

FERNANDO C. RAIBENBERG
AUTOR

BIOTECNOLOGÍA DE BACULOVIRUS RECOMBINANTES

**TESIS DE MAESTRÍA:
CLONADO Y EXPRESIÓN
DE LA PROTEÍNA ESTRUCTURAL
DE CÁPSIDE VP6 DE ROTAVIRUS
HUMANO A EN EL SISTEMA
BACULOVIRUS-CÉLULAS DE INSECTO**



**UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE MORENO**

BIOTECNOLOGÍA DE BACULOVIRUS RECOMBINANTES

TESIS DE MAESTRÍA: CLONADO Y EXPRESIÓN DE
LA PROTEÍNA ESTRUCTURAL DE CÁPSIDE VP6 DE
ROTAVIRUS HUMANO A EN EL SISTEMA
BACULOVIRUS-CÉLULAS DE INSECTO

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MORENO

Rector

Hugo O. ANDRADE

Vicerrector

Manuel L. GÓMEZ

Secretaria Académica

Adriana M. del H. SÁNCHEZ

Secretario de Investigación, Vinculación Tecnológica y Relaciones Internacionales

Jorge L. ETCHARRÁN

Secretaria de Extensión Universitaria

M. Patricia JORGE

Secretario general

V Silvio SANTANTONIO

Consejo Superior

Autoridades

Hugo O. ANDRADE

Manuel L. GÓMEZ

Jorge L. ETCHARRÁN

Pablo A. TAVILLA

M. Patricia JORGE

Consejeros

Claustro docente:

Marcelo A. MONZÓN

Javier A. BRÁNCOLI

Guillermo E. CONY (s)

Adriana M. del H. SÁNCHEZ (s)

Claustro estudiantil:

Rocío S. ARIAS

Iris L. BARBOZA

Claustro no docente:

Carlos F. DADDARIO

BIOTECNOLOGÍA DE BACULOVIRUS RECOMBINANTES

TESIS DE MAESTRÍA: CLONADO Y EXPRESIÓN DE
LA PROTEÍNA ESTRUCTURAL DE CÁPSIDE VP6 DE
ROTAVIRUS HUMANO A EN EL SISTEMA
BACULOVIRUS-CÉLULAS DE INSECTO

FERNANDO C. RAIBENBERG



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE MORENO

Raibenberg, Fernando

Biología de baculovirus recombinantes : tesis de maestría : clonado y expresión de la proteína estructural de cápside VP6 de Rotavirus Humano A en el sistema baculovirus-células de insecto / Fernando Raibenberg. - 1a ed. - Moreno : UNM Editora, 2017.

128 p. ; 22 x 15 cm. - (Tesis / Etcharrán, Jorge L.)

ISBN 978-987-3700-52-1

1. Biología. I. Título.

CDD 664

Departamento de Ciencias Aplicadas y Tecnología
Director-Decano: Jorge L. ETCHARRÁN

Colección: Tesis
Director: Jorge L. ETCHARRÁN

1ra. edición: marzo de 2017
© UNM Editora, 2016
Av. Bartolomé Mitre 1891, Moreno (B1744OHC),
prov. de Buenos Aires, Argentina.
(+54 237) 466-7186 / 1529 / 4530
(+54 237) 488-3151 / 3147 / 3473
(+54 237) 425-1786 / 1619
(+54 237) 462-8629
(+54 237) 460-1309. Interno: 154
unmeditora@unm.edu.ar / <http://www.unm.edu.ar/editora>

ISBN (edición impresa): 978-987-3700-52-1

ISBN (edición digital): 978-978-3700-54-5

UNM Editora

Miembros ejecutivos:
Adriana M. del H. Sánchez (Presidenta)
Jorge L. ETCHARRÁN
Pablo A. TAVILLA
M. Patricia JORGE
V. Silvio SANTANTONIO
Marcelo A. MONZÓN

Miembros honorarios:

Hugo O. ANDRADE
Manuel L. GÓMEZ

Departamento de Asuntos Editoriales
Staff:

R. Alejo CORDARA (arte)
Sebastián D. HERMOSA ACUÑA
Cristina V. LIVITSANOS
Pablo N. PENELA
Daniela A. RAMOS ESPINOSA
Florencia H. PERANIC

La edición en formato digital de esta obra se encuentra disponible en: <http://www.unm.edu.ar/repositorio/repositorio.aspx>

La reproducción total o parcial de los contenidos publicados en esta obra está autorizada a condición de mencionarla expresamente como fuente, incluyendo el título completo del trabajo correspondiente y el nombre de su autor.

Este libro se terminó de imprimir en abril de 2017 en Coop. Chilavert Artes Gráficas, imprenta recuperada y gestionada por sus trabajadores. (M. Chilavert 1136, CABA, Argentina).
Queda hecho el depósito que marca la Ley 11.723
Prohibida su reproducción total o parcial

PRESENTACIÓN

Esta nueva publicación aporta a nuestra vocación por difundir la producción de conocimientos generados por integrantes de nuestra comunidad. En este caso, se trata del Profesor Adjunto Mg. Fernando Raibenberg, docente ordinario del Área Biología Celular y Molecular, actualmente Coordinador-Vicedecano interino de la carrera de Licenciatura en Biotecnología de la UNM, la cual inicio sus actividades en el año 2016, en el ámbito del Departamento de Ciencias Aplicadas y Tecnología de la Universidad.

Se trata del resultado de la investigación de tesis para la Maestría en Microbiología Molecular de la Universidad Nacional de General San Martín y Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS) “Carlos G. Malbrán”, realizada por el autor y dirigida por la Dra. Andrea Peralta, la cual fuera defendida exitosamente por el autor en 2015.

La publicación, se inscribe en el marco de nuestra pretensión de fortalecer la investigación aplicada, aún tratándose de la labor propia para acceder a una titulación de posgrado, siendo que todas ellas por igual tienen una enorme importancia para el desarrollo tecnológico propio, autocentrado en las necesidades nacionales, particularmente, en el marco de las condiciones internacionales en que éstas se desenvuelven y ante los cambios en los paradigmas científico-tecnológicos que transitamos en la actualidad, que amplían la brecha de los países emergentes con los centrales.

El trabajo realizado apunta a optimizar y complementar la elaboración de los componentes del ensayo diagnostico ELISA para la detección de rotavirus humano grupo A en heces, que fuera previamente desarrollado por el Servicio Vacuna Antirrábica del INPB ANLIS Malbrán, con el objeto de impulsar la producción local de la proteína estructural interna de cápside VP6 recombinante a partir de rotavirus humano A, para su aplicación como antígeno control positivo del mencionado kit de diagnóstico. La investigación se completa con un estudio para evaluar la posibilidad de producir partículas similares a virus, VLPs 2/6 de rotavirus. El resultado de este trabajo demuestra que es factible producir localmente la proteína estructural de cápside VP6 de rotavirus humano A, a partir de aislamientos de Argentina usando el sistema de expresión baculovirus-células de insecto. Concluyendo en que la proteína VP6 recombinante expresada, puede ser un componente útil para complementar el ensayo ELISA para la detección de rotavirus humano A.

Con esta publicación deseamos alentar a la comunidad de la naciente carrera de Biotecnología de nuestra Universidad que conduce el Prof. Raibenberg, con el propósito de estimularlos a que continúen en esta senda de trabajo, con el convencimiento de que ésta es una de las formas de crecer y desarrollarse en una comunidad universitaria naciente.

Mg. Jorge L. ETCHARRÁN
Departamento de Ciencias Aplicadas y Tecnología
Universidad Nacional de Moreno

ÍNDICE

RESUMEN	9
SUMMARY	11
INTRODUCCIÓN	13
1. Rotavirus	13
1.1. Estructura viral, genoma y composición proteica de los rotavirus	13
1.2. Tipificación de rotavirus	17
1.3. Ciclo replicativo de rotavirus	18
2. Patología de la infección por rotavirus humano A	23
2.1. Respuesta inmune	23
2.2. Aspectos epidemiológicos de las infecciones causadas por rotavirus	25
3. Diagnostico de la infección por rotavirus humano A	25
4. Expresión de proteínas recombinantes mediante el sistema baculovirus-células de insecto	28
5. Consideraciones generales	32
OBJETIVOS:	
1. Objetivo general	34
1.1. Objetivos particulares	34
MATERIALES Y MÉTODOS	35
1. Extracción de ARN de RV y RT-PCR	35
1.1. Identificación de muestras positivas para Rotavirus Humano A	35
1.2. Diseño de primers genéricos para aislar VP6 de RV HA.	35
2. Clonado y secuenciación del gen VP6 de RV HA	36
2.1. Clonado de la secuencia entera de VP6 HA en el vector pGEM-T Easy.	36
2.2. Secuenciación del inserto VP6 RV HA	39
2.3. Estrategia de clonado de VP6 HA en pFastBac™1	40
3. Construcción de los baculovirus recombinantes	44
3.1. Transformación de la cepa de E. coli DH10Bac™ y transposición al bacmido	44
3.2. Análisis de los bácmidos recombinantes por PCR	44
3.3. Transfección del bácmido recombinante a células de insecto y producción de baculovirus recombinantes.	46
3.4. Preparación del 1º pasaje P ₁	47
3.5. Preparación del pasaje P ₂ de amplificación del stock viral	48

RESUMEN

Los rotavirus grupo A son la causa más común de gastroenteritis aguda en niños menores de 5 años. Se estima que más de 450.000 niños mueren por esta enfermedad cada año a nivel mundial sin embargo alrededor del 90 % de estas fatalidades ocurre en regiones pobres. Las infecciones por RVs continúan generando costos directos significativos para los sistemas de salud. El uso de pruebas diagnósticas comerciales de origen importado constituye una carga económica considerable para estos sistemas en países en desarrollo. El ensayo ELISA es la metodología de uso principal en el diagnóstico de rotavirus humano A debido a su sencillo uso y rapidez en la obtención de resultados.

En tal sentido, con el fin de optimizar y complementar la elaboración de los componentes del ensayo diagnóstico ELISA para la detección de rotavirus humano grupo A en heces, (previamente desarrollado por el Servicio Vacuna Antirrábica del INPB ANLIS Malbrán) el objetivo general de este trabajo consistió en la producción local de la proteína estructural interna de cápside VP6 recombinante a partir de rotavirus humano A, aislados en Argentina, para su aplicación como antígeno control positivo del mencionado kit de diagnóstico.

Para expresar la proteína estructural de cápside VP6 HA se empleó el sistema de expresión baculovirus-células de insecto. La secuencia completa (cDNA) del segmento 6 de RV HA que codifica para la proteína VP6 se aisló por RT-PCR y se subclonó en el vector donante pFast-Bac™1 del sistema Bac-to-Bac®. Este sistema proveyó una manera rápida y sencilla para la generación de baculovirus *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV) recombinantes AcVP6_{RVHA}. La proteína VP6 recombinante se expresó en altos niveles en células de insecto en cultivo.

El análisis por SDS-PAGE confirmó que posee un peso molecular de ~ 44 kD y que presenta la misma movilidad que la proteína VP6 de rotavirus de simio SA11 de referencia. La inmunodetección por western blot con un anticuerpo policlonal anti rotavirus humano A y la evaluación mediante el ensayo ELISA, para la detección de antígeno de rotavirus en heces, corroboraron que la VP6 HA recombinante producida en el presente estudio conserva su capacidad antigénica. El estudio complementario para evaluar la posibilidad de producir partículas similares a virus, VLPs 2/6 demostró que cuando ambas proteínas estructurales de cápside de rotavirus son coexpresadas a través de la co infección de células Sf9 con los baculovirus recombinantes AcVP2_{SA11} y AcVP6_{RVHA}, la proteína VP2 SA11 de simio es capaz de interactuar con la proteína VP6 HA humana formando VLPs 2/6 quiméricas de doble capa que se autoensamblan intracelularmente y que pueden ser purificadas a partir de sobrenadantes de cultivos de células Sf9 co infectados.

Este trabajo demuestra que producir localmente la proteína estructural de cápside VP6 de rotavirus humano A, a partir de aislamientos de Argentina usando el sistema de expresión baculovirus-células de insecto es factible. La proteína VP6 recombinante expresada puede ser un componente útil para complementar el ensayo ELISA para la detección de rotavirus humano, desarrollado por el Servicio de Vacuna Antirrábica del INPB ANLIS Malbrán.

SUMMARY

Group A Rotaviruses are the most common cause of acute gastroenteritis in children. It has been estimated that more than 450,000 children below 5 years of age die of rotavirus disease each year worldwide. About 90% of these fatalities occur in regions of low socioeconomic status. RV infections continue to generate significant direct costs to the health systems. The use of imported commercial diagnostic tests constitutes a considerable economic burden health care in developing countries. The ELISA assay is the methodology of primary use in the diagnosis of human rotavirus due to its simplicity and rapidity of result.

To optimize and to complement, the manufacture of the components of the diagnostic ELISA assay for the detection of human rotavirus group A in stools, (previously developed by the service of rabies vaccine INPB ANLIS Malbrán). We set to produce the recombinant structural inner capsid protein VP6 from human rotavirus A, isolated in Argentina, for its application as positive control antigen of the above mentioned diagnostic kit.

To express the structural inner capsid protein VP6 a baculovirus expression vector system was used. The full length cDNA of segment 6 of human RV group A, coding for VP6 was isolated by RT-PCR and sub cloned into a donor pFastBac™1 plasmid of the Bac-To-Bac® Baculovirus Expression System (Invitrogen, *Life Technologies*). This system provided a rapid and efficient method to produce recombinant baculoviruses AcVP6_{RVHA}. The recombinant VP6 protein was expressed at high levels in cultured insect cells.

SDS-PAGE analysis confirmed that the protein has a molecular weight of ~44 kD and it shows the same mobility as simian rotavirus SA11 reference VP6 protein. Western blot immunodetection with a rabbit polyclonal antibody against human rotavirus, and evaluation through the ELISA assay for the detection of rotavirus antigen in feces, corroborated that recombinant VP6 produced in the present study conserves its antigenic properties. The additional study to assess the possibility of producing virus-like particles VLPs 2/6, demonstrated that when both structural rotavirus capsid proteins are coexpressed by co-infection of *Sf9* cells with recombinant baculoviruses, AcVP2_{SA11} and AcVP6_{RVHA}, simian VP2 SA11 is able to interact with human VP6 A forming chimeric double layered VLPs 2/6 that self-assemble inside the insect cell and can be purified from the supernatants of co-infected *Sf9* cultures.

This work has shown that the local production of the recombinant structural inner capsid protein VP6, from human rotavirus A isolated in Argentina using the baculovirus expression vector system, is feasible. The expressed recombinant VP6 protein may be a useful component to complement the ELISA assay for the detection of human RVs developed by the service of rabies vaccine of INPB ANLIS Malbrán,

INTRODUCCIÓN

1. Rotavirus

Los rotavirus (RVs) son patógenos importantes, identificados como la causa más común (5 al 10 %) de gastroenteritis severas y diarrea acuosa en niños menores de 5 años (Liu et al., 2012; Malek et al., 2006; Parashar, Gibson, Bresee, & Glass, 2006; Parashar, Hummelman, Bresee, Miller, & Glass, 2003). Se estima que la infección por rotavirus es responsable de alrededor de ~ 453.000 muertes infantiles anuales en todo el mundo (Tate et al., 2012). Asimismo afectan animales jóvenes de importancia económica, causando importantes pérdidas en el sector productor (Adams & Kraft, 1963; He et al., 2013; Kindler, Trojnar, Heckel, Otto, & Johnne, 2013; Malherbe & Harwin, 1963; Mebus, Underdahl, Rhodes, & Twiehaus, 1969; Otto et al., 2012; Trojnar, Otto, & Johnne, 2009).

Desde su hallazgo en 1973 a través de la observación por microscopía electrónica de cortes ultrafinos de la mucosa duodenal de niños con gastroenteritis (Bishop, Davidson, Holmes, & Ruck, 1973), se ha avanzado mucho en el conocimiento de su genoma, composición proteica, estructura tridimensional, su ciclo replicativo, patogénesis, características clínicas y su respuesta inmune.

1.1. Estructura viral, genoma y composición proteica de los rotavirus

Los rotavirus constituyen un género de los 15 existentes de la familia *Reoviridae* (*respiratory enteric orphan viruses*), subdividido en dos subfamilias, *Sedoreovirinae* con los géneros *Cardoreovirus*, *Mimoreovirus*, *Orbivirus*, *Phytoreovirus*, *Rotavirus*, y *Seadornavirus* y la subfamilia *Spinareovirinae* que incluye los géneros *Aquareovirus*, *Coltivirus*, *Cypovirus*, *Dinovernavirus*, *Fijivirus*, *Idnoreovirus*, *Mycoreovirus*, *Orthoreovirus*, y *Oryzavirus* (Figura 1).

Su genoma consiste en 11 segmentos de RNA doble cadena con extremos 5' y 3' conservados que codifican 6 proteínas estructurales: VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP7 y seis no estructurales expresadas solo en la célula infectada (NSP1-NSP6).

Con excepción del segmento 11 todos los segmentos son monocistronicos y poseen una pequeña región 5' y 3' no codificante (M. K. Estes, Greenberg, H.B., 2013; Prasad et al., 1996). (Figura 2).

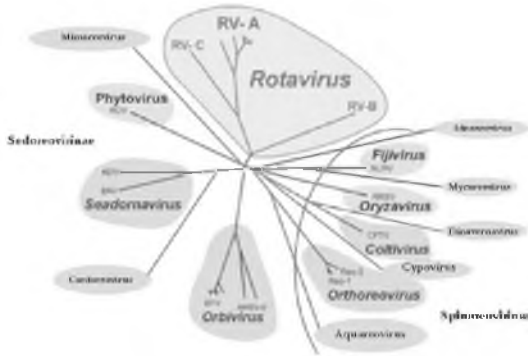


Figura 1.- Clasificación de la familia Reoviridae. Esquema simplificado de árbol filogenético de la familia Reoviridae incluyendo dos subfamilias: Sedoreovirinae, que incluye el género Rotavirus y Spinareovirinae.

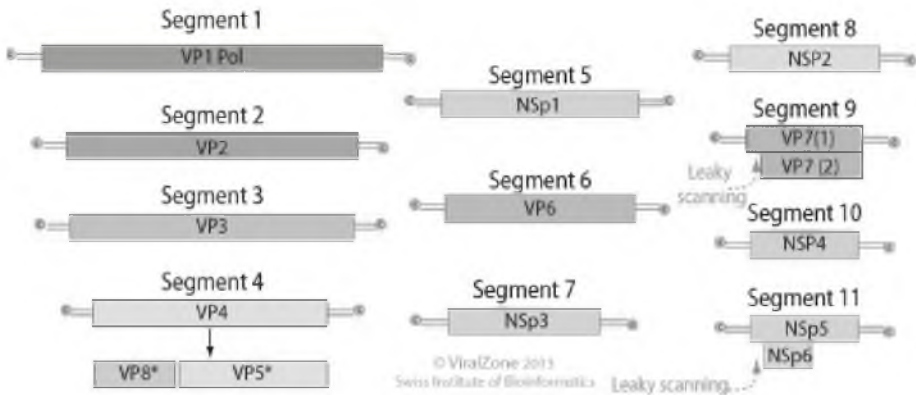


Figura 2.- Genoma de Rotavirus. Consiste en 11 segmentos lineales de ARN doble cadena que codifican 12 proteínas. El tamaño de los segmentos varía de 667 a 3.302 pb, y el tamaño del genoma completo es de 18.550 pb (SIRV-A/SA11). Los mRNAs contienen estructuras Cap metiladas en 5' y carecen de señal de poliadenilación pero conservan en 3' una secuencia consenso (UGACC), en todos los genes virales.

Las partículas virales son icosaedricas no envueltas de 65 a 75 nm de diámetro en característica, forma de “rueda”, en latín “rota” de allí el nombre de “rotavirus” (Flewett, Bryden, & Davies, 1973). La compleja estructura, de la cápside está compuesta de tres capas de proteínas estructurales concéntricas, que contienen en su interior el genoma viral junto con las enzimas responsables de la replicación.

