rotavirus strains from pre- and post-vaccination periods in a country with low vaccination coverage: The case of Slovenia. *Infection, Genetics and Evolution* 28:413-425.

Taniguchi K., Morita Y., Urasawa T., Urasawa S. 1987. Cross-reactive epitopes on VP3 of human rotavirus: analysis with monoclonal antibodies and antigenic variants. *Journal of Virology* 61:1726-1730.

Taniguchi K., Maloy WL., Nishikawa K., Green KY., Hoshino H., Urasawa S., Kapikian AZ., Chanock RM., Gorziglia M. 1988. Identification of cross-reactive and serotype 2-specific neutralization epitopes on VP3 of human rotavirus. *Journal of Virology* 62:2421-2426.

Tellez Castillo CJ., Montava Vilaplana R., Fernandez Jimenez M., Ribes Fernandez JM., Gomez Buesa J. 2010. Predominio del genotipo G9 de rotavirus en Valencia y Castellon entre 2005 y 2007. *Anales de Pediatría* 72 (1):49-54.

Tate JE., Burton AH., Boschi-Pinto C., Parashar UD., World Health Organization-Coordinated Global Rotavirus Surveillance Network. 2016. Global regional, and national estimates of rotavirus mortality in children >5 years of age, 2000–2013. *Clinical Infectious Diseases* 2:96-S105.

Trojnar E., Sachsenroder J., Twardziok S., Reetz J., Otto PH., Johne R. 2013. Identification of an avian group A rotavirus containing a novel VP4 gene with a close relationship to those of mammalian rotaviruses. *Journal of General Virology* 94,136-142.

Usonis V., Ivaskeviciene I., Desselberg U., Rodrgigo C. 2012. The unpredictable diversity of co-circulating rotavirus types in Europe and the possible impact of universal mass vaccination programmes on rotavirus genotype incidence. *Vaccine*. 4596– 4605.

Wen X., Cao D., Jones RW., Hoshino Y., Yuan L. 2015. Tandem truncated rotavirus VP8* subunit protein with T cell epitope as non-replicating parenteral vaccine is highly immunogenic. *Human vaccines & immunotherapeutics* 11:2483-2489.

Yen C., Tate JE., Patel MM., Cortese MM., Lopman B., Fleming J., Lewis K., Jiang B., Gentsch J., Steele D., Parashar E.D. 2011. Rotavirus vaccines update on global impact and future priorities. *Human Vaccines*. 7:12, 1282-1290.

Yen C., Reina J., Sanchez E., Hernandez L.C., Tate J., Parashar U., Patel M., Lopez VR. 2011. Monovalent rotavirus vaccine provides protection against an emerging fully heterotypic G9P[4] rotavirus strain in Mexico. *Journal of Infectious Diseases*. 204:783-786.

Yoder J and Dormitzer P. 2006. Alternative intermolecular contacts underlie the rotavirus VP5* two to three-fold rearrangement. *The EMBO Journal*. 25: 1559 – 1568.

Zeller M., Patton JT., Heylen E., De Coster S., Ciarlet M., Van Ranst M., Matthijssens J. 2011. Genetic analyses reveal differences in the VP7 and VP4 antigenic epitopes between human rotaviruses circulating in Belgium and rotaviruses in Rotarix and RotaTeq. *Journal of Clinical Microbiology* 50:966-976.

12. RESUMEN BIOGRÁFICO

César Iván Romo Sáenz

Candidato para el Grado de:

Doctor en Ciencias con Especialidad en Microbiología

Tesis: RELACIÓN ANTIGÉNICA DE VARIANTES GENÉTICAS DE ROTAVIRUS

Campo de estudio: Epidemiología molecular de virus de RNA

Biografía:

Datos Personales: Nacido el 27 de septiembre de 1989, hijo de Manuel Francisco Romo Quintana y Soledad Sáenz García, en Chihuahua, Chihuahua.