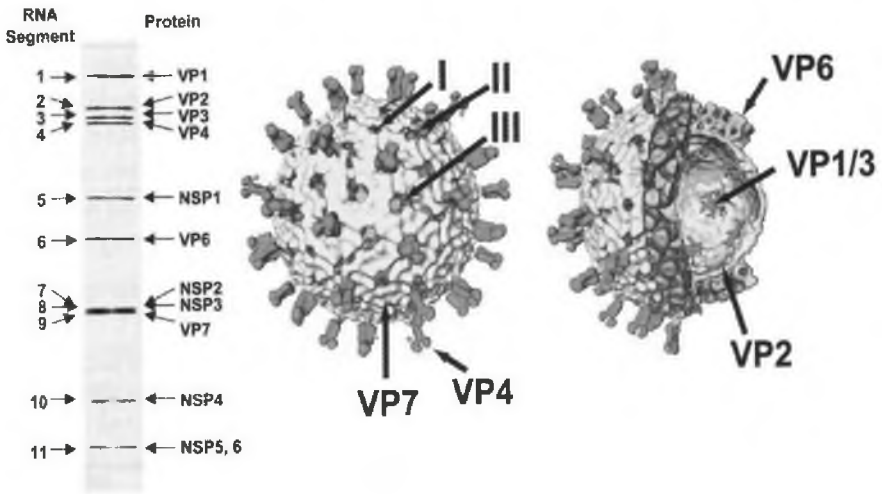


Figura: 3.- Composición proteica de Rotavirus. Electroferograma en gel de poliacrilamida de los 11 segmentos de ARN doble cadena. Las proteínas estructurales correspondientes a estos segmentos se indican a la derecha. Imágenes de las partículas virales con las tres capas (TLPs) de las proteínas estructurales de cápside del virión de rotavirus, VP7, VP4, externas VP6, VP2 y VP1/3 internas. En n°s romanos se indican las posiciones de los tres tipos de canales.

La capa más interna está compuesta de 120 subunidades de la proteína VP2 (60 dímeros) que contiene el ARN viral y las proteínas VP1 ARN polimerasa ARN dependiente (RdRp) y VP3 una guaniltransferasa y metiltransferasa, enzima de capping (McClain, Settembre, Temple, Bellamy, & Harrison, 2010; Trask, Ogden, & Patton, 2012). La cápside interna intermedia, está formada por VP6 que se asocia en una estructura de icosaedro conteniendo 260 trímeros (Mathieu et al., 2001) que además contiene tres tipos de canales (Figura 3). Por los canales de tipo I emergen los mRNA transcritos de las partículas subvirales doble capa o DLPs (double layered particles, Figura 5) (Lawton, Estes, & Prasad, 1997).

La cápside externa de las partículas virales maduras TLPs triple capa (Triple layered particles) está constituida por 260 trímeros de VP7 y 60 trímeros en forma de espícula formados por VP4 (por procesamiento proteolítico da VP8* y VP5*) (Jayaram, Estes, & Prasad, 2004) la cual a su vez interactúa con VP7 y VP6 (Settembre, Chen, Dormitzer, Grigorieff, & Harrison, 2011). (Figura 4)

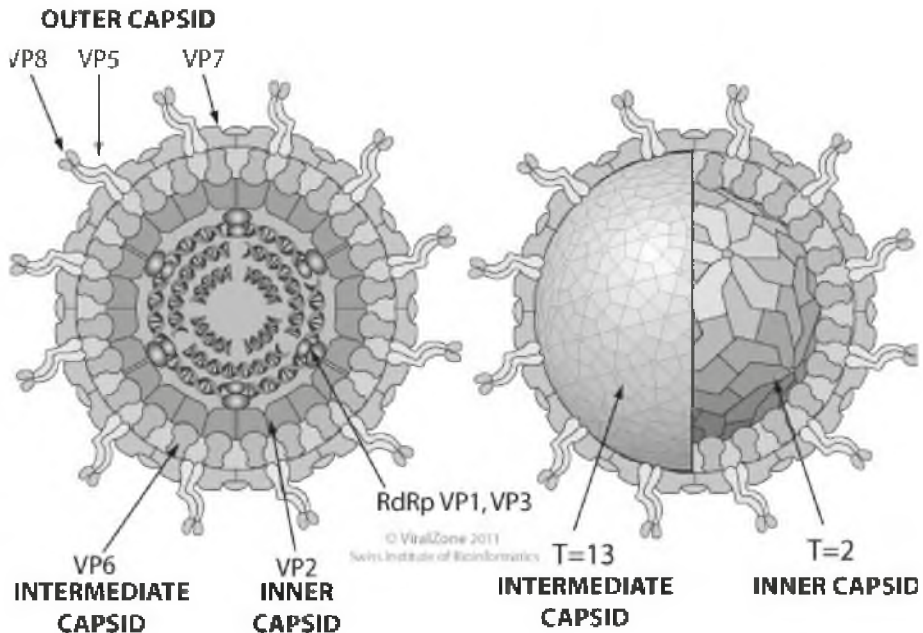


Figura 4.- Organización estructural de una partícula TLP de RV. Vista en corte mostrando la capa externa formada por VP7 (verde claro) y VP4 (amarillo VP5* naranja VP8*), la capa intermedia VP6 (verde) y la capa interna VP2 (verde-azul). Esquema de la organización interna de los segmentos genómicos de RV con las enzimas transcripcionales (RdRp VP1, VP3) ancladas internamente dentro del núcleo.

1.2. Tipificación de rotavirus

La proteína estructural interna intermedia de la cápside VP6, es la más abundante del virión (51 %), y presenta características antigénicas, que permiten la tipificación de los rotavirus. De acuerdo a la reactividad frente a VP6, existen ocho grupos diferentes de rotavirus (A-H), los grupos: A, B, y C, se encuentran tanto en humanos como en animales y los D, E, F y G se hallan en animales, recientemente se propuso agregar además el grupo H (Matthijnssens et al., 2012)

El grupo A es responsable de la mayoría de las infecciones en humanos y el de mayor importancia epidemiológica. Del mismo modo, este grupo se clasifica en los subgrupos I, II, I + II, y no-I, no-II según su reactividad a los anticuerpos monoclonales 255/60 y 631/9 (Greenberg et al., 1983). La presencia en el virión de dos proteínas externas de cápside altamente reactivas frente a anticuerpos neutralizantes VP7 y VP4 dio lugar a un sistema binario de clasificación de rotavirus basado en los diferentes serotipos de las proteínas VP7 y VP4 (Green & Kapikian, 1992; Offit, Clark, Blavat, & Greenberg, 1986).

Hasta 2009 se reportaban 16 serotipos/genotipos específicos de VP7 denominados G-tipos debido a que VP7 es una glicoproteína. Todos los genotipos G se han caracterizado como serotipos/genotipos puesto que hay una correlación evidente entre genotipo y serotipo. Los serotipos específicos correspondientes a VP4 llamados P-tipos por proteína sensible a proteasas son 27.

En el caso de VP4 los serotipos conocidos no siempre se corresponden con un solo genotipo. Por lo tanto se toma como nomenclatura consenso para denominar un determinado rotavirus, indicando el G-tipo (VP7) serotipo/genotipo con un n° de orden y el P-tipo (VP4) con un n° de orden para el serotipo y un n° de orden en corchetes para el genotipo. Por ejemplo para la cepa de rotavirus de simio SA11 CI3 se describe G3 P5B [2] (M. K. Estes, Greenberg, H.B., 2013).

El análisis y comparación de la secuencia parcial o completa de los 11 segmentos genómicos se está utilizando en la actualidad para establecer un nuevo sistema de clasificación (Matthijnssens, Ciarlet, Heiman, et al., 2008; Matthijnssens, Ciarlet, Rahman, et al., 2008). De acuerdo a esta nueva clasificación basada en la secuencia nucleotídica

existen por lo menos 27 G tipos de VP7, 37 P tipos de VP4 y 18 I tipos de VP6 conforme al porcentaje de identidad entre las secuencias (Matthijssens, Ciarlet, et al., 2011). Mediante el análisis filogenético se pueden identificar cluster/genotipos que han seguido caminos evolutivos divergentes, eventos de rearreglo, y estudiar relaciones genéticas entre rotavirus de diferentes grupos y origen animal.

Los rotavirus, presentan una alta tasa de mutación espontánea, al igual que varios virus con genoma ARN. Un factor que explica este fenómeno está asociado a la elevada tasa de error de las ARN polimerasas ARN dependientes virales que carecen de función correctora o reparadora (proof-reading) por la falta de actividad exonucleasa 3'-5' (Blackhall, Fuentes, & Magnusson, 1996; De Grazia et al., 2014; Martínez-Laso et al., 2009). Por otro lado debido a la organización segmentada que presenta su genoma, los genes que codifican los antígenos G y P se segregan independientemente, observándose varias combinaciones de G y P que contribuyen a la gran diversidad de las cepas de este virus (Iturriza-Gomara, Wong, Blome, Desselberger, & Gray, 2002). También debido a esta característica, los rotavirus pueden generar variabilidad genética, mediante recombinación y rearreglos o reordenamientos genéticos (reassortments) los cuales se manifiestan en las coinfecciones con dos cepas de rotavirus diferentes, en una misma célula (aparición de cepas de rotavirus animales en la población humana) (Iturriza-Gomara, Isherwood, Desselberger, & Gray, 2001; Matthijssens, De Grazia, et al., 2011; Mullick et al., 2013; Steyer, Poljsak-Prijatelj, Barlic-Maganja, & Marin, 2008).

1.3. Ciclo replicativo de rotavirus

La replicación viral ocurre en los enterocitos diferenciados de las vellosidades del intestino delgado (M. K. Estes, Greenberg, H.B., 2013). La replicación es exclusivamente citoplasmática.

Los rotavirus triple capa TLPs interactúan a través de sus espículas VP8* (VP4) con los receptores celulares de ácido siálico (AS). Diversas proteínas celulares de la membrana actúan como correceptoras específicas como varias integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha \nu \beta 3$, $\alpha \chi \beta 2$, $\alpha 4\beta 1$, que reaccionan con dominios ligandos de VP5* (VP4) y VP7 (Coulson, Londrigan, & Lee, 1997; K. L. Graham et al., 2003; Gutierrez et al., 2010; Zarate, Romero, Espinosa, Arias, & Lopez, 2004), o la proteína Hsc70 (Human heat shock cognate protein 70) (Guerrero et al., 2002;

Perez-Vargas, Romero, Lopez, & Arias, 2006; Zarate et al., 2003). Estos receptores están asociados a lípidos de la membrana que sirven de plataforma (lipids rafts) para la adsorción de las partículas TLPs de RVs (Isa, Realpe, Romero, Lopez, & Arias, 2004). La infección comienza con la entrada de las partículas virales mediante endocitosis (Haselhorst et al., 2009; Lopez & Arias, 2004).

Los viriones pierden la cubierta de proteínas estructurales externas VP7 y VP4 debido a la baja concentración de iones Ca^{2+} y por la acción de enzimas endosomales (Ludert, Michelangeli, Gil, Liprandi, & Esparza, 1987) (Figura 5).

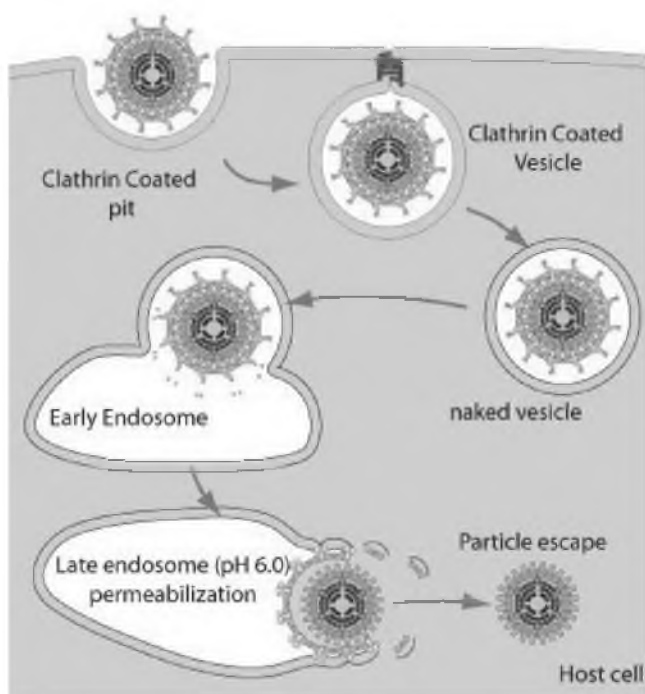


Figura: 5.- Adsorción, endocitosis y decapsidación de la partícula viral de RVs. Esquema simplificado, los rotavirus triple capa TLPs se adsorben a la célula huésped mediante la unión de VP4 (VP8*-VP5*) y VP7 a receptores específicos, y la infección comienza con la entrada de las partículas virales mediante endocitosis. La capa externa de la partícula se pierde por la baja concentración de Ca^{2+} en el endosoma liberando al citoplasma la DLP activa.

En el citoplasma de la célula infectada, las partículas doble capa DLPs conformadas por VP6 y VP2, permanecen intactas y actúan como la unidad transcripcional viral (Figura 6).

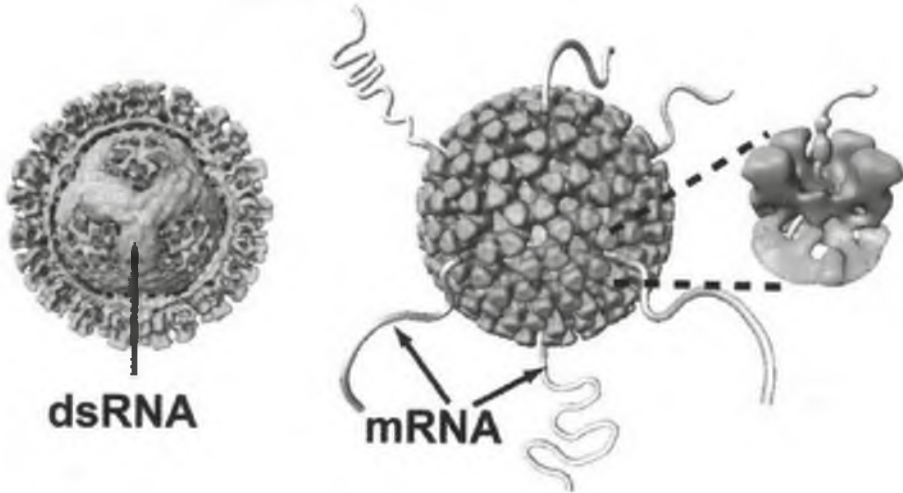


Figura: 6.- Estructura de partículas doble capa o DLPs 2/6. En la primera imagen se observa el sitio donde se ubica espacialmente el dcARN genómico en un corte que expone las capas de VP6 y VP2. En la segunda imagen se visualiza una DLP entera como unidad transcripcional viral activa con hebras de mRNA surgiendo a través de los canales tipo I.

Estos complejos de transcripción están compuestos de VP1, ARN polimerasa viral ARN dependiente (RdRp) y la enzima de capping VP3 con actividades fosfodiesterasa, guaniltransferasa y metilasa.

De las hebras ARN (-) de los 11 segmentos genómicos se transcriben las moléculas de mRNA simple cadena no poliadeniladas (+) con estructuras Cap que surgen a través de los canales tipo I del icosaedro DLP compuesto por VP6 (Jayaram, et al., 2004)²¹ y son traducidas en 6 proteínas estructurales y 6 proteínas no estructurales. Se forman entonces cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos denominados “viroplasmas” que contienen VP2, VP1, VP3, VP6, NSP2, NSP5, y NSP4 (Figura 7) (Campagna, Eichwald, Vascotto, & Burrone, 2005; Silvestri, Taraporewala, & Patton, 2004). Los viroplasmas movilizan lípidos celulares (lipids droplets) como fuente de energía y transporte (Cheung et al., 2010; Gaunt et al., 2013).

NSP2 y NSP5 intervienen en la formación y estabilidad de los viroplasmass (Contin, Arnoldi, Campagna, & Burrone, 2010; Criglar et al., 2014; Eichwald, Rodriguez, & Burrone, 2004). Aquí se van ensamblando las partículas virales junto al ARN viral simple cadena para formar un núcleo (VP2, VP1, VP3) con los 11 segmentos genómicos, los cuales replican a ARN doble cadena (Silvestri, et al., 2004).

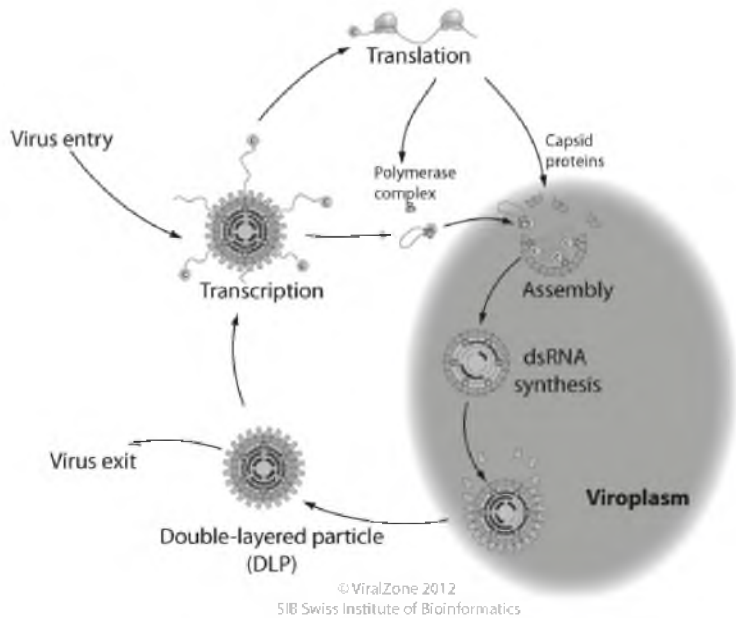


Figura: 7.- Síntesis, y traducción de mRNA de RV, y formación de viroplasmass. Las DLPs comienzan la transcripción de los mRNA y estos son traducidos a proteínas virales. Con la acumulación de las mismas el ARN genómico se replica y es incorporado a nuevas DLPs en las estructuras especializadas denominadas viroplasmass.

Con la incorporación de VP6 se forman DLPs que luego son liberadas del viroplasma. Estas partículas son captadas por una glicoproteína transmembrana NSP4 que se encuentra asociada a la membrana del RER (retículo endoplásmico rugoso) y actúa como receptor de VP6 formando una envoltura transitoria con el agregado de VP4 y VP7.

Además NSP4 actúa como una viroporina aumentando la liberación de Ca^{2+} intracelular para estabilizar la capa externa de las partículas TLPs, (Hyser, Collinson-Pautz, Utama, & Estes, 2010; Hyser, Utama, Crawford, Broughman, & Estes, 2013; Tian et al., 1994) y es secretada como componente soluble formando estructuras vesiculares en el citoplasma y viroplasma (Berkova et al., 2006).

En el citoplasma NSP3 interfiere con la traducción de mRNA celulares al unirse a las PABP (PolyA binding protein) (Groft & Burley, 2002; Piron, Vende, Cohen, & Poncet, 1998). A su vez la proteína NSP1 cumple la función de ser antagonista de la respuesta inmune innata. Finalmente en el RER se forma el virión triple capa maduro TLP que se libera por brotación o lisis celular (M. K. Estes, Greenberg, H.B., 2013). (Figura 8)

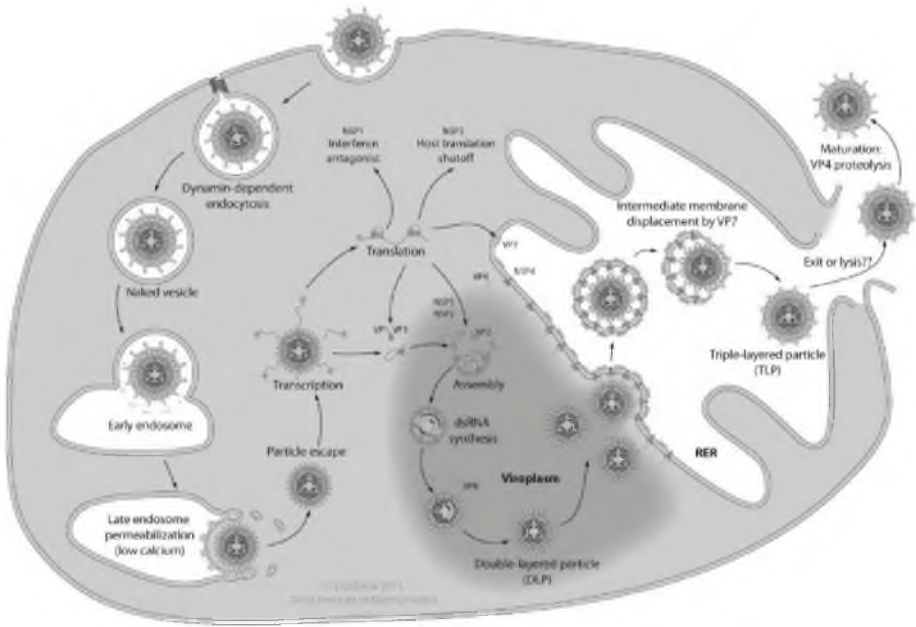


Figura: 8.- Esquema del ciclo replicativo de rotavirus. El virus interactúa con sus receptores en la superficie de la célula y penetra por endocitosis. En el interior de la célula se activa la transcriptasa viral y los ARNm dirigen la síntesis de proteínas virales. Las proteínas se acumulan en estructuras llamadas viroplasma donde se auto ensamblan las partículas de doble capa (DLPs), y el ARN viral se replica. Las nuevas DLPs formadas interactúan con NSP4 transmembrana del RE formando DLPs-NSP4 (NSP4 + VP4 + VP7) y brotan hacia el lumen como partículas virales inmaduras con membrana lipídica. Finalmente se produce la partícula viral madura o TLP. La progenie viral se libera por lisis celular o brotación

2. Patología de la infección por rotavirus humano A

La infección por rotavirus *in vivo* se localiza en el epitelio de las vellosidades del intestino delgado. Se disemina a lo largo del tracto, desde el intestino delgado proximal hasta el íleon. La replicación viral en los enterocitos maduros provoca la lisis celular liberando la progenie viral que conlleva a la necrosis y atrofia de la región apical de las vellosidades intestinales (Mary K. Estes & Atmar, 2003). Estas células tienen funciones digestivas y absorbivas, expresan disacaridasas, peptidasas y otras enzimas que promueven la digestión en la superficie apical. Estas lesiones generan la pérdida de funciones aumentando la presión osmótica del lumen intestinal acrecentando la pérdida de fluidos y electrolitos.

La infección genera una hiperplasia reactiva de las células secretoras de las criptas, que estimula el incremento de la secreción líquida contribuyendo a la severidad de la diarrea (Ulrich Desselberger & Gray, 2013). Se ha planteado que la diarrea es causada por la proteína no estructural NSP4 que actúa como enterotoxina viral (Ball, Tian, Zeng, Morris, & Estes, 1996). Dentro de la célula altera la permeabilidad de la membrana plasmática (Newton, Meyer, Bellamy, & Taylor, 1997) y desestabiliza las uniones intracelulares (Tian, Ball, Zeng, & Estes, 1996)

NSP4 es secretada tempranamente durante la infección como molécula entera o un fragmento peptídico (Bugarcic & Taylor, 2006; M. Zhang, Zeng, Morris, & Estes, 2000) interactuando con las integrinas $\alpha 1\beta 1$ y $\alpha 2\beta 1$ ubicadas en la membrana basolateral de células intestinales no infectadas (Seo et al., 2008). Estos receptores activados desencadenan una serie de reacciones que aumentan el Ca^{2+} intracelular induciendo la secreción transepitelial de iones Cl^- que desequilibra el balance iónico de la célula y provoca la salida de agua (Tian, et al., 1994).

2.1. Respuesta inmune

La infección neonatal o primaria por rotavirus genera una respuesta inmune humoral específica de serotipo, dando protección homotípica a través de la producción de anticuerpos, contra proteínas virales específicas, producidos por linfocitos B estimulados

por células T CD4 que reconocen epitopes de RVs en la superficie de moléculas MHC I de células infectadas y en moléculas MHC II de células presentadoras de antígeno APCs (B. Jiang, Gentsch, & Glass, 2002; Offit, 1994). Se desarrolla una protección parcial contra infecciones posteriores con otros serotipos que aumenta con el número de re infecciones (Velazquez et al., 1996). Mientras que las células T específicas de RVs ayudan a eliminar la infección primaria son las células de memoria B las que proveen protección de largo plazo (Franco, Angel, & Greenberg, 2006).

Se producen anticuerpos neutralizantes (Nabs) específicos, IgM, IgG e IgA secretoras, contra las proteínas estructurales de la cápside VP4 y VP7 y particularmente anti VP6, VP2 en altos títulos, también contra NSP4 (Burns, Siadat-Pajouh, Krishnaney, & Greenberg, 1996; Feng, Franco, & Greenberg, 1997; Svensson et al., 1987). Se ha demostrado que los anticuerpos IgA dirigidos contra VP6 son captados (transcitosis) por receptores de la proteína J en la membrana basolateral de células epiteliales intestinales y forman complejos con las DLPs recién formadas que se liberan de los viroplasmas impidiendo la formación de TLPs maduras (neutralización intracelular) (Aiyegbo et al., 2013; Cortes et al., 2006). Existe una respuesta celular mediada por células natural killer y por linfocitos T citotóxicos (CD8) en la protección primaria y contra reinfecciones (Franco, et al., 2006; Franco & Greenberg, 1995).

En la mucosa intestinal los rotavirus hacen contacto con las células epiteliales M, que se encuentran esparcidas por todo el epitelio mucoso, éstas median el transporte del virus hacia las Placas de Peyer, en donde son captados por los macrófagos, las células B y otras células presentadoras de antígeno (APC Plasmacytoid dendritic cells) (Deal, Lahl, Narvaez, Butcher, & Greenberg, 2013) que a su vez presentan el antígeno a las células CD4 dando inicio a la respuesta efectora en la lámina propia del intestino. En este proceso participan células B virus-específicas para la secreción de IgAs secretorias fundamentales en la protección del tejido epitelial intestinal.

La infección primaria por RVs desencadena varios mecanismos que interfieren con la respuesta inmune innata a nivel celular. NSP1 es capaz de interactuar con proteínas celulares que intervienen en las vías de activación de Interferon IFN como los factores de regulación de Interferon IRF 3 y NF- κ B entre otros (Graff, Ewen, Ettayebi, & Hardy, 2007; Graff, Mitzel, Weisend, Flenniken, & Hardy, 2002; Sen, Pruijssers, Dermody, Garcia-Sastre, & Greenberg, 2011) favoreciendo su degradación, de esta manera disminuye

la transcripción de IFN y de genes estimuladores de IFN (ISG)(Angel, Franco, & Greenberg, 2012). Por otra parte NSP1 a su vez inhibe la translocación al núcleo de los factores de transcripción STAT1/STAT2 impidiendo el establecimiento de un estado antiviral mediado por IFN (Holloway & Coulson, 2013; Holloway, Truong, & Coulson, 2009; Sen, Rott, Phan, Mukherjee, & Greenberg, 2014).

La infección natural o la vacunación apropiada pueden proteger contra la enfermedad severa y subsecuentes infecciones incluso contra serotipos heterólogos (Velazquez, et al., 1996).

2.2. Aspectos epidemiológicos de las infecciones causadas por rotavirus

Los rotavirus del grupo A causan el 5-10 % de todos los casos de gastroenteritis aguda grave y diarreas acuosas severas en niños menores de 5 años, (Liu, et al., 2012; Malek, et al., 2006; Parashar, et al., 2006) y tienen un gran impacto sobre la morbilidad y mortalidad de la población infantil, siendo responsables de más de ~ 453.000 muertes anuales, en el todo el mundo (90 %), predominantemente en regiones de escasos recursos (Tate, et al., 2012).

Se caracteriza por un período de incubación de 24-72 horas con manifestaciones clínicas que varían desde formas asintomáticas hasta formas muy severas con diarrea acuosa durante 4-7 días, rápida deshidratación, fiebre, vómitos, anorexia y dolor abdominal.

En general la infección se auto circunscribe en niños bien nutridos con una duración aproximada de entre 2-14 días. También pueden causar infección crónica en pacientes con inmunodeficiencia congénita o adquirida (Ulrich Desselberger & Gray, 2013).

El único tratamiento paliativo de la diarrea causada por rotavirus se basa en la aplicación de una terapia de rehidratación, oral y/o parenteral, según el grado de deshidratación(Guarino et al., 2012). Las soluciones orales conteniendo altas concentraciones de anticuerpos anti RVs han probado ser útiles terapéuticamente así como también como medida de prevención (Ebina, 1996). El uso de granisetron, un antagonista del receptor de serotonina y péptidos antagonistas vasoactivos a nivel intestinal (Kordasti, Sjovall, Lundgren, & Svensson, 2004) parecen tener beneficios a la hora de disminuir la severidad de la diarrea. Otro enfoque investigado es la aplicación de antivirales como el nitazoxanide (La Frazia et al., 2013).

El modo de transmisión es principalmente por la vía fecal-oral o por consumo de agua y alimentos contaminados. La dosis infectiva es baja, de 10 ufp (Unidades formadoras de placa), que corresponden a 1 DD₅₀ (50% dosis causante de diarrea) convirtiendo a este virus en altamente contagioso (D. Y. Graham, Dufour, & Estes, 1987) para cualquier huésped susceptible, debido a su eficiente dispersión y resistencia (Keswick, Pickering, DuPont, & Woodward, 1983).

Existe una amplia variedad antigénica y genómica respecto de los rotavirus circulantes, alrededor del 80-90 % son tipo G1-G4 representados por los serotipos G y P más frecuentes; G1P1A [8], G2P1B [4], G3P1A [8] y G4P1A [8] y más recientemente se ha detectado la circulación de G9P1A[8] y G12P1A[8] los cuales son responsables de la mayoría de los casos de diarrea infantil en América del Norte, Europa y Australia, (Gentsch et al., 2005; Iturriza-Gomara et al., 2011; Santos & Hoshino, 2005) mientras que en América del Sur y Asia constituyen aproximadamente el 68 %, y en África el 50 %. Otros genotipos como G5, G6 y G8 son más prevalentes en estas regiones (Kang et al., 2013; Luchs & Timenetsky Mdo, 2014; Todd, Page, Duncan Steele, Peenze, & Cunliffe, 2010). Cepas de virus con otras combinaciones G-P, consideradas inusuales, han sido descritas también y representan el 5% de todos los aislamientos en el mundo. El grupo B está asociado con brotes de diarrea severa que afectan a miles de personas de todas las edades en China (Hung et al., 1984) y algunos casos en Bangladesh e India (Lahon et al., 2013). El grupo C corresponde a casos esporádicos y raros de diarrea en niños, informados en Japón e Inglaterra (Nilsson et al., 2000). En aves se han reportado infecciones por RVD, RVF y RVG. El octavo genotipo RVH se detectó recientemente en lechones, (Marthaler et al., 2014; B. L. Molinari, Lorenzetti, Otonel, Alfieri, & Alfieri, 2014) y en humanos (S. Jiang et al., 2008).

Así medio millón de los niños que mueren anualmente por infecciones ocasionadas por rotavirus se encuentran en países en desarrollo. Se estima que en el período de 2000 a 2004 (Parashar, et al., 2006) hubo un aumento de las muertes infantiles por rotavirus, que ascendieron a más de 600 000 a nivel global. En América Latina se estima que 10 millones de niños sufren esta enfermedad todos los años, generando dos millones de consultas, de ellos, 75 mil son hospitalizados y 15 mil mueren ("Vigilancia epidemiológica de diarreas causadas por rotavirus: guía práctica," 2007).

En la Argentina, el Programa de Vigilancia del Ministerio de Salud informó que

el 40 % de las internaciones por diarrea aguda en menores de 5 años se deben a rotavirus que generan 80.000 a 100.000 consultas médicas por año. Las estadísticas del periodo 2009-2011, estiman alrededor de 150.000 mil casos de diarrea 15.000 hospitalizados y 30 muertes anuales en menores de 5 años a causa de RVs (Degiuseppe, Giovacchini, & Stupka, 2013). En los países de más bajos recursos las muertes infantiles por gastroenteritis agudas y diarrea provocadas por rotavirus es mayor, producto de la desnutrición y de las dificultades para acceder oportunamente a los servicios de salud (acceso limitado a las terapias de rehidratación).

En países en vías de desarrollo, la tasa de infección más alta ocurre entre los 3 y 11 meses de vida y en los países desarrollados durante el segundo año de vida. Los países de clima templado tienen infecciones debidas a rotavirus A, predominantemente en invierno, mientras que en los países tropicales los casos de enfermedad ocurren durante todo el año, aunque se puede registrar una incidencia más alta en invierno.

3. Diagnostico de la infección por rotavirus humano A

Debido a que el número de partículas virales eliminadas por un niño diarreico es de 10^{10} 10^{12} virus/ml de heces en la fase aguda de la enfermedad, el diagnóstico convencional más aceptado se realiza mediante la detección rápida del antígeno de rotavirus grupo A en materia fecal por un ensayo E.L.I.S.A (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas) dirigido contra la proteína VP6 de la cápside intermedia del virión (Brandt et al., 1981).

Otros métodos utilizados para detectar infección por rotavirus se basan en ensayos de aglutinación, electroforesis en geles PAGE para revelar el genoma viral, o microscopia electrónica (Gomara, Green, & Gray, 2000).

Los G tipos y P tipos se pueden determinar por técnicas serológicas pero las técnicas de diagnóstico molecular de mayor sensibilidad están siendo aplicadas con mayor frecuencia para la detección o para la genotipificación. Primers específicos para regiones conservadas y variables de VP6, VP4 y VP7 permiten la detección por RT-PCR de los diferentes subgrupos y la determinación de los tipos G y P (Iturriza-Gomara, Kang, & Gray, 2004).

Los métodos de diagnóstico basados en cultivos celulares y aislamiento viral continúan siendo complejos y requieren mayor tiempo de realización. El rápido diagnóstico a través de técnicas inmunológicas probadas, simples en su procedimiento como el ensayo ELISA constituye la metodología de uso principal en el diagnóstico de rotavirus humanos.

La proteína interna intermedia de la cápside VP6 es el principal antígeno utilizado en los ensayos diagnósticos serológicos tipo ELISA debido a que presenta epitopes muy conservados entre las diversas cepas de rotavirus. Además posee una comprobada capacidad antigénica apropiada para la producción de anticuerpos policlonales o monoclonales con fines diagnósticos o para la construcción de VLPs (Viral Like Particles) junto a otras proteínas estructurales como VP2, VP4 y VP7 para constituir DLPs 2/6 o TLPs 2/6/4/7 con posibles aplicaciones vacunales ya que las mismas imitan la conformación de las partículas nativas auténticas pero carecen del genoma viral infeccioso (Johansson et al., 2008; Peralta, Molinari, & Taboga, 2009).

Resulta interesante entonces la producción de VP6 de rotavirus humano A empleando métodos de expresión de proteínas heterólogas recombinantes. Para lograr este objetivo es particularmente útil, en la expresión de genes virales la aplicación de sistemas de expresión eucariotas, como por ejemplo el sistema baculovirus-células de insecto.

4. Expresión de proteínas recombinantes mediante el sistema baculovirus-células de insecto

Los sistemas de expresión basados en baculovirus, constituyen una herramienta biotecnológica muy versátil, que ha sido utilizada extensamente en la producción de una gran variedad de proteínas recombinantes. El sistema permite, modificaciones pos-traduccionales, transporte y ensamblaje de polipéptidos sintetizados en las células de insecto que producen proteínas funcionalmente similares a las nativas, conservando así sus características antigénicas o inmunogénicas (Kost, Condreay, & Jarvis, 2005; Luckow & Summers, 1988).

Sin embargo, estas células tienen un perfil de glicosilación diferente en comparación con las células de mamífero, debido a que permiten la N - glicosilación con un alto contenido de manosa o paucimanosa (Altmann, Schwihla, Staudacher, Glossl, & Marz, 1995)Glossl, & Marz, 1995).

El empleo de dicho sistema de expresión ofrece ventajas significativas que incluyen el uso de técnicas de clonado simples, la alta propagación de los baculovirus recombinantes y la producción de altos niveles de proteína fáciles de escalar, con la posibilidad de utilizar un sistema de crecimiento celular eucariota que posee contención biológica. Las líneas celulares de insecto (*Sf9*, *Sf21*, *Tn5B1-4*) no requieren CO₂ para su desarrollo y se pueden adaptar a crecer en cultivos de alta densidad para la expresión de elevada producción (O'Reilly, Miller, & Luckow, 1994).

Los baculovirus son virus ADN doble cadena envueltos pertenecientes a la familia *Baculoviridae* que replican solamente en artrópodos principalmente en insectos *Lepidópteros*, *Himenópteros*, y Dípteros aunque también infectan crustáceos del orden *Decápoda*. La familia se divide en 4 géneros; *Alphabaculovirus*, *Betabaculovirus*, *Gammabaculovirus*, y *Deltabaculovirus*. Todos tienen una nucleocapside cilíndrica que varía de 30-300 nm en forma de barra o “báculo”, de allí proviene su denominación (Figura 9)

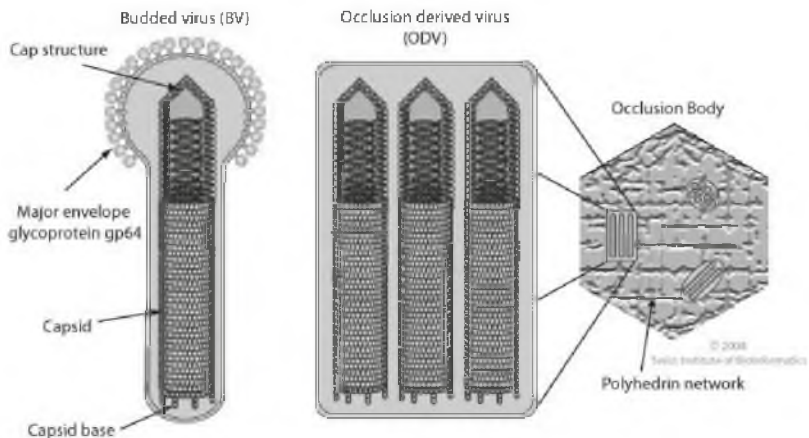


Figura: 9.- Viriones de Baculovirus. Esquema de baculovirus envueltos en sus dos formas: ODV (occlusion derived virus) viriones ocluidos en una matriz proteica, y BV (budded virus) forma extracelular. El genoma es de ADN doble cadena de 80-180 Kb que codifica entre 100 y 180 proteínas.

La infección natural en células de insecto está caracterizada por la producción de dos tipos de viriones funcionalmente y estructuralmente distintos, una variante envuelta ocluida en una matriz proteica de polihedrina ODV (occlusion derived virus) que conforman poliedros o cuerpos de oclusión y otra forma extracelular BV (budded virus) correspondiente a la progenie viral. Los virus ocluidos ODV transmiten la infección de insecto a insecto a través de la ingestión de los cuerpos de oclusión que contaminan el alimento de las larvas. En el intestino los viriones se desprenden de la matriz proteica e infectan las células epiteliales columnares que una vez que completan el ciclo replicativo liberan la progenie viral extracelular BV que se disemina de célula a célula dentro del insecto de manera sistémica. La forma extracelular BV es la que también infecta células de insecto en cultivo (Jarvis, 1997).

La mayoría de los vectores de expresión basados en baculovirus recombinantes aprovechan esta característica reemplazando el gen que codifica la polihedrina con la inserción de un gen heterólogo de interés. El baculovirus recombinante *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV) derivado del virus salvaje (baculovirus de la polihedrosis nuclear multiple) que infecta a la oruga medidora de la alfalfa, *Autographa californica* ha sido ampliamente empleado como sistema de expresión eucariótico de proteínas heterólogas, generalmente en células de insecto *Sf9* de *Spodoptera frugiperda*, (oruga militar tardía o cogollera) desde hace más de dos décadas (O'Reilly, et al., 1994).

Sin embargo esta biotecnología ha ido evolucionando desde su inicio creando baculovirus recombinantes mejorados que facilitan su construcción y producción.