Educación:

Egresado de la Universidad Autónoma de Chihuahua con el título de Químico Bacteriólogo Parasitólogo en el 2011 recibiendo mención especial. Obtención del grado de Maestro en ciencias con especialidad en Microbiología en el 2014.

Experiencia Profesional:

Profesor nivel licenciatura en la Universidad del Valle de México campus Monterrey, de 2016 a la fecha.

13.ANEXOS

13.1 Artículo publicado

RESEARCH ARTICLE

INTERNATIONAL MICROBIOLOGY (2016) 19:27-32
doi:10.2436/20.1501.01.260 ISSN (print): 1139-6709. e-ISSN: 1618-1095
www.im.microbios.org



Genetic and serologic surveillance of rotavirus with P[8] and P[4] genotypes in feces from children in the city of Chihuahua, northern Mexico

Juan F. Contreras-Cordero,^{1*} César I. Romo-Sáenz,¹ Griselda E. Menchaca-Rodríguez,¹ Rocío Infante-Ramírez,² Licet Villarreal-Treviño,¹ Carlos E. Hernández-Luna,² Cristina Rodríguez-Padilla,¹ Reyes S. Tamez-Guerra¹

¹Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Biological Sciences, Autonomous University of Nuevo Leon, San Nicolas de los Garza, Nuevo Leon, Mexico. ²Department of Chemistry, Faculty of Biological Sciences, Autonomous University of Nuevo Leon, San Nicolas de los Garza, Nuevo Leon, Mexico. ³Faculty of Chemical Sciences, Autonomous University of Chihuahua, Chihuahua, Mexico

Received 7 February 2016 - Accepted 7 March 2016

Summary. Rotavirus vaccine was developed using the most prominent G and P genotypes circulating in children population. Therefore, severe gastroenteritis has been reduced around the world. This study investigated the G and P rotavirus genotypes circulating in children from two hospitals in the city of Chihuahua, Mexico. Additionally, polyclonal antibodies against Rotavirus Wa strain were used to determine their homotypic and heterotypic reactivity to both P[8] and P[4] genotypes. G1, G2, and G3 VP7 genotypes and P[8] and P[4] VP4 genotypes were detected in common and uncommon combinations as well as mixed infectious. The predominant combination was G1P[8]. Phylogenetic analysis of VP4 gene revealed the presence of P[8]-1 and P[8]-3 lineages of P[8] genotype and P[4]-5 lineage of P[4] genotype. All but five G1P[8] rotavirus were detected by polyclonal anti-Rotavirus Wa strain. Mutation analysis revealed differences in three of the four neutralizing epitopes previously reported to VP8* subunit of VP4 protein. Results of this study offer insights over genetic variants of field rotavirus that could be detected in a homotypic and heterotypic way by antibodies elicited to rotavirus with P[8] genotype. [Int Microbiol 2016; 19(1):27-32]

Keywords: rotavirus · viral genotypes · lineages of virus · epitopes · Chihuahua, Mexico

Introduction

Rotavirus is the most important cause of viral gastroenteritis in humans. Annually, rotavirus is responsible for 197,000-233,000 deaths in children less than five years of age mainly

in developing countries [25]. Rotavirus (family *Reoviridae*, subfamily *Sedoreovirinae*, genus *Rotavirus*, species *Rotavirus A*) is a nonenveloped virion composed by six structural proteins that form three concentric layers enclosing a genome of 11 segments of double-stranded RNA. The outer layer is composed by VP7 and VP4 proteins [9]. Based on these proteins, rotavirus type A has been classified in a binary system. So far 27 G (VP7) and 37 P (VP4) genotypes have been identified [19,27].

Surveillance studies around the world, before and after the introduction of rotavirus vaccines have shown that P[8] is the main genotype circulating in human populations. To date,

*Corresponding author: Juan F. Contreras-Cordero
Department of Microbiology and Immunology
Faculty of Biological Sciences
Autonomous University of Nuevo Leon
San Nicolas de los Garza, Nuevo Leon, Mexico
Tel. +52-8183294115
E-mail: juan.contrerascr@uautl.edu.mx; contrerasjfo@gmail.com