Dicha evolución ha generado gran variedad de aplicaciones, diversas estrategias metodológicas se han planteado modificando genéticamente el virus, permitiendo la expresión de proteínas heterólogas en células de mamífero (Gene delivery) (Condreay, Witherspoon, Clay, & Kost, 1999; Kost & Condreay, 2002). Otro enfoque consiste en la expresión de péptidos o proteínas heterólogas obtenidos sobre la superficie de las partículas virales por fusión del péptido o la proteína de interés a la glicoproteína *gp64* del baculovirus (Baculo Display) (Boublik, Di Bonito, & Jones, 1995; Oker-Blom, Airenne, & Grabherr, 2003). También con el objeto de producir gran cantidad de proteína recombinante se ha utilizado el sistema de baculovirus infectando larvas de insecto, aunque se obtiene una gran concentración de la proteína heteróloga a gran escala, el mantenimiento de los cultivos resulta laborioso (P. Molinari, Peralta, & Taboga, 2008).

Consécutamente en este trabajo se decidió aplicar la metodología del sistema Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System (Invitrogen, Life Technologies) para expresar VP6 de RV HA en células de insecto. Este sistema utiliza un vector bácmido (shuttle) que replica en la bacteria *E.coli* como un plásmido y puede infectar líneas celulares de insectos *Sf9*. El bácmido contiene todo el genoma de AcMNPV, menos el locus de polihedrina que esta nokeado por un sitio receptor de transposición *attTn7*. Posee además un mini F-replicon, y un gen de resistencia a Kanamicina. El elemento *attTn7* es el sitio blanco para el transposón bacteriano Tn7 contenido en el vector pFastBac™1 del sistema.

El cassette de expresión en el vector pFastBac™1 contiene el gen de interés, controlado por el promotor de polihedrina de AcMNPV. Este fragmento está flanqueado a la derecha y a la izquierda por la secuencia del transposon Tn7 incluyendo un gen de resistencia a gentamicina y la señal de poliadenilación de SV40 constituyendo un mini transposón Tn7 que transposiciona al sitio blanco del bácmido en *E. coli* por acción de una transposasa codificada por un plásmido helper en *trans* (Figura 10). Mediante esta transposición específica se obtiene el bácmido recombinante de interés.

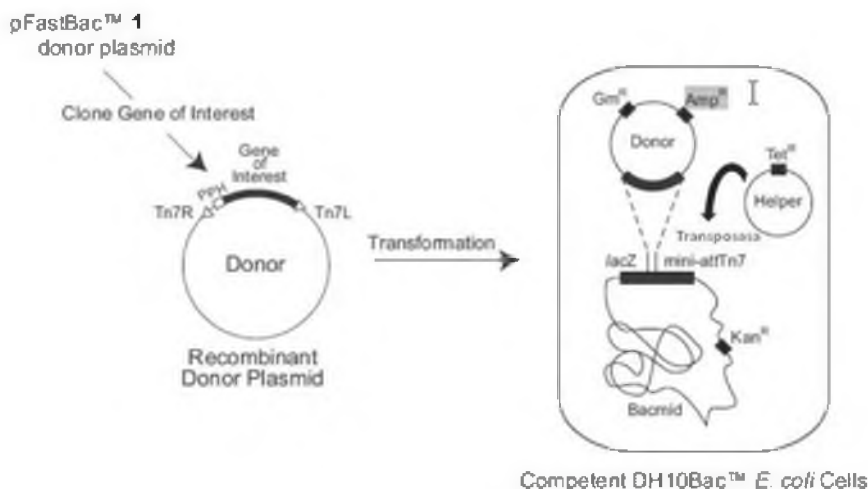


Figura: 10. - Sistema Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System (Invitrogen, Life Technologies). Esquema general del sistema de expresión de proteínas recombinantes (Barry, 1988).

El gen heterólogo se expresa cuando el bácmido recombinante se transfecta a células de insecto *Sf9*. Los baculovirus recombinantes generados pueden ser amplificados en sucesivos pasajes de infección y reinfectar nuevas células de insecto para expresar en gran cantidad la proteína recombinante de interés (Anderson et al., 1995).

5. Consideraciones generales

Como se indicó precedentemente las infecciones causadas por rotavirus generan una alta carga de morbilidad y mortalidad para los sistemas de salud. Los aspectos económicos son importantes al considerar los costos directos de la atención relacionados con el uso de reactivos diagnósticos comerciales que generalmente son de origen importado. El desarrollo y utilización de sistemas de diagnóstico integrales, de menor costo de manufactura nacional permitirían mejorar el acceso, a esta tecnología diagnóstica, a todos los componentes del sistema público de salud a nivel nacional y a organismos relacionados al mismo.

En este sentido se propone como objetivo principal la producción local de la proteína estructural de cápside VP6 de rotavirus humano A, usando un sistema de expresión baculovirus-células de insecto. Posteriormente extractos de células de insecto *Sf9* infectadas con el baculovirus AcVP6 HA que producen VP6 HA recombinante, serán empleados como control positivo, del ensayo diagnóstico (ELISA) para la detección de rotavirus grupo A en heces, ya desarrollado por el Servicio Vacuna Antirrábica del INPB ANLIS Malbrán. Intentando reemplazar al rotavirus inactivado.

Como ya se describió los rotavirus son partículas icosaédricas virales complejas compuestos de una cápside integrada por tres capas concéntricas. VP2 es la proteína estructural más interna. Cuando se expresa en un sistema baculovirus células de insecto, se auto ensambla como pseudo core like particles (CLPs) o pseudo partículas del núcleo similares a virus. La capa media del cápside VP6 también se auto ensambla cuando se expresa en un sistema de baculovirus células de insecto, adquiriendo diferentes conformaciones dependiendo de las condiciones de pH y concentración iónica (M. K. Estes et al., 1987). Estudios anteriores demostraron que la coexpresión de VP2 y VP6 en células de insecto producen VLPs de tipo DLPs 2/6 doble capa estables que pueden ser purificadas (Peralta, et al., 2009; Tosser, Labbe, Bremont, & Cohen, 1992).

En consecuencia con el fin de optimizar y complementar la elaboración de los componentes del kit de diagnóstico mencionado se planteó estudiar la posibilidad de producir VLPs 2/6 recombinantes formadas de la proteína interna del núcleo de la cápside de una cepa de rotavirus de simio, VP2 SA11 producida por un estudio anterior, (Peralta, et al., 2009) y la proteína interna mayor de cápside de rotavirus humano A VP6 HA producida en este estudio, mediante su co expresión en células de insecto *Sf9*.

El servicio vacuna antirrábica del INPB ANLIS Malbrán pretende en una etapa que se extiende más allá del alcance de este trabajo evaluar VP6 HA recombinante junto a las VLPs 2/6 producidas, como inmunógenos para la obtención de sueros policlonales anti rotavirus humano A. Estos sueros previamente purificados se podrán emplear como captura de antígenos de rotavirus en el ensayo diagnóstico ELISA ya montado. El empleo de VP6 HA o las VLPs 2/6 podrían reemplazar al cultivo de rotavirus (fuente de antígeno tradicional), haciendo que este proceso tenga mayores condiciones de bioseguridad y factibilidad.

Se daría así sustento a una producción consistente, que reemplazaría el ensayo comercial de origen importado, que actualmente el MSAL adquiere, para abastecer a la Red Nacional de Laboratorios de gastroenteritis virales. De esta manera se emplearía una prueba diagnóstica de manufactura local producida por un organismo estatal, cuyo beneficio se verá reflejado en el menor costo del reactivo.

OBJETIVOS:

1. Objetivo general

El presente trabajo tiene como objetivo la producción local de la proteína estructural de cápside VP6 recombinante a partir de Rotavirus humano A, aislados en Argentina.

1.1. Objetivos particulares

1.1.1. Clonar y expresar la proteína estructural de cápside VP6 de Rotavirus Humano A en el sistema baculovirus-células de insecto.

1.1.2. Analizar la posibilidad de producir partículas similares a virus VLPs 2/6 conformadas de VP2 de Rotavirus de simio SA11 y de VP6 de rotavirus humano A, producida en este estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Extracción de ARN de RV y RT-PCR

1.1. Identificación de muestras positivas para Rotavirus Humano A

Con el fin de obtener la secuencia codificante para la proteína de cápside VP6 de rotavirus humano, en el laboratorio de Virología de la Universidad Nacional de Quilmes (UNQ) se procedió a analizar 34 muestras procedentes de pacientes con diarrea provocada por infección por RVs. Dichas muestras fueron identificadas previamente, como pertenecientes al grupo A, mediante electroferograma en geles SDS-PAGE teñidos con Plata (Jurado, R. 2008). A partir de 0.25-0.50 g de material fecal, se realizó la extracción de ácidos nucleicos por el método de Vertrel XF (ver protocolo Anexo 1).

Los ARNs obtenidos de esta manera, fueron analizados a través del método de tipificación G por RT-Nested PCR (Gomara, et al., 2000; Iturriza-Gomara, et al., 2004) según las condiciones estandarizadas por el laboratorio de Virología de la Universidad Nacional de Quilmes (UNQ) que amplifica un fragmento de la secuencia codificante para la proteína VP7 genotipos G1, G2, y G4 de rotavirus humano A (ver protocolo Anexo 2).

1.2. Diseño de primers genéricos para aislar VP6 de RV HA.

Se analizaron más de 20 secuencias del gen de la proteína de cápside VP6 de cepas de rotavirus A humano secuenciadas y publicadas en las bases de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Nucleotide Database <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>). En base a la información recopilada se diseñó un set de primers genéricos utilizando el programa Oligo Primer Analysis Software (MBI, Molecular Biology Insights, Inc.) (Rychlik & Rhoads, 1989), con el fin de amplificar la secuencia codificante entera del gen de VP6 HA. Gracias a la alta conservación en el extremo 5' de las secuencias depositadas, se diseñó un único oligonucleótido "HVP6 A Fwd", pero debido

a la divergencia en el extremo 3', se diseñaron dos oligonucleótidos reverse: "HVP6 A1 rev" y "HVP6 A2 rev". Para lograr la expresión de VP6H en el sistema de expresión de baculovirus-células de insecto, se incluyó la secuencia ATT en el extremo 5' del primer forward para darle el contexto óptimo para este sistema de expresión. A continuación, se detallan los oligos utilizados:

HVP6 A Fwd: **5' ATT ATG GAK GTY CTG TAY TCM TTG 3'**

HVP6 A1 Rev: **5' TCA CTT AAT YAA CAT GCT 3'**

HVP6 A2 Rev: **5' TTA TTT GAC AAG CAT GCT 3'**

Código de Bases Y (CT), M (AC), K (GT).

2. Clonado y secuenciación del gen VP6 de RV HA

2.1. Clonado de la secuencia entera de VP6 HA en el vector pGEM-T Easy.

A partir de las muestras de ARN positivos para RV HA, se realizó una RT con random primers (ver protocolo Anexo 3). Con este cDNA, se realizaron dos reacciones de PCR: una con el par de oligonucleótidos HVP6-F y HVP6A1-R y otra con el par HVP6A-F y HVP6A2-R. Sólo se obtuvo producto de amplificación con el primer juego de oligos.

Este producto de PCR se analizó en un gel de agarosa 1 % y se escindió del gel una banda de aprox 1200 pb que coincide con el tamaño esperado para la secuencia que codifica para VP6 HA. Dicho amplicón se extrajo del bloque de agarosa seccionado utilizando el kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)* (ver protocolo Anexo 4). El amplicón purificado se clono en el vector pGEM T Easy (ver protocolo Anexo 5) (Figura 12). Gracias a la actividad transferasa terminal de la *Taq* polimerasa, que agrega un nucleótido de adenosina en los extremos 3' del producto de amplificación, el mismo se puede clonar directamente

en el vector pGEM T Easy ya que el vector linearizado tiene extremos cohesivos con dos timidinas en 3' en ambas cadenas (Figura 1). En cada reacción de ligación se utilizó: 5 µl de buffer de ligación pGEM T Easy 2 X (Tris-HCl 30mM pH 7.8, MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM y ATP 1 mM) y 1 µl de ADN ligasa T4 (3 unidades Weiss/µl), 1 µl de Vector pGEM T (50 ng) y distintas relaciones molares inserto-vector (1-1, 3-1) trabajando con 3 µl (20 ng, 60 ng de inserto, respectivamente) de producto de amplificación purificado, en un volumen final de 10 µl. La reacción se incubó toda la noche a 4° C pGEM-T ("pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems, technical manual,").

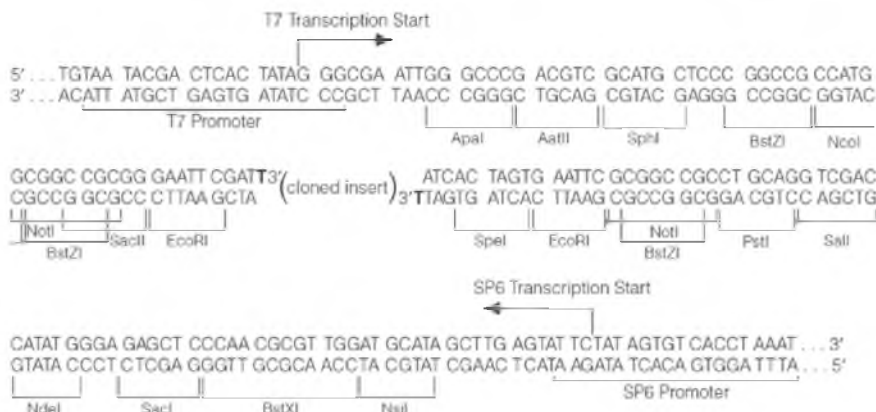


Figura 11.- Sitio múltiple de clonado MCS (Multiple Cloning Site) del vector pGEM-T Easy Vector, conteniendo extremos cohesivos con dos timidinas en 3' en ambas cadenas ("pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems, technical manual,").

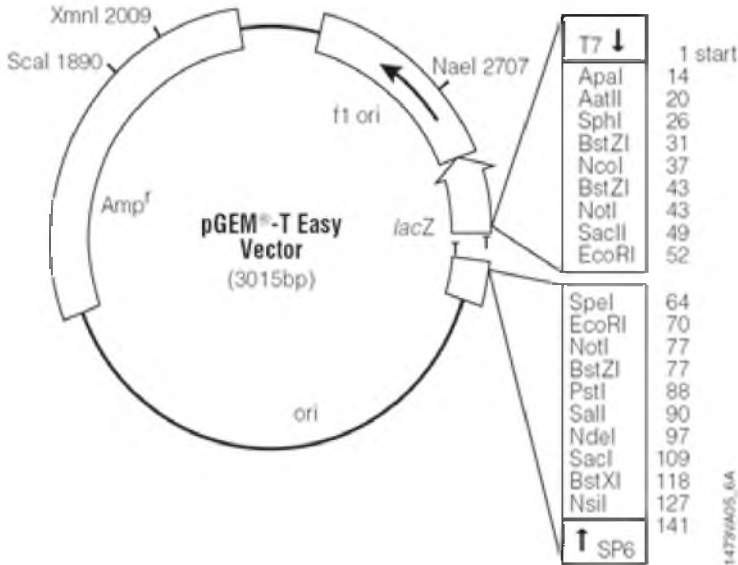


Figura: 12.- Mapa del vector pGEM-T easy (Promega)

Con el producto de la ligación se transformaron bacterias competentes DH5α por el método de transformación química. Brevemente, las bacterias competentes fueron descongeladas lentamente manteniéndolas en hielo. Luego se tomaron 50 µl de éstas y se le agregó entre 20 - 40 ng de ADN (proveniente de la reacción de ligación). La mezcla se incubó durante 30 minutos en hielo y luego las bacterias se sometieron a un choque térmico (Heat shock) a 42° C durante 90 segundos con el fin de permeabilizar la membrana bacteriana y favorecer el ingreso del plásmido. Las bacterias se enfriaron durante 2 minutos en hielo y luego fueron trasvasadas a un tubo con 200 µl de medio LB sin antibiótico y crecidas durante 1 hora a 37° C para permitir la recuperación celular antes de plaquearlas. Finalmente, se colocó todo el volumen de este cultivo en una placa de Petri conteniendo LB agar 100 µg/ml ampicilina, previamente tratada con 40 µl de X-gal. Debido a la inactivación insercional del gen betagalactosidasa del vector pGEM-T se pueden identificar los clones recombinantes, con el agregado del sustrato cromógeno análogo de la lactosa (X-gal), generando así colonias de color blanco pertenecientes a aquellas que posean el

inserto, distinguibles de las colonias azules sin inserto, facilitando de esta manera el tamizaje de colonias de interés a simple vista en la placa de petri. El material se distribuyó uniformemente sobre la placa utilizando un rastrillo de vidrio estéril. Las placas fueron incubadas en posición invertida durante toda la noche a 37° C.

Se seleccionaron las colonias pertenecientes a los clones recombinantes por screening de color blanco - azul, se picaron 10 colonias blancas y se subcultivaron en medio de cultivo LB 100 µg/ml ampicilina durante toda la noche. Con el fin de obtener ADN plasmídico de los clones cultivados se utilizó el kit *Wizard SV miniprep (Promega)*, (ver protocolo Anexo 6). Con el objeto de identificar los clones que incorporaron el inserto VP6 HA, los ADN plasmídicos obtenidos de esta manera fueron digeridos con la enzima de restricción *EcoRI* (ver protocolo Anexo 7) y luego sometidos a electroforesis en gel de agarosa 1 %. Los clones que liberaron un fragmento del tamaño esperado, fueron seleccionados para el siguiente paso.

2.2. Secuenciación del inserto VP6 RV HA

Subsiguientemente se procedió a secuenciar los clones que se seleccionaron por análisis de restricción para confirmar la orientación y secuencias correctas de VP6 HA.

La secuenciación de los vectores pGEM-T Easy fue realizada en el servicio de secuenciación de la Unidad de Genómica del Instituto de biotecnología INTA Castelar usando un secuenciador automático capilar ABI 3500 (*Applied Biosystems*). En todos los casos se utilizó la mezcla preparada de dideoxinucleótidos fluorescentes *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)* siguiendo el protocolo del fabricante.

Primers utilizados:

Promotor SP6: **5' ATT TAG GTG ACA CTA TAG 3'**

Promotor T7: **5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3'**

PUC/M13 Forward: **5' GTT TTC CCA GTC ACG AC 3'**

PUC/M13 Reverse: **5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'**

Los resultados de la secuenciación se analizaron para evaluar la similaridad entre la secuencia obtenida de VP6 HA y las secuencias publicadas en la base de datos Nucleotide collection (nr/nt) utilizando el algoritmo Megablast (highly similar sequences) en el sitio web, BLAST Basic Local Alignment Search Tool: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, nucleotide blast (blastn suite) (Morgulis et al., 2008; Z. Zhang, Schwartz, Wagner, & Miller, 2000). (Ver protocolo Anexo 8). El programa BioEdit v.4.7 (Hall, 1999), se utilizó para la edición de las secuencias y los programas bioinformáticos Translator, y Aligner del sitio web Justbio <http://www.justbio.com/> para la traducción de las secuencias nucleotídicas de VP6 HA y los diferentes análisis de alineamiento.

2.3 Estrategia de clonado de VP6 HA en pFastBacTM1

Con el objeto de subclonar la secuencia de VP6 HA en el vector de transferencia pFastBac1, se procedió a la digestión de la construcción pGEM-T-VP6 HA seleccionada anteriormente, con la enzima de restricción *EcoRI*. De igual manera se trató al vector receptor pFastBac1, sólo que éste fue tratado además, con la enzima C.I.P (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) con el fin de evitar su recircularización (ver protocolo Anexo 9). Ambas digestiones fueron resueltas mediante electroforesis en gel de agarosa 1 % y se escindieron de sendos geles las bandas correspondientes al plásmido pFastBac1 linearizado (4775 pb) y al inserto VP6 HA (1200 pb). Los fragmentos de interés se extrajeron de la agarosa mediante el kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega).

Se procedió entonces a la reacción de ligación (ver protocolo Anexo 9). Se escogieron tres relaciones molares inserto:vector: 1-1, 3-1 y 6-1. Se utilizó: Buffer de ligación 10 X (Tris-HCl 30mM pH 7.8, MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM y ATP 1 mM) y 3 unidades de ADN ligasa T4 en un volumen final de 10 µl. La reacción se incubó toda la noche a 4°C.

Con estas ligaciones se transformaron bacterias *E. coli* competentes DH5α por el método químico anteriormente descrito. Se picaron 10 colonias y se subcultivaron toda la noche en medio LB líquido conteniendo 100 µg/ml Ampicilina.

Para corroborar la inserción de VP6 HA en pFastBac1, se extrajo el ADN plasmídico de estos clones mediante el kit *Wizard SV miniprep* (Promega) y se realizaron digestiones con la enzima de restricción *EcoRI*.

Aquellos cuya digestión mostraban la inserción de VP6 HA se seleccionaron para verificar la orientación correcta del inserto. Los mismos se digirieron con una combinación de endonucleasas de restricción que cortan en el inserto y en el vector, *NheI/HindIII* utilizando el mismo buffer para cada reacción (*Buffer2 Promega*). Para la transformación de la cepa de *E. coli* DH10Bac™ se seleccionaron los clones que verificaran, que el patrón de digestión coincidiera con la orientación correcta. En todos los casos las reacciones de digestión con enzimas de restricción se realizaron de acuerdo a las recomendaciones de los fabricantes (ver protocolo Anexo 10). Cada reacción se incubo a 37 ° C durante 2 horas.

3. Construcción de los baculovirus recombinantes

Con el fin de expresar VP6 HA en el sistema de expresión baculovirus células de insecto, se utilizó la metodología, Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System (*Invitrogen, Life Technologies*) (Ciccarone, Polayes, & Luckow, 1997). Este sistema tiene dos componentes; el primero utiliza un bacmido (shuttle vector bMON14272, 136 kb) que replica en *E.coli* DH10Bac como un plásmido y contiene todo el genoma del baculovirus, *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV), que fue modificado de manera tal que el locus polihedrina está knockeado por una secuencia que codifica para el péptido *lacZa* y además posee un sitio receptor de transposición mini-*attTn7*. Este elemento es el sitio blanco para el transposón bacteriano Tn7 contenido en el vector pFastBac™1 de transferencia (Figura 13).

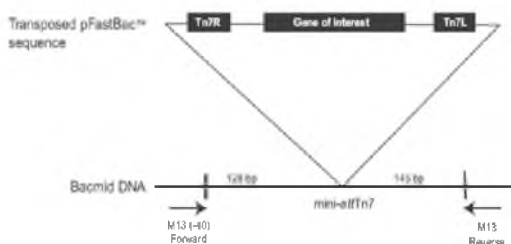


Figura: 13.- Esquema de transposición del cassette de expresión del vector pFastBac™1 al sitio receptor mini-*attTn7* en el ADN bacmido ("Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System. Technical manual," April 2004).

El segundo componente pFastBacTM1 posee un cassette de expresión que contiene el gen de interés, en este caso VP6 HA, controlado por el promotor de polyhedrina de (AcMNPV) este cassette está flanqueado a la derecha y a la izquierda por la secuencia del transposón Tn7 incluyendo un gen de resistencia a gentamicina y la señal de poliadenilación de SV40 constituyendo un mini transposon Tn7 el cual mediante el evento de transposición se inserta en el bacmido (Figura 14) (Luckow, Lee, Barry, & Olins, 1993).

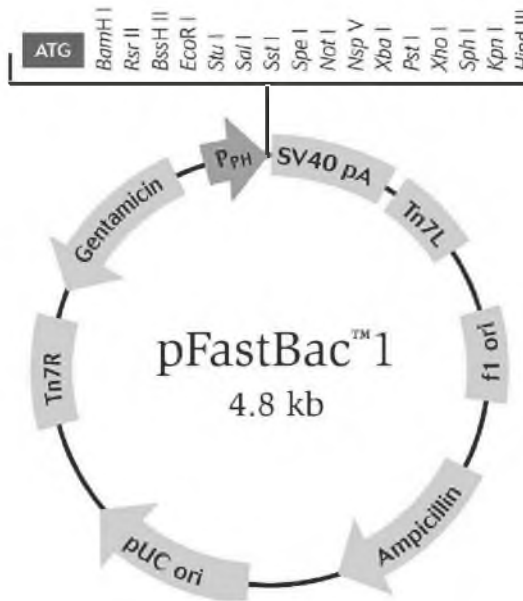


Figura: 14.- Mapa del vector pFastBacTM1 con el sitio de clonado múltiple (MCS) ("Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System. Technical manual," April 2004).

Como se menciono anteriormente la cepa de *E.coli* DH10Bac contiene el ADN bacmido que es un vector de alto peso molecular (136 Kb), que tiene al mismo tiempo un gen de resistencia a kanamicina, un mini F replicón y una secuencia que codifica para el péptido *lacZa*. Esta última característica complementa la delección del gen *lacZ* presente en el cromosoma bacteriano. Asimismo, la bacteria DH10Bac contiene un plásmido helper (asistente) que codifica para una transposasa (Barry, 1988).

Cuando se transforman las bacterias DH10Bac con el vector pFastBac™1 la transferencia por transposición del cassette de expresión interrumpe el marco de lectura del péptido *lacZ*, por lo tanto las colonias recombinantes serán blancas (Lac⁻) en contraste con la colonias que tengan el bacmido inalterado que serán azules. Se pueden entonces visualizar y seleccionar en la placa las colonias de diferente color agregando un substrato cromógeno como Bluogal o X-gal con el inductor IPTG.

Con el bacmido recombinante (evento de transposición confirmado), se transfectan las células *Sf9* donde es capaz de generar progenie viral recombinante. Los baculovirus recombinantes generados de esta manera pueden ser amplificados en sucesivos pasajes de infección y re infectar nuevas células de insecto para expresar en gran cantidad la proteína recombinante de interés ("Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System. Technical manual," April 2004). (Figura 15)

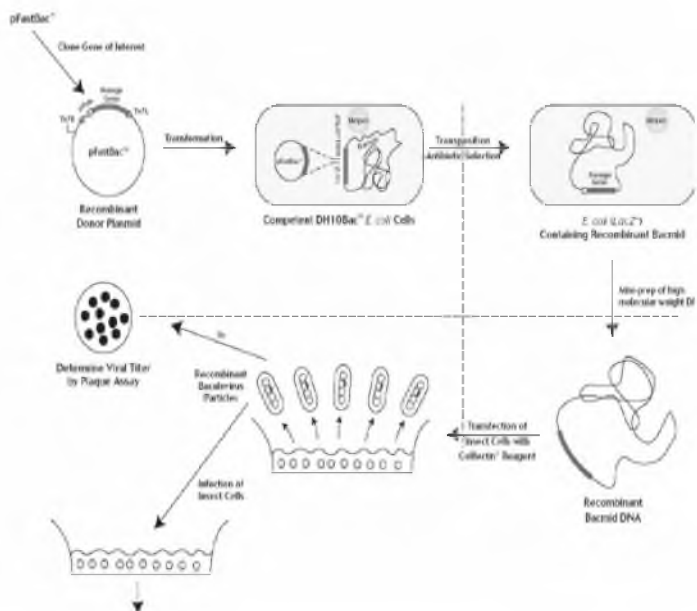


Figura: 15.- Esquema del sistema de producción de baculovirus recombinantes y expresión de genes heterólogos en células de insecto ("Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System. Technical manual," April 2004).

3.1. Transformación de la cepa de *E. coli* DH10Bac™ y transposición al bacmido

Una vez que se obtuvo la construcción pFastBac™1 con el inserto VP6 HA con la secuencia y orientación correcta se procedió a la transformación de la cepa de *E. coli* DH10Bac con el ADN plasmídico purificado para que tenga lugar la transposición del cassette de expresión (Figura 15). El bacmido recombinante se amplifica solamente en las colonias de bacterias de *E. coli* DH10Bac de color blanco que son resistentes a kanamicina (bacmido), gentamicina (pFastBac1), y tetraciclina (*helper*) ("Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System. Technical manual," April 2004).

El protocolo de transformación química usado, en esta ocasión fue el siguiente: las bacterias competentes DH10Bac se descongelaron lentamente manteniéndolas en hielo un vial por cada transformación. 50 µl de DH10Bac™ se transfirieron a un tubo eppendorf de 1,5 ml y se le agregaron entre 6 - 7 ng (0,5 µl) de ADN pFastBac™1. La mezcla se incubó durante 30 minutos en hielo y luego las bacterias se sometieron a un choque térmico (*Heat shock*) a 42°C durante 45 segundos. Las bacterias se enfriaron durante 2 minutos en hielo y se les agregaron 900 µl de medio SOC y crecieron durante 4 horas a 37°C. Finalmente, se colocaron 100 µl de este cultivo en una placa de Petri conteniendo LB agar y 50 µg/ml kanamicina, 7 µg/ml gentamicina, 10 µg/ml tetraciclina, 100 µg/ml Bluo-gal, y 40 µg/ml IPTG. El material fue distribuido uniformemente y las placas se incubaron durante 48 hs a 37° C.

3.2. Análisis de los bacmidos recombinantes por PCR

Diez colonias blancas de DH10Bac™ se seleccionaron para extraer el ADN bacmido recombinante y ser analizarlas por PCR para evaluar si la transposición había tenido lugar.

Se picaron las colonias con escarbidentes estériles y se inocularon tubos de ensayo con 2 ml de LB y 50 µg/ml kanamicina, 7 µg/ml gentamicina, 10 µg/ml tetraciclina, dejándolas crecer a 37° C durante 24 hs en un agitador orbital.

El contenido de cada cultivo se transfirió a un tubo eppendorf de 1,5 ml en dos pasos centrifugando cada vez a 5000 rpm por un minuto para precipitar las bacterias. Se descarto el sobrenadante y las bacterias se resuspendieron en 300 µl de Solución I (15 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A) vortexeando. Luego se adicionaron 300 µl de solución II (0.2 N NaOH, 1% SDS) mezclando cabeza-cola e incubando por 5 minutos a temperatura ambiente. Lentamente se agregaron 300 µl de 3 M acetato de potasio pH 5,5 mezclando cabeza-cola y colocando el tubo en hielo por 10 minutos. Posterior a la incubación se centrifugaron los tubos a 10000 rpm durante 10 minutos. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de 1,5 ml y se le agregaron 800 µl de isopropanol invirtiendo los tubos varias veces para mezclar y luego incubar 10 minutos en hielo. Se centrifugaron los tubos a 13000 rpm por 20 minutos y se retiró el sobrenadante cuidando de no desprender el pellet. Se lavó el pellet con 500 µl de etanol 70 % y se centrifugó 5 minutos a 13000 rpm repitiendo este paso una vez. Se descartó el sobrenadante y se secó el pellet a 37° C durante 10 minutos. Se resuspendió el pellet de cada tubo en 40 µl de 10 mM Tris-HCl, pH 8. Posteriormente el ADN fue cuantificado mediante espectrofotometría UV, y se guardó a 4° C.

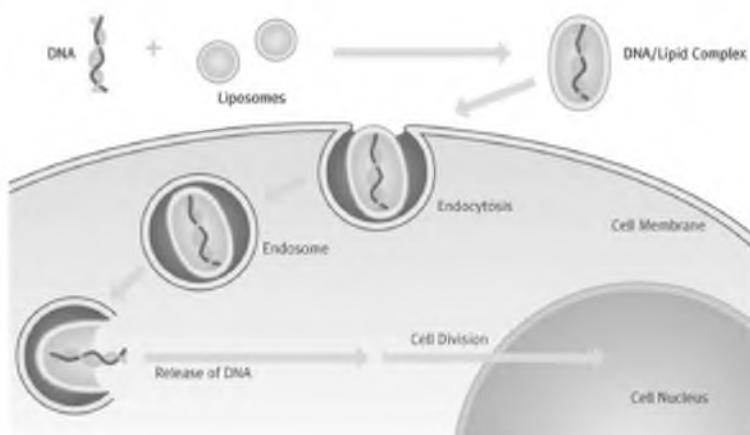
El ADN bácmido recombinante a analizar es mayor de 135 kb lo cual dificulta el análisis por restricción por lo tanto se procedió a verificar la presencia del inserto en el bácmido a través de la utilización de una reacción de PCR. El bácmido contiene los sitios M13 Fwd (-40) y M13 Rev a ambos extremos del sitio mini-*att*Tn7 dentro de la región de complementación *lacZα*. (Figura 13). Para corroborar la presencia de VP6 HA en el bácmido se utilizó una reacción de PCR con los primers; M13 Fwd (-40) **5' GTT TTC CCA GTC ACG AC 3'** y M13 Rev **5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'**. Las amplificaciones se realizaron mediante el siguiente perfil: 1 ciclo de 3 minutos a 94° C seguido de 35 ciclos de 45 segundos a 94° C, 45 segundos a 55° C y 5 minutos a 72° C más un ciclo de extensión final de 7 minutos a 72° C.

En la PCR se usó la enzima *Platinum® Taq polymerase (Invitrogen)* altamente procesiva que puede amplificar fragmentos de alto peso molecular (>4kb) (ver protocolo Anexo 11). La reacción de PCR se realizó en el termociclador (Biorad). El resultado de la reacción de PCR se analizó en gel de agarosa 0.8 %. Si la trasposición del inserto tuvo lugar de pFastBac™1 al bácmido el amplicón de la muestra debería tener un tamaño de 3,5 kb (~ 2300 pb bácmido + 1200 pb VP6 HA) ("Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System. Technical manual," April 2004).

3.3. Transfección del bácmido recombinante a células de insecto y producción de baculovirus recombinantes.

Una vez confirmados y seleccionados los bácmidos que contienen VP6 HA se procedió con la transfección del bácmido recombinante VP6 HA a células de insecto *Sf9* (*Spodoptera frugiperda*) en cultivo. Se sembraron las células de insecto a transfectar en una placa de cultivo de 6 pocillos de 35 mm con una monocapa de $\sim 9 \times 10^5$ células *Sf9* por pocillo con 2 ml de medio de cultivo dejándolas adherirse por una hora a 27°C. Para cada transfección se preparó la mezcla de la siguiente manera: en un tubo eppendorf estéril de 1,5 ml se agregaron 100 μ l de medio Grace's no suplementado (sin suero fetal bovino) más 3 μ l de bácmido purificado aislado (1-2 μ g) y se incubó a temperatura ambiente 5-10 minutos. En otro tubo se mezclaron 6 μ l del reactivo Cellfectina® (1:1.5 M/M mezcla de liposomas de lípidos catiónicos N,N,N,N-tetramethyl-N,N,N,N-tetrapalmityl spermina TM-TPS y Dioleoylphosphatidylethanolamine DOPE), y se diluyeron con 100 μ l de medio Grace's y también se incubó 5-10 minutos a temperatura ambiente. Luego se combinaron ambas mezclas (~ 210 μ l) y se incubaron 30-45 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el medio de cultivo a las células y se reservó. Mientras tanto a la mezcla bácmido + Cellfectina® se agregó a 800 μ l de medio Grace's y este volumen de 1 ml se distribuyó de forma homogénea sobre la monocapa. Una vez dispuesto el medio con los complejos ADN liposomas las células se incubaron a 27° C durante 4-5 hs.

Los complejos ADN bácmido +Cellfectina® se adsorben a la membrana celular y penetran en la célula por endocitosis. El ADN incluido en las vesículas es liberado de los endosomas por la fusión de la membrana liposomal con la del endosoma ("Cellfectin® Reagent Technical manual,") (Figura 16). Concluida la incubación se retiró la mezcla y se repuso el medio de crecimiento original y se continuó con la incubación a 27° C por al menos 72 hs en incubador controlando la aparición de signos de infección por baculovirus. Los sobrenadantes de transfección con infección por baculovirus se seleccionaron, (virus P₀) se filtraron y se clarificaron por centrifugación a 2000 rpm conservándose protegidos de la luz a 4° C.

Figura: 16.- Diagrama general del método de transfección con lípidos catiónicos

La progenie viral se libera al medio a partir de las primeras 72 hs después de la transfección dependiendo de la eficiencia obtenida. Se verificó por observación al microscopio de fase invertida a 240-400 x el estado y los signos de infección de las células en cultivo comparándolas con el control de células no infectadas. En la etapa tardía (24-72hs) las células comienzan a presentar una apariencia granular con desprendimiento de la monocapa y dejan de crecer, en la fase muy tardía (>96hs) se produce la lisis celular (O'Reilly, et al., 1994).

3.4. Preparación del 1^{er} pasaje P₁

A partir del sobrenadante de transfección clarificado (P₀), se infectaron 2×10^6 células *Sf9* creciendo en monocapa en frascos T25 con el fin amplificar la carga viral. A cada frasco se le agregó 100 µl de inóculo con baculovirus recombinantes, se dejó adsorber durante 1 hora a temp ambiente, luego se agregaron 4 ml de medio de cultivo de crecimiento TNM-FH (*Sigma*) suplementado con 10 % SFB (suero fetal bovino) y una solución antibiótica – antimicótica (*Life technologies*) sin retirar el inóculo. Se incubaron los frascos durante 5 días a 27° C controlando la aparición de signos de infección cada 24 horas.

3.5. Preparación del pasaje P₂ de amplificación del stock viral

Se procedió a un segundo pasaje con 100 µl (MOI = 0.05 ver protocolo Anexo 12) de sobrenadante del primer pasaje en frascos T25 siguiendo el mismo protocolo anteriormente descrito. Transcurrido el tiempo de incubación se recolectaron de forma estéril los sobrenadantes, se centrifugaron a 4° C a 2000 rpm y se almacenaron en frío protegidos de la luz para su posterior uso.

4. Análisis de la proteína recombinante VP6 HA

4.1. Análisis de la expresión de la proteína recombinante VP6 HA por electroforesis en geles de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE)

Obtenido el segundo pasaje se realizó un tercer pasaje utilizando botellas T75 a 2×10^6 células agregando a cada botella 500 µl de inóculo de baculovirus recombinantes del segundo pasaje según se describió anteriormente. Se cosecharon las células infectadas del tercer pasaje con el medio de cultivo y se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 minutos, el pellet celular se lavó con 500 µl de PBS pH 6,2 y se resuspendió en 250 µl de una mezcla de agua y de buffer cracking. En este primer ensayo se evaluó la expresión de VP6 HA intracelular. Las muestras se prepararon hirviéndolas durante 10 minutos, en cracking buffer (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 0.01% Azul de bromo-fenol, 1% 2-mercaptoetanol, 10% glicerol).

Las proteínas recombinantes fueron analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) (Sambrook, Fritsch, & Maniatis, 1989). Se prepararon los geles con acrilamida 30 % con una relación acrilamida:bisacrilamida 29:1. La composición del gel concentrador (Stacking) fue: poliacrilamida 4 %, SDS 0,1 % p/v en Tris HCl 0,12 M pH 6,8. Los geles separadores se prepararon con poliacrilamida 10 % o 12%, SDS 0,1% en buffer Tris HCl 0,36 M pH 8,8, de acuerdo al tamaño de la proteína recombinante a observar. La polimerización se realizó usando persulfato de amonio 0,1 % p/v como catalizador y N,N,N',N'-tetrametil etilendiamina (TEMED) 0,06 % v/v como iniciador. Se utilizaron minigeles (6 cm x 9 cm x 1,5 mm) del

sistema Miniprotean III (*Biorad*). La electroforesis se realizó a 120 volts, usando como buffer de corrida Tris-HCl 25 mM pH 8,8, glicina 192 mM, SDS 0,1 %. Finalizada la corrida electroforética, los geles fueron teñidos con una solución de azul de Coomassie 0,05 % (Coomassie Brilliant Blue R250 0,05 %, metanol 50 %, ácido acético 10 %) incubándolos durante 1 a 2 hs con agitación. Luego de la tinción los geles se decoloraron con solución de lavado (metanol 50 %, ácido acético 10 %) durante 1 h, repitiendo el lavado al menos dos veces. En todos los geles se utilizó como estándar de peso molecular el Page ruler™ Pre-Stained Protein Ladder (*Fermentas*).

4.2. Inmunodetección de proteínas electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa por “Western Blot”

Las proteínas separadas en geles de SDS poliacrilamida 10 %, 12 %, fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa 0,2 μ m (Whatman Protran), utilizándose buffer de transferencia (Tris-HCl 25 mM, Glicina 192 mM, 20 % Metanol, pH 8.3). La electrotransferencia se realizó durante toda la noche a 30 volts y a 4° C en el sistema Mini Protean III (*Bio-Rad*). Concluida la electrotransferencia las membranas fueron teñidas con el colorante Rojo Ponceau 10 % (*Sigma*) para evaluar la eficiencia de la transferencia, luego fueron bloqueadas incubándolas en una solución de TBS-leche descremada 5 % durante una hora a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron inicialmente con el anticuerpo primario anti rotavirus humano policlonal producido en conejo por el servicio de vacuna anti rábica del instituto de producción de biológicos (INPB) ANLIS Malbrán, diluido 1/5000 en TBS-leche descremada 3 %, luego se incubó con un anticuerpo secundario anti IgG de conejo conjugado a la fosfatasa alcalina diluido 1/7500 en TBS-leche descremada 3 %. Todas las incubaciones fueron de una hora y se realizaron a temperatura ambiente. Entre las incubaciones se realizaron cuatro lavados de 5 minutos cada uno con TBS-Tween 20 0,01 %. Las membranas fueron reveladas incubándolas a temperatura ambiente y en oscuridad, en una solución de 10 ml de B.R.E.F.A. con 66 μ l de NBT y 33 μ l de BCIP (ver protocolo Anexo 13). Previamente se lavó la membrana 5 minutos con B.R.E.F.A. para estabilizar el pH. La reacción se detuvo con agua destilada.

5. Titulación del stock de baculovirus recombinantes VP2 SA11 y VP6 RVHA mediante ensayo de formación de placas

Se prepararon monocapas de células *Sf9* a $2,5 \times 10^5$ células por pocillo en placa de 6 pocillos por stock viral a titular. Se infectaron las células de cada pocillo, con 330 μ l de diluciones seriales (10 - 10^{-7}) de los stocks de baculovirus respectivos en medio Grace's. Las células se incubaron con el virus durante 1 h. transcurrida la adsorción se preparó la solución de overlay (revestimiento), que consiste en una mezcla de medio de cultivo Grace's más 10 % de suero fetal bovino (fresco) y 0,5% de agarosa Seakem (FMC). Se agregaron 3 ml de overlay sobre la monocapa cuidando de no despegar las células. Se dejó solidificar el medio durante 10-20 minutos y se incubaron las placas a 27 °C durante 5 días. Pasados los 5 días se preparó una nueva de solución de overlay con el agregado del colorante vital rojo neutro (*Sigma*) a una concentración de 50 μ g/ml. Se colocaron 2 ml de solución de overlay con colorante a cada pocillo (O'Reilly, et al., 1994). Una vez solidificada la agarosa se incubaron las placas a 27° C durante 2 días. Finalmente, se procedió a contar las placas de lisis con el fin de calcular el título viral de cada stock, expresado en unidades formadoras de placa por unidad de volumen de stock viral (ufp/ml).

6. Formación, purificación y análisis de VLPs 2/6 de Rotavirus de simio SA11 y Rotavirus humano A

Se evaluó la capacidad de interactuar de VP6 HA con VP2 SA11 (Peralta et al 2009) para formar VLPs. A tal fin se crecieron células de insecto *Sf9* en monocapa en 4 frascos T175 a 3×10^7 células cada una, las cuales se coinfectaron con una MOI (multiplicity of infection) en una relación de baculovirus recombinantes AcVP6_{RVHA}/AcVP2_{SA11} wt de 0,6 usando un inóculo de AcVP6_{RVHA} previamente titulado, con una MOI de 4 y un inóculo de AcVP2_{SA11} wt con una moi de 7. A cada frasco se le retiró el medio y se colocaron ambos inóculos dejando adsorber durante 1 hora. Luego se agregó medio de cultivo a cada frasco y se dejaron incubar a 27° C durante 5 días. Los sobrenadantes de cada botella fueron recolectados, y clarificados por centrifugación a 2000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante clarificado se sometió a una ultracentrifugación en colchón

de sacarosa 35 % (p/p) en buffer TMNC (10 mM Tris-HCl pH 7, 1mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl₂) a 24.000 rpm durante 90 minutos a 10° C en una ultracentrífuga BECKMAN rotor 45 Ti.

Cada pellet resultante se resuspendió en 300 µl de buffer TMNC pH 7. Se separaron 10 µl de la resuspensión y se prepararon muestras para ser analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE y Western Blot (ver protocolo Anexo 13 y 14). El resto del material se sembró en un gradiente de CsCl (densidad – 1,32 g·ml⁻¹) que se ultracentrifugó a 39.000 rpm durante 18 hs a 10 °C rotor SW 55, BECKMAN.

Posteriormente se colectaron las fracciones de sedimentación y se dializaron contra buffer TMNC y se concentró por una subsiguiente ultracentrifugación a 24.000 rpm durante 90 minutos a 10° C rotor SW 41 BECKMAN. Los pellets obtenidos se resuspendieron en buffer TMNC y se analizaron por electroforesis en geles (SDS-PAGE) e inmunodetección por Western blot para identificar la fracción reactiva que contenía las proteínas VP6 HA y VP2 SA11 que formaron las VLPs 2/6 (*Current Protocols in Molecular Biology*, 1994; Peralta, et al., 2009). Las fracciones que resultaron positivas se procesaron para su observación por microscopía electrónica.

RESULTADOS

1. Caracterización de RVs HA por RT-PCR

1.1. Amplificación inicial del gen VP7 de RV HA y tipificación G

A partir de muestras de pacientes con diarrea, se realizó una extracción de ARN (ver sección 1. Materiales y Métodos) con el fin de identificar muestras positivas para rotavirus humano del grupo A (RVH) (Gomara, et al., 2000). Luego de la extracción de los ARN en primer lugar se realizó una retrotranscripción con primers consenso comunes para la mayoría de los genotipos de la glicoproteína VP7 conocidos como Beg9 (RA1) y End9 (RA4). Posteriormente se amplificó VP7 (1062 pb) mediante el primer round de una PCR con los mismos primers Beg9 (RA1) y End9 (RA4) a continuación se procedió a la amplificación de los genotipos G (**G1**, **G2**, **G4**) mediante un segundo round de PCR multiplex con primers específicos. Con un primer reverse común a todos ellos, End9 (RA4) y con los primers forward específicos para cada uno de los genotipos a determinar, aBT1 **G1** (749pb) aCT2 **G2** (652 pb), aDT4 **G4** (583 pb), del gen VP7 (Iturriza-Gomara, et al., 2004) (ver protocolo Anexo 2) que generaron en las muestras positivas, amplicones representativos de cada genotipo, como se observa en la fotografía.



Figura: 17.- Resultados de los productos de reacción de RT - seminested PCR segundo round para los G tipos de VP7 en gel de agarosa 1% TAE IX. Calles 1 y 20: Marcador de PM de 100 pb, Calle18: control positivo VP7 (1062 pb). Calles 3 a 17 y 19: muestras de pacientes.

Las muestras de las calles 7 y 19 resultaron positivas para el genotipo **G4** 583 pb de RVH mientras que la muestra de la calle 10 fue positiva para el genotipo **G1** 749 pb. Con el fin de disponer de material suficiente para la amplificación de VP6 el laboratorio de Virología de la Universidad Nacional de Quilmes (UNQ) cedió una muestra más de ARN positivo genotipo **G2**.

1.1. Amplificación de VP6 de Rotavirus Humano A con los primers diseñados HVP6 A Fwd y HVP6 A1 Rev

Identificadas las muestras de RNA positivas de Rotavirus humano A se procedió a una nueva transcripción reversa con random primers (oligonucleotidos hexámeros de secuencias aleatorias) utilizando la retro transcriptasa RT AMV (*Promega*). Una vez obtenido el cDNA se realizaron dos reacciones de PCR una con los primers diseñados HVP6 A Fwd y HVP6 A1 Rev y otra con los primers HVP6 A Fwd y HVP6 A2 Rev, con el fin de obtener la secuencia completa que codifica para VP6 HA. Se analizaron los productos de la reacción de PCR en un gel de agarosa 1 % y se obtuvieron amplicones del tamaño esperado ~ de 1200 pb solamente con el set de primers HVP6 A Fwd y HVP6 A1 Rev (Figura 18).

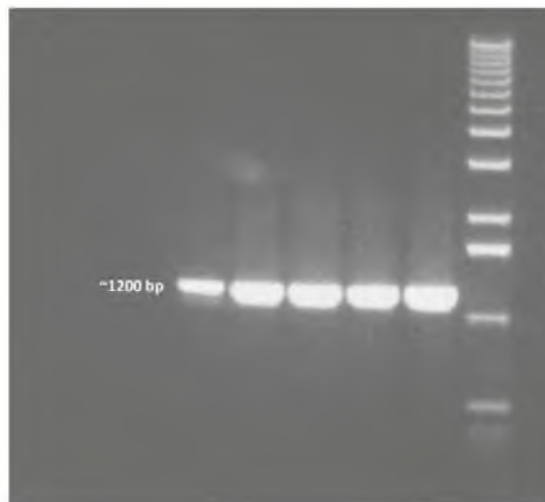


Figura: 18.- Resultado de la amplificación por RT-PCR de la secuencia completa de VP6 de rotavirus humano A en gel de agarosa 0,8 % TAE 1 X. Calle 8: Marcador de peso molecular 1 Kb (*Invitrogen*). Calles 1 y 2: Blanco, control negativo respectivamente. Calles 4-7: Muestras positivas para RVHA (~1200 pb). Calle 3: Control positivo (clarificado de rotavirus humano A).

Este producto de PCR se extrajo del bloque de agarosa seccionado y el amplicon de VP6 HA purificado se clono en el vector pGEM-T Easy.

1.2. Digestión con *Eco RI* de las colonias transformadas con pGEM-T Easy + inserto VP6 HA

Una vez realizada la transformación de bacterias DH5 α con la ligación de VP6 HA en pGEM T Easy, se seleccionaron las colonias blancas ref. Se extrajo el ADN plasmídico y se digirió con la enzima de restricción *EcoRI* con el objeto de corroborar la inserción de la secuencia VP6HA, liberando el inserto clonado del sitio *EcoRI* del sitio múltiple de clonado del vector (MCS).

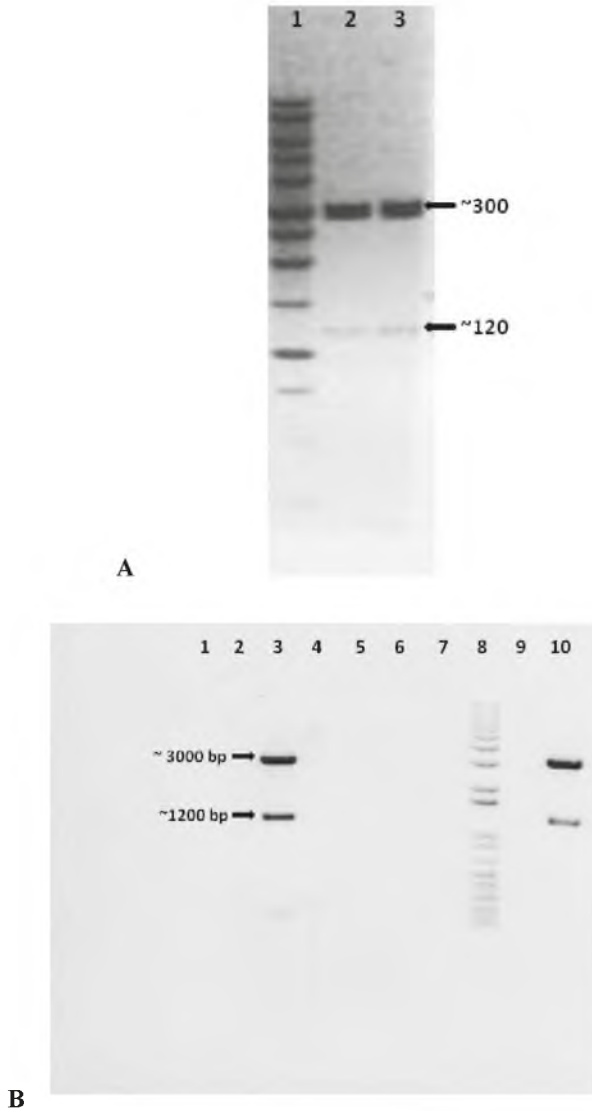


Figura: 19.- Digestión *Eco RI* de pGEM T Easy en gel de agarosa 0,8 % TAE 1 X.

(A) 1: Marcador de peso molecular 1 Kb. Calle 2 y 3: Digestiones *Eco RI* del vector pGEM T Easy clones 1 y 2. **(B)** Calle 8: Marcador de peso molecular 1 Kb (*Invitrogen*). Calles 3, y 10: Digestiones *Eco RI* vector pGEM T Easy clones 3 y 4.

En la figura. A se observan que los clones 1 y 2 producen las bandas del tamaño esperado, una banda de ~ 3000 pb correspondiente al vector pGEM T Easy linearizado y una banda ~ 1200 pb perteneciente al inserto VP6 HA. La figura B muestra las digestiones de los clones 3 y 4 que presentaron el mismo patrón de digestión. A continuación se procedió a secuenciar los clones positivos.

2. Secuencia nucleotídica de VP6 de Rotavirus Humano A recombinante obtenida

En la figura 20, se muestra la secuencia nucleotídica del gen de VP6 HA, que se obtuvo luego del análisis de las secuencias clonadas en el vector pGEM T Easy. En la figura se muestra la alineación con los primers genéricos HVP6 A Fwd y HVP6 A1 Rev.

INICIO

5'ATTGGGAKGTYCTGTAYTCMTTG3'

ATGGATGTTCTGTATTTCATTGTCAAAAACTCTTAAAGATGCTAGGGATAAAATCGTTGGAGG-TACACTATATTCTAATGTTAGCGATCTAATTCAACAATTTAATCAAATGATAGTAACCATGAATG-GAAATGACTTTCAACTGGAGGAATTGGCAATTTACCTATTAGAAAATTGGACATTTGACTTTG-GTCTACTAGGTACTACGCTTTTAAATCTTGATGCTAATTATGTTGAGACTGCAAGAACTAC-GATTGAGTATTTTATTGATTTTCATTGATAATGTATGTATGGATGAAATGGCAAGAGAGTCT-CAAAGAAATGGAGTAGCTCCACAATCTGAGGCGTTGAGGAAGCTAGCTGGTATTAAATTTA-AAAGAATAAACTTTAATAATTCATCAGAACATATAGAAAATTGGAATTTACAAAATAGAAAG-ACAACGTACTGGATTGTGTTTTTCATAAACCTAATATATTTCCATACTCAGCATCATTTACTTTA-AATAGATCTCAACCAATGCATGACAATTTAATGGGAACCATGTGGCTTAATGCTGGATCAGAAAT-TCAAGTAGCTGGATTGCGACTACTCGTGTGCTCTAAATGCTCCAGCAAATATTCAGCAGTTT-GAACATATTGTCCAGCTAAGGCGTGCCTAACTACAGCCACTATAACTTTGTTACCTGATG-CAGAAAGATTAGTTTTTCCAAGAGTTGTTAATTCAGCAGATGGTGCAACTACATGGTTCTTTA-ATCCAATTATCCTAAGACCAAATAATGTAGAGGTAGAATTTTTTACTGAATGGACAAATTATTAATA-CATACCAAGCTAGATTTGGCACTATTATCGCAAGAAATTTTGATACAATTCGTCTATCATTTCCAAT-TAATGCGTCCACCAACATGACGCCAGCCGTAAATGCATTATTTCCGCAAGCGCAACCTTTTCAA-CATCATGCAACAGTTGGACTTACGTTACGTATTGAGTCTGCAGTTTGGAATCAGTGCTTGCGGAT-TCAAATGAAACCTTTAATGGCGAATGTACCGCAGTACGTCAAGAGTATGCTATACCAGTTGGAC-CAGTATTCCCACCAGGCATGAATTGGACTGAGCTAACTACTAATTCACCATCCAGGGAAGA-TAATTTGCAACGTATCTTTACGGTAGCCTCTATCAGAAGCATGTTGATTAAAGTA

3'TCGTACAAYTAATCACT5'

STOP

Figura: 20.- Secuencia entera que codifica para VP6 HA obtenida de rotavirus humano grupo A. Sombreado con celeste se marca en el extremo 5' la secuencia necesaria para darle el contexto óptimo para el sistema de expresión baculovirus-células de insecto. En rojo se señala el codón de terminación (en este caso TGA). En verde el codón de iniciación. En amarillo se marcan los nucleótidos involucrados en el diseño de los primers. E value 0.0, identidad 99 % Gene bank accession n KJ559130.1 VP6 major inner capsid protein segment 6 [Human rotavirus A] P[8] G4, max score 2161.

La longitud del marco de lectura abierto (ORF) de la secuencia nucleotídica del gen de VP6 HA es de 1194 pb.

2.1. Secuencia peptídica de VP6 HA recombinante, dominios conservados y estructuras relacionadas

La secuencia nucleotídica de VP6 HA recombinante fue traducida a su secuencia aminoacídica correspondiente y a partir de ésta se calculó el peso molecular teórico de la proteína (Figura 21) que coincidió con lo reportado en la bibliografía (Kerin, Kane, Glass, & Gentsch, 2007).

```
MDVLYSLSKTLKDARDKIVGGTLYSNVSDLIQQFNQMIVTMNGNDFQTG-
GIGNLPIRNWTFDFGLLGTLLNLDANYVE TARTTIEYFIDFIDNVCMDEMA-
RESQRNGVAPQSEALRKLAKIKFKRINFNNSSEHIENWNLQNRRTGFVVFH-
KPNIFPYSASF TLNRSQPMHDNLMGTMWLNAGSEIQVAGFDYSCALNAPA-
NIQQFEHIVQLRRALTATITLLPDAERFSFPRVVNSADGATTWFFNPILRPNN-
VEVEFLLNGQINTYQARFGTHIARNFDTIRLSFQLMRPPNMTPAVNALFPQAQP-
FQHATVGLTLRIESAVCESVLADSNETLLANVTAVRQEYAI PVGPVFPPGMNW-
TELTNYS SREDNLQRIFTVASIRSMLIK*
```

Figura: 21.- Secuencia peptídica de la proteína estructural VP6 HA. Traducción del marco de lectura abierto (ORF) de la secuencia nucleotídica del gen de VP6 HA generado por el programa bioinformático Translator del sitio web Justbio <http://www.justbio.com/>, en el que se calcularon parámetros generales; Peso molecular teórico: 44,83 kD, Cantidad de aminoácidos: 397.

Con el objeto de analizar y corroborar que la secuencia peptídica recombinante de VP6 HA presentaba similitudes estructurales con familias de proteínas de VP6 conocidas relacionadas, la secuencia de VP6 HA obtenida se comparó en la base de datos BLAST Non redundant protein sequences (nr) aplicando el algoritmo blastp (Protein-Protein BLAST) (Marchler-Bauer et al., 2009; Marchler-Bauer et al., 2011).

El análisis bioinformático confirmó identidad con los dominios conservados de la superfamilia de proteína de cápside VP6 de Rotavirus en la totalidad de la secuencia aminoacídica. (Figura 22).

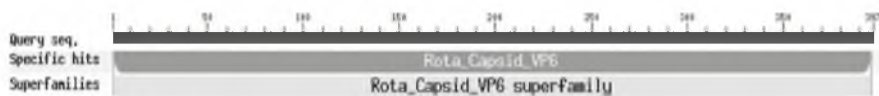


Figura: 22.- Dominios conservados de VP6 HA. Gráfico que muestra identidad de los dominios conservados de la proteína de cápside VP6 de rotavirus, y de la superfamilias VP6 con toda la extensión de la secuencia de la búsqueda (Query seq VP6 HA 397 aa). E value 0.0, identidad 98 % Gene bank accession n ABO20872 VP6 major inner capsid protein [Human rotavirus A] P[8] G4, max score 811.

En la actualidad se conoce la estructura tridimensional de muchas familias de proteínas. De esta manera es bastante probable que se encuentre una estructura 3 D homóloga conocida indexada cuando se hace una búsqueda con la secuencia a analizar incógnita, en bases de datos que contienen la información tridimensional de estructuras acreditadas.

El servicio “Related Structure” (estructuras relacionadas) en la base de datos Entrez's 3D-structure database, the Molecular Modeling Database (MMDB) en el sitio <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cblast/cblast.cgi> compila esta información y presenta el análisis del alineamiento de la búsqueda con una estructura homóloga y permite visualizarla en 3 D. Esta información resulta útil para determinar y confirmar supuestas conformaciones espaciales y funciones biológicas de la proteína que se está analizando.

Investigaciones anteriores ya habían demostrado que la proteína estructural de cápside VP6 SA11 de simio tiene una identidad del 97 % con la cepa RF (PDB code: 1QHD) a su vez la estructura conformacional de esta última, está bien estudiada (Peralta, et al., 2009). En la figura 23 se presenta el alineamiento de VP6 HA con la estructura cristalina de la proteína de cápside VP6 de rotavirus grupo A PDB: 1QHD_A (Mathieu, et al., 2001) que muestra un porcentaje de identidad del 91 %.

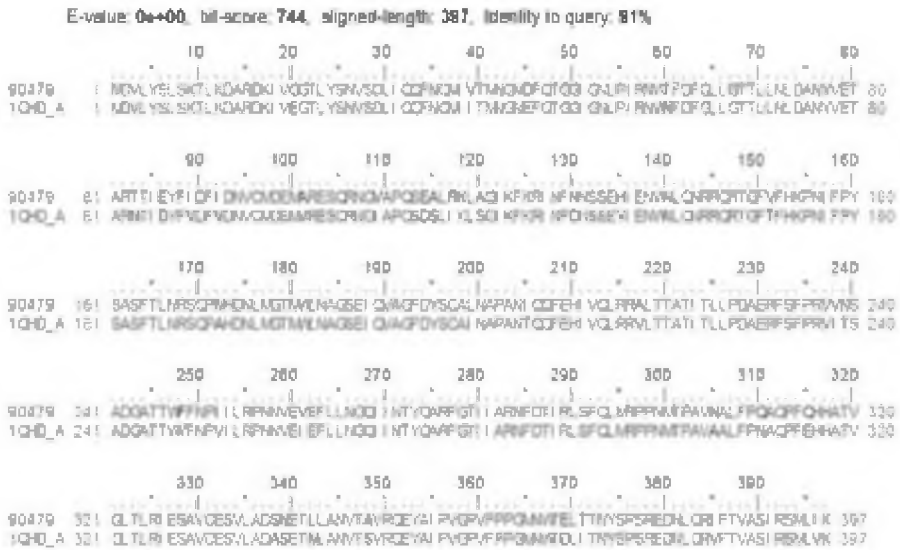


Figura: 23.-Alineamiento de la secuencia aminoacídica de VP6 HA recombinante con la secuencia VP6 de rotavirus del grupo A PDB: 1QHD_A indexada en MMDB. En azul se marcan los aminoácidos que varían entre las secuencias alineadas.

Para visualizar la estructura tridimensional de ambos alineamientos relacionados, a través de la superposición geométrica de ambas estructuras, se utilizó el programa bio informático Cn3D macromolecular structure viewer de la National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Wang, Geer, Chappey, Kans, & Bryant, 2000) (Figura 24). Se observa que VP6 HA presenta una conformación estructural espacial altamente homóloga a la estructura cristalina de la proteína de la cápside VP6 de rotavirus grupo A indexada.

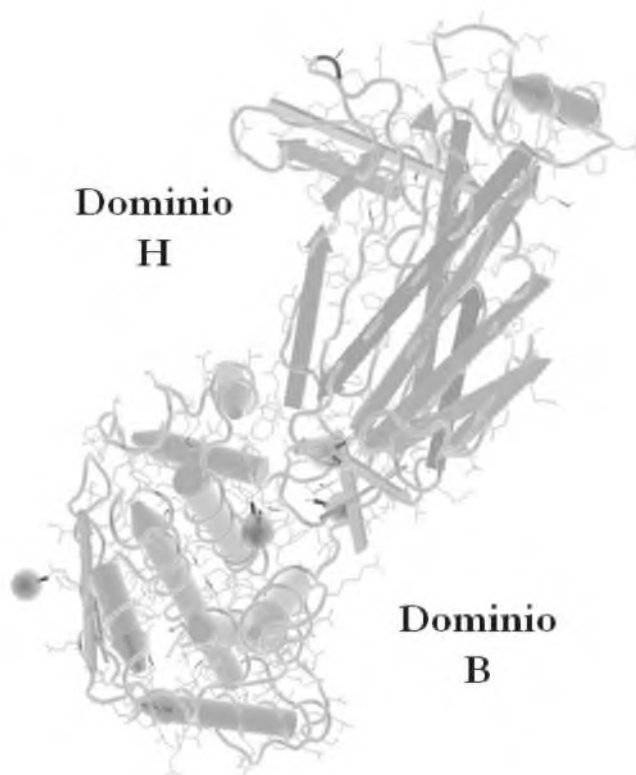


Figura: 24.- Estructura tridimensional de la subunidad VP6 HA recombinante superpuesta con VP6 1QHD_A. El diagrama muestra el dominio H con elementos de estructura secundaria laminas β y el dominio B conformado por α hélices. En celeste se muestran las identidades, en naranja los aa de VP6 HA que defieren respecto de la secuencia de la estructura cristalina de la proteína de cápside VP6 de rotavirus grupo A PDB: 1QHD_A. (imagen generada por el programa bioinformático Cn3D).

3. Construcción de baculovirus recombinantes AcVP6_{RVHA}

3.1. Subclonado de VP6 HA en pFastBac1 y análisis de restricción para verificar inserción y orientación.

A partir de los clones pGEM-T-VP6 HA secuenciados, se subclonó la secuencia codificante para VP6 HA en el vector pFastBac1 utilizando para esto la enzima de restricción *EcoRI*. Con el objetivo de comprobar que el subclonado en pFastBac1 fue correcto se extrajo el ADN plasmídico de las colonias DH5 α transformadas con el producto de ligación VP6 HA pFastBac1, y se sometieron a una digestión con *EcoRI* los clones que verificaron la inserción se seleccionaron para analizar su orientación correcta con la combinación de enzimas de restricción *NheI/HindIII*. (Figura 25).

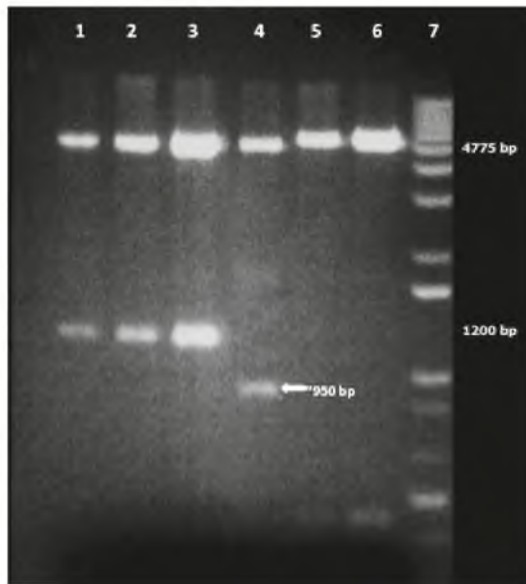


Figura: 25.- Análisis de restricción de pFastBac1 con *EcoRI*, y *NheI/HindIII* en gel de agarosa 0,8 % TAE 1 X. Calle 7: Marcador de peso molecular 1 Kb (*Invitrogen*). Calles 1 a 3: Digestiones *EcoRI*, vector pFastBac1. Calles 4 a 6: Digestiones *NheI/Hind*

En las tres primeras calles del gel de la digestión *EcoRI* se visualiza la liberación del inserto clonado en el sitio *EcoRI* del MCS de pFastBac1. En los tres clones se ve la banda correspondiente al inserto VP6 HA ~ 1200 pb y la correspondiente a el vector pFastBac1 linearizado ~ 4775 pb. En las tres calles siguientes se observan las digestiones combinadas *NheI/HindIII* el clon 1 (calle 4) verifica la orientación correcta mostrando una banda de ~ 950 pb correspondiente al corte en el sitio *NheI* interno de VP6 HA y al sitio *HindIII* en el vector. El otro fragmento de ~ 5025 pb corresponde al vector linearizado. Los clones 2 y 3 (calles 5 y 6) muestran la orientación inversa incorrecta.

3.2. Análisis de los bácmidos recombinantes por PCR

Con el clon pFastBac-VP6 HA correcto, se transformaron bacterias DH-10Bac. Se hizo una primera selección de clones al seleccionar las colonias de fenotipo blanco (ver fundamentos en la sección Materiales y Métodos). A partir de estas colonias se extrajeron los bácmidos y se analizaron por PCR con los primers M13 Fwd (-40) y M13 Rev. El resultado de la reacción de PCR se observa en el gel de agarosa 0.8 %. La transposición del inserto VP6 HA al bácmido tuvo lugar en los clones 1, 2, 4, 6, 7, 8, donde se visualiza una banda correspondiente a un fragmento de un tamaño de ~ 3,5 kb (~ 2300 pb bácmido + ~ 1200 pb VP6 HA) ("Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System. Technical manual," April 2004).

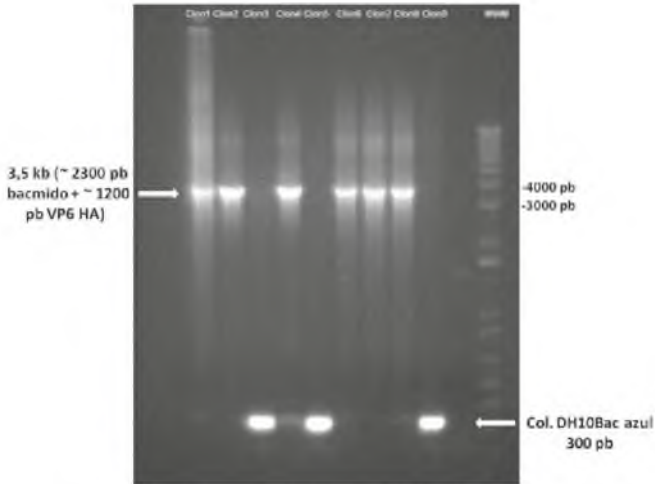


Figura: 26.- Análisis por PCR de los bácmidos recombinantes en gel de agarosa 0,8 % TAE 1 X. Calle 11: Marcador de peso molecular 1 Kb plus (*Invitrogen*). Calle 9: Control negativo (Colonia DH10Bac azul, 300 pb) .Calle 1 a 8: bácmidos analizados.

En los clones 3, y 5, se observa un fragmento de 300 pb perteneciente al bacmido solo, donde no se produjo el evento de transposición que coincide con el tamaño del clon 9 que corresponde a una colonia azul utilizada como control.

3.3. Transfección del bacmido a células de insecto y producción de baculovirus recombinantes.

Se aislaron los bácmidos recombinantes seleccionados conteniendo la secuencia codificante de VP6 HA, y se transfectaron células de insecto *Sf9* usando el método de lípidos catiónicos con reactivo Cellfectina®, como se describe en la sección Materiales y Métodos. Con el fin de amplificar la progenie viral recombinante se hicieron dos pasajes ciegos a partir del sobrenadante de transfección clarificado. Brevemente, se infectaron 2×10^6 células *Sf9* creciendo en monocapa en frascos T25.

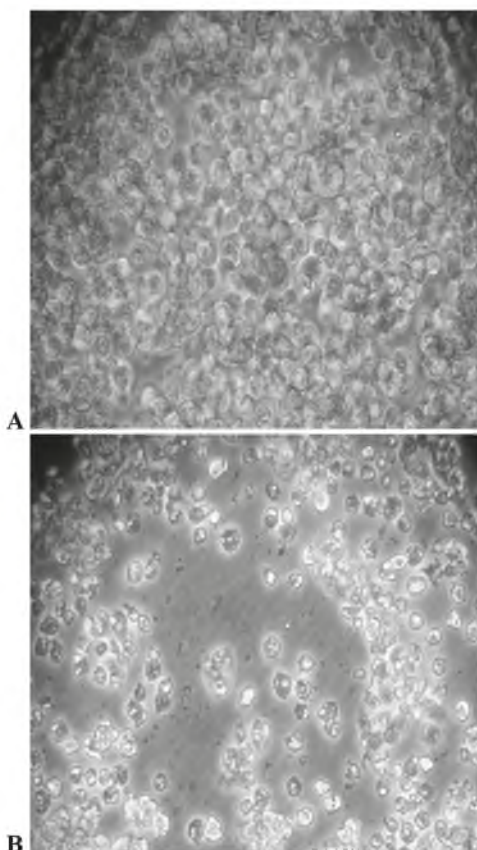


Figura: 27.- Características normales y citopáticas de células *Sf9* en cultivo. (A) Monocapa de células de insecto *Sf9* (*Spodoptera frugiperda*) no infectadas crecidas in vitro 5 días después de la siembra. Se observa la distribución homogénea sobre el frasco de cultivo. **(B) Células *Sf9* 5 días post infección con baculovirus recombinantes AcVP6_{RVHA}.** Se visualiza el característico efecto citopático causado por los baculovirus donde se observan células con formas irregulares, desprendimiento y reducido n° de células debido a la replicación viral y lisis celular ("Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System. Technical manual," April 2004 ; O'Reilly, et al., 1994).

A cada frasco se le agrego 100 μ l de inóculo con baculovirus recombinantes y se dejó adsorber durante 1 hora a temperatura ambiente, luego se agregaron 4 ml de medio de cultivo de crecimiento TNM-FH (Sigma) suplementado con 10 % SFB (suero fetal bovino) sin retirar el inóculo. Se incubaron los frascos durante 5 días a 27° C o hasta la observación de efecto citopático (Figura 27 B). Un frasco se separó como control con células sin infectar (Figura 27 A).

4. Caracterización de la proteína VP6 HA recombinante producida

4.1. Análisis de la expresión intracelular de la proteína recombinante VP6 HA en geles SDS-PAGE con tinción de azul de coomasie

La expresión de VP6 HA intracelular fue analizada por electroforesis en geles PAGE-SDS desnaturalizantes (Sambrook, et al., 1989). Finalizada la corrida electroforética el gel se tiñó con azul de coomassie.

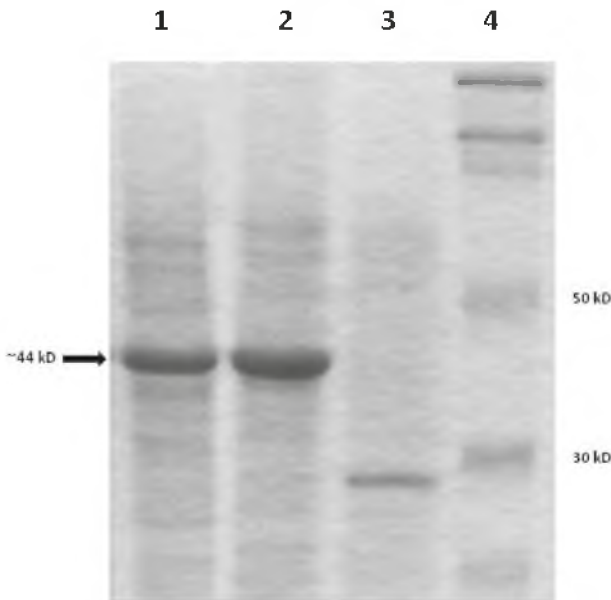
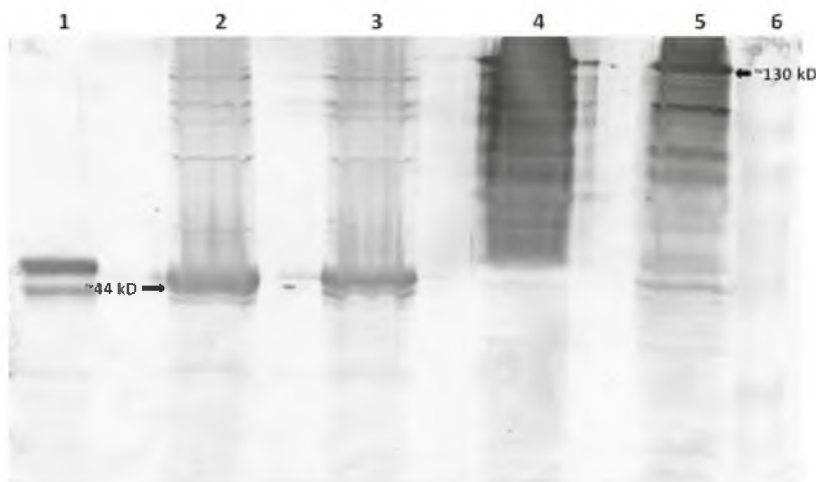


Figura: 28.- Gel 10 % SDS-PAGE de la expresión de VP6 HA en células de insecto *Sf9* teñido con azul de coomassie. Calle 4: Marcador de peso molecular BenchMark™ Protein Ladder (*Invitrogen*). Calle 1: Control extractos totales de células *Sf9* infectadas con baculovirus AcVP6_{GA11} incubadas a 100 °C. Calle 2: Extractos totales de células *Sf9* infectadas con baculovirus AcVP6_{RVHA} incubadas a 100 °C. Calle 3: Extractos de células *Sf9* infectadas con baculovirus wild type incubadas a 100 °C.

Se observa en la calle 2 una banda de ~ 44 Kd que presenta la misma movilidad que la proteína estructural VP6 de rotavirus SA11 (Figura 28).

4.2. Inmunodetección de la expresión intracelular de VP6 HA mediante Western Blot

Para confirmar la identidad de la proteína VP6 HA expresada, se analizaron extractos de células *Sf9* infectadas con el baculovirus recombinante AcVP6_{RVHA} con un anticuerpo primario anti rotavirus humano policlonal producido en conejo por el servicio de vacuna anti rábica del instituto de producción de biológicos (INPB) ANLIS Malbrán, y un anticuerpo secundario anti IgG de conejo conjugado a la fosfatasa alcalina. Para evaluar la capacidad de VP6 HA para formar trímeros dos muestras de extractos de células *Sf9* infectadas se incubaron a 37° C y se sembraron en condiciones nativas, mientras que otras dos muestras se incubaron previamente a 100° C para detectar las subunidades monoméricas, las muestras se sometieron a electroforesis SDS-PAGE 10 % y Western blot (Figura 29 A).



A

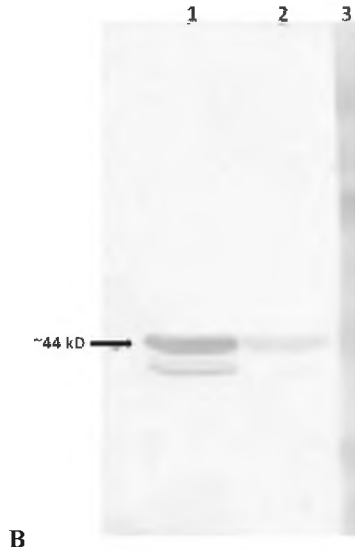
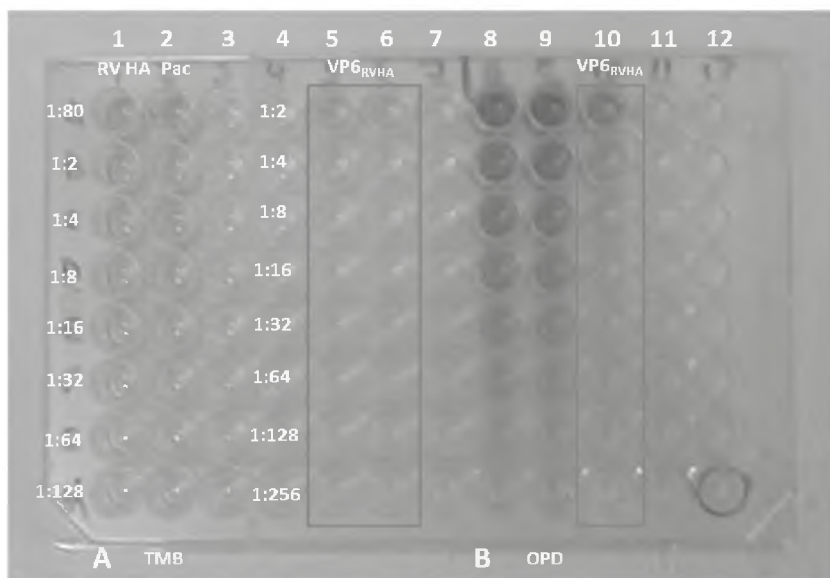


Figura: 29.- Western blot de la expresión de VP6 HA en células de insecto *Sf9*.

(A) Extractos totales de células *Sf9* infectadas con baculovirus AcVP6_{RVHA} analizadas por electroforesis y western blot con un suero policlonal rotavirus humano A. Calle 1: Control positivo VP6 SA11 de Simio. Calles 2 y 3: Extractos totales de células *Sf9* incubadas a 100 °C. Calles 4 y 5: Extractos totales de células *Sf9* analizadas por western blot en condiciones nativas (37 °C). Calle 6: Marcador de peso molecular Page ruler™ Pre-Stained Protein Ladder (*Fermentas*). (B) Calles 1, 2: Extractos totales de células *Sf9* infectadas con baculovirus AcVP6_{RVHA} diluido en agua y buffer cracking analizadas por western blot. Calle 3: Marcador de peso molecular Page ruler™ Pre-Stained Protein Ladder (*Fermentas*)

Se puede constatar que el suero policlonal anti rotavirus humano A reconoce la proteína estructural VP6 HA recombinante expresada, y que esta conserva una capacidad antigénica similar a la proteína VP6 SA11. En las calles 2 y 3 del gel A se visualizan los extractos las células *Sf9* incubadas a 100° C, se observan monómeros de VP6 HA de ~ 44 kD. Respecto de las muestras 4 y 5 incubadas a 37° C y analizadas en condiciones nativas, los resultados verifican que VP6 HA mantiene la capacidad de formar trimeros, se pueden observar bandas de ~ 130 Kd.

4.3. Evaluación de VP6 HA recombinante como control positivo en el ensayo de ELISA para la detección de Rotavirus Humano A.



Se evaluó la utilización de VP6 HA recombinante como control positivo en el ensayo de ELISA, para la detección de antígeno de rotavirus en heces, desarrollado por el Servicio de Vacuna Antirrábica del INPB ANLIS Malbrán (ver protocolo Anexo 13). Para cumplir con dicho objetivo se probó una dilución de extracto de células de insecto *Sf9* infectadas con el baculovirus recombinante AcVP6_{RVHA} que expresan VP6 HA. Se obtuvo como resultado una lectura de DO $\approx$ 2.8 en una dilución 1:2 con dos sustratos diferentes TMB (450 nm) y OPD (492 nm), pudiéndose usar el extracto diluido como control positivo, substituyendo así el uso de virus inactivado.

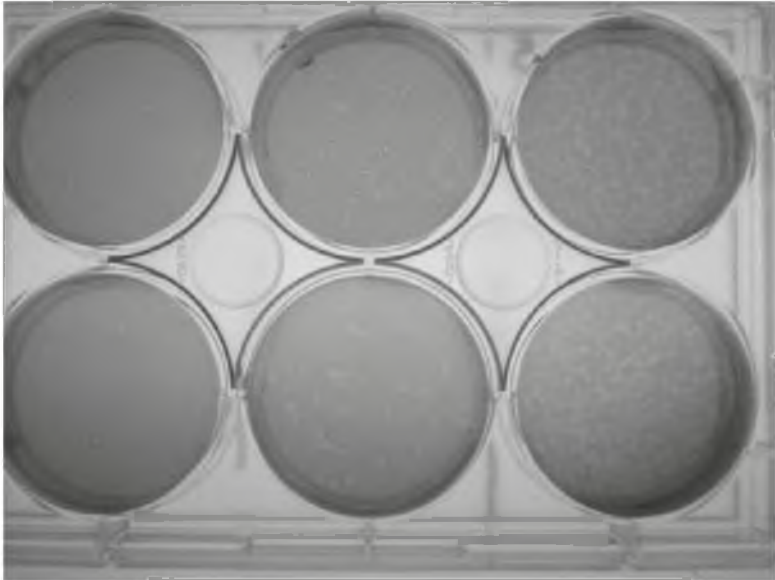
Figura 30.- Análisis de VP6 HA recombinante como control positivo en el Enzima Inmuno Ensayo ELISA (Malbrán UNQ) para la detección de Rotavirus Humano A comparando diferentes sustratos TMB, y OPD. (A) Pocillos 1 a 7: Revelado con sustrato TMB, Pocillos 1 y 2: Muestras con antígeno viral de pacientes infectados a partir de la dilución 1:80 siguiendo con diluciones al medio, Pocillos 3 y 4: Control negativo con buffer diluyente, Pocillos 5 y 6 control positivo, extracto total de células *Sf9* infectadas con baculovirus AcVP6_{RVHA} dil 1:2, Pocillo 7: Blanco. (B) Pocillos 8 a 12: Revelado con sustrato OPD, Pocillos 8 y 9: Muestras con antígeno viral 1:80 siguiendo con diluciones al medio, Pocillos 10: Control positivo extracto total de células *Sf9* infectadas con baculovirus AcVP6_{RVHA} dil 1:2, Pocillos 11: Blanco, 12: Control neg.

5. Titulación de los stocks de baculovirus recombinantes para la formación de VLPs

Se obtuvieron títulos virales de distintas cosechas o lotes que conformaron los stocks virales de baculovirus recombinantes AcVP6_{RVHA} y AcVP2_{SA11} usando la siguiente fórmula:

Título Viral:
$$\text{UFP/ml} = \frac{\text{n}^\circ. \text{ de placas contadas} \times 1/\text{dilución}}{\text{ml. de inóculo viral/pocillo}}$$

- Stock AcVP6_{RVHA} $1,5 \times 10^8$ pfu/ml.
- Stock AcVP2_{SA11} $4,4 \times 10^7$ pfu/ml.



Dilución viral	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
-----------------------	-----------------------------	-----------------------------	-----------------------------

Figura: 31.- Titulación del stock de baculovirus recombinantes. Células de insecto *Sy9* cultivadas en monocapa en placa de 6 pocillos teñidas con sc de overlay con el agregado del colorante vital rojo neutro (Sigma). Se observan placas de lisis contables en la dilución mayor, 10^{-6}

6. Formación, purificación y análisis de VLPs 2/6 de Rotavirus de simio SA11 y Rotavirus A humano

Con el fin de evaluar la capacidad de interactuar de VP6 HA con VP2 SA11 para formar VLPs se co infectaron células *Sf9* con baculovirus recombinantes AcVP6_{RVHA} y AcVP-2_{SA11} según se describió en materiales y métodos. Se recolectó el sobrenadante de cultivo de las células coinfectadas conteniendo una mezcla de baculovirus y VLPs, y se purificaron mediante una ultracentrifugación en colchón de sacarosa 35 % y posterior ultracentrifugación en gradiente de CsCl. Como se observa en la (Figura 32) se distingue una banda definida en el tubo del gradiente de CsCl correspondiente a las VLPs 2/6.

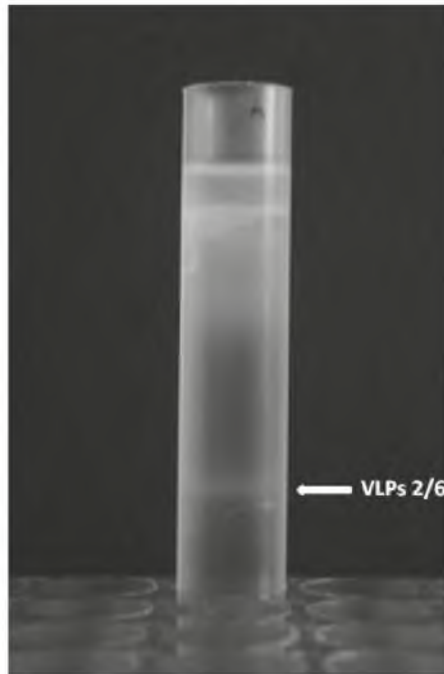
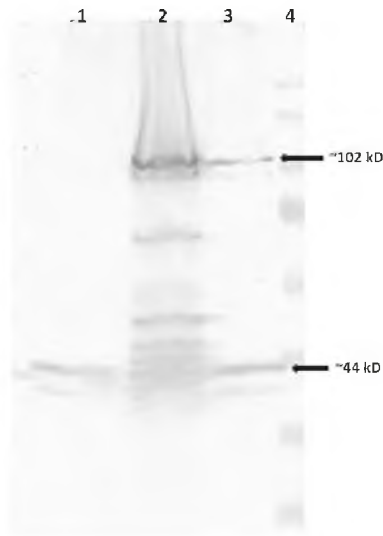


Figura: 32.- Purificación de las VLPs 2/6 en gradiente de CsCl. Se coinfectaron células *Sf9* con ambos baculovirus, AcVP2_{SA11} y el baculovirus recombinante AcVP6_{RVHA} luego de 18 hs de centrifugación a 39.000 rpm se fotografió el tubo del gradiente. Se visualiza una banda de la mitad del tubo hacia abajo correspondiente a las VLPs 2/6

Para examinar la composición de las VLPs 2/6 recombinantes se colectaron dos fracciones de sedimentación del gradiente de CsCl correspondientes a las VLPs 2/6 y se concentraron con una subsiguiente ultracentrifugación a 24.000 rpm durante 90 minutos se resuspendieron los pellets de cada fracción y se analizaron por electroforesis SDS-PAGE y Western blot para confirmar la presencia de cada una de la proteínas estructurales que se expresaron en las coinfecciones de células de insecto y formaron las VLPs 2/6.

Con el objetivo de comparar el resultado de las fracciones sedimentación se sembraron en un mismo gel de poliacrilamida 10 % un extracto total de células *Sf9* infectadas con baculovirus AcVP6_{RVHA} como control positivo, un extracto total de células *Sf9* coinfectadas con baculovirus AcVP6_{RVHA} y AcVP2_{SA11} y un volumen de la resuspensión de la centrifugación del colchón de sacarosa.



A

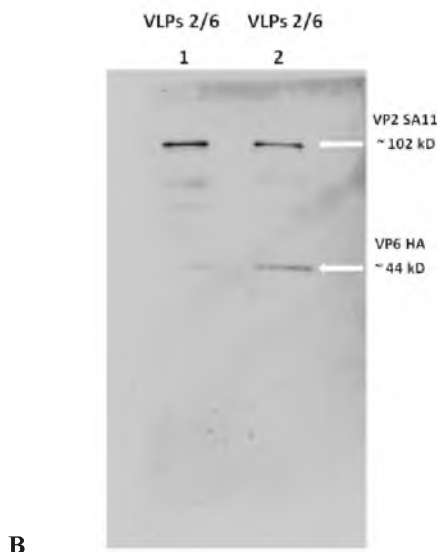


Figura: 33.- Análisis SDS-PAGE y Western blot de la formación y purificación de VLPs 2/6

(A) Western blot control (fosfatasa alcalina) Calle 1: Extracto total de células *Sf9* infectadas con baculovirus AcVP6_{EVHA}. Calle 2: Extracto total de células *Sf9* coinfectadas con baculovirus AcVP6_{EVHA} y AcVP2_{HA11}. Calle 3: Extracto centrifugación colchón de sacarosa. Calle 4: Marcador de peso molecular Page ruler™ Pre-Stained Protein Ladder (*Fermentas*). **(B)** Western blot peroxidasa (HRP) de las fracciones VLPs 2/6 del gradiente de CsCl, revelado por electro quimioluminiscencia (*ECL plus GE*). Calle 1, 2: Fracciones de sedimentación VLPs 2/6, 1 y 2. Las muestras fueron incubadas a 100 °C y analizadas por western blot con una mezcla de anticuerpos α VP6 SA11 y α VP2 SA11. La composición proteica de cada partícula se indica arriba de cada calle de sembrado, la ubicación de las proteínas estructurales individuales se indican a la derecha de cada panel.

Una vez realizada la electroforesis y electro transferencia a la membrana de nitrocelulosa la misma se incubó con una mezcla de anticuerpos primarios 1/2000 α VP6 SA11 y 1/2000 α VP2 SA11, después de los lavados la membrana se cortó en dos partes, una parte conteniendo los extractos de células y el extracto del colchón de sacarosa, se incubó con una mezcla de anticuerpos secundarios 1/20.000 α ratón y 1/3000 α conejo conjugados a la fosfatasa alcalina y se reveló con NBT y BCIP (Figura 33 A).

Se pueden ver las bandas correspondientes a VP6 HA (~44 kD) y VP2 SA11 (~102 kD). La otra parte de la membrana con las 2 fracciones del gradiente de CsCl se incubó con una mezcla de anticuerpos secundarios 1/2000 α ratón 1/3000 α conejo conjugados a la peroxidasa (HRP) y se reveló por electro quimioluminiscencia (*ECL plus GE*) (ver protocolo Anexo 12), para obtener mayor sensibilidad en la inmunodetección.

Se observa en la fracción de sedimentación 2 de las VLPs 2/6 las bandas correspondientes a VP2 SA11 (~102 kD) y la banda de VP6 HA (~44 kD) (Figura 29 B).

Las VLPs 2/6 obtenidas por ultra centrifugación en gradiente de CsCl se montaron en grillas de cobre 200 mesh, con la intención de poder observarlas por microscopía electrónica de transmisión, objetivo que no se pudo alcanzar por no contar con un equipo disponible.

DISCUSIÓN

La infección con rotavirus se ha convertido en una de las principales causas de gastroenteritis, severas y diarreas en niños y animales jóvenes. Cada año mueren más de 450.000 niños en el mundo (Tate, et al., 2012) y aún no existen tratamientos terapéuticos lo suficientemente eficientes para combatir los casos de diarrea aguda ocasionada por la infección, en menores de 5 años,(U. Desselberger, 1999; Guarino, et al., 2012; "Practice Parameter: The Management of Acute Gastroenteritis in Young Children," 1996)y en animales de importancia económica como bovinos, cerdos y aves (M. K. Estes, Greenberg, H.B., 2013; Kindler, et al., 2013; Otto, et al., 2012; Trojnar, et al., 2009).

A partir del año 2006 dos vacunas a virus atenuado, Rotarix (GlaxoSmithKline, Research Triangle Park, NC) y Rotateq (Merck and Co., Whitehouse Station, NJ) han sido incorporadas a los calendarios nacionales de inmunización y están disponibles en varios países. Ambas vacunas han demostrado ser eficaces en ayudar a disminuir las consultas médicas y las internaciones debidas a infecciones por RVs, además de mostrar una reducción significativa de la mortalidad asociada a la diarrea aguda (Cortese et al., 2013; Patel & Parashar, 2009; Rha et al., 2014; Tate et al., 2011).

No obstante las elevadas tasas de morbilidad y mortalidad (10 % de las internaciones en la primera infancia y 100 muertes promedio al año, ("Boletín Epidemiológico Anual 2010," 2011; Degiuseppe, et al., 2013; "Indicadores básicos 2011," 2012) por diarreas causadas por rotavirus en la población infantil continúan significando un alto costo para los sistemas de salud pública de nuestro país, en relación a la atención de la población afectada.

Respecto del diagnóstico, el desarrollo de un inmunoensayo enzimático (ELISA), para la detección de rotavirus grupo A en heces, sensible, rápido, sencillo, y económico constituye una alternativa válida a tener en cuenta frente a la utilización de ensayos de origen importado. De esta manera se favorece el acceso a esta prueba diagnóstica de menor costo a todos los componentes de los organismos de salud pública.

Como se mencionó anteriormente la proteína interna intermedia de cápside VP6 resulta ser, por sus características antigénicas una buena candidata para ser utilizada en el desarrollo de pruebas diagnósticas y vacunas (Azevedo, Vlasova, & Saif, 2013; Conner et al., 1996; Crawford et al., 1994; O'Neal, Crawford, Estes, & Conner, 1997; Peralta, et al., 2009).

En este trabajo se pudo cumplir con el objetivo principal propuesto para producir localmente la proteína estructural de cápside VP6 de rotavirus humano A, usando el sistema de expresión baculovirus-células de insecto.

Los primers diseñados específicamente permitieron amplificar por RT-PCR la secuencia completa que codifica para la proteína estructural de cápside VP6 a partir de rotavirus humanos del grupo A, aislados en Argentina.

Dicho producto se logro clonar en el vector pGEM T easy vector. Mediante secuenciación y análisis bioinformático se confirmó identidad con VP6 de rotavirus humano A.

Con el objetivo de expresar la proteína estructural de cápside VP6 HA se empleó el sistema de expresión baculovirus-células de insecto, subclonando la secuencia de VP6 HA en el vector de transferencia pFastBacTM1 del sistema Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System (*Invitrogen, Life Technologies*). Una vez transformadas las bacterias DH10Bac con el vector pFastBacTM1 y con el evento de transposición del cassette de expresión confirmado. La transfección del bacmido recombinante VP6 HA a células de insecto *Sf9* (*Spodoptera frugiperda*) en cultivo, proveyó una manera rápida y sencilla para la generación de baculovirus *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV) recombinantes AcVP6_{RVHA}. Los baculovirus generados permitieron su amplificación a través de sucesivos pasajes de infección, re infectando nuevas células *Sf9* de insecto logrando expresar VP6 HA en gran cantidad.

La inmunodetección por western blot de la expresión intracelular de VP6 HA en extractos de células *Sf9* infectadas con el baculovirus AcVP6_{RVHA}, analizados con un anticuerpo policlonal anti rotavirus humano A confirmaron que VP6 HA recombinante producida en el presente estudio conserva su capacidad antigénica. Asimismo se pudo comprobar mediante electroforesis y western blot en condiciones nativas que VP6 HA es capaz de formar trímeros.

El análisis por SDS-PAGE demuestra que posee un peso molecular de ~ 44 kD y que presenta la misma movilidad que la proteína estructural VP6 de rotavirus de simio SA11.

Habiendo obtenido estos resultados y teniendo la posibilidad de disponer de VP6 HA se procedió a evaluar su empleo como control positivo en el ensayo de ELISA, para la detección de antígeno de rotavirus en heces, desarrollado por el Servicio de Vacuna Antirrábica del INPB ANLIS Malbrán. En dicho ensayo se analizaron muestras de pacientes con infección por RV HA y se reemplazó al virus de cultivo inactivado químicamente, por una dilución de extracto de células de insecto *Sf9* infectadas con el baculovirus recombinante AcVP6_{RVHA} que expresan VP6 HA. La dilución es tal que produce una señal de OD idéntica a la obtenida con la dilución del virus (Jurado, 2008).

El análisis para evaluar la posibilidad de producir partículas similares a virus, VLPs 2/6 conformadas de VP2 de Rotavirus de simio SA11 y de VP6 de rotavirus humano A, producida en este estudio; indicó que es factible su producción a través de la co infección de células *Sf9* con los baculovirus recombinantes AcVP2_{SA11} y AcVP6_{RVHA}, demostrando que cuando ambas proteínas estructurales de cápside de rotavirus son co-expresadas en el sistema de expresión baculovirus-células de insecto Bac-to-Bac, VP2 SA11 de simio es capaz de interactuar con VP6 HA humana formando VLPs 2/6 de doble capa (DLPs) que se autoensamblan intracelularmente y que pueden ser purificadas a partir del sobrenadante de cultivos de células *Sf9*. Sin embargo, se requiere un paso posterior de scaling-up que excede los tiempos de este trabajo de maestría.

Este sistema probó ser muy eficiente para producir altos niveles de expresión de genes heterólogos, en este caso VP6 HA. La proteína recombinante se pudo obtener a partir de extractos de células infectadas y de sobrenadantes de cultivo en periodos post infección tardíos en comparación a otros sistemas donde la síntesis por las células huésped disminuye a causa de la infección por el vector viral.

Finalmente los baculovirus tienen un rango de huéspedes muy limitado y específico de especies invertebradas. Por lo tanto son más bioseguros para trabajar que muchos virus de mamíferos porque no resultan infecciosos para los vertebrados.

En consecuencia con el fin de optimizar y complementar la elaboración de los componentes del ensayo diagnóstico ELISA anteriormente mencionado y ya montado, será útil tener disponible la proteína VP6 HA recombinante producida, para evaluar su utilización como inmunógeno para la obtención de sueros policlonales anti rotavirus humano A.

Estos sueros previamente purificados se podrán emplear como captura de antígenos de rotavirus. El empleo de VP6 HA reemplazaría al cultivo de rotavirus, haciendo que este proceso tenga mayores condiciones de bioseguridad y factibilidad dado que de esta manera se evitaría el manipuleo de grandes volúmenes de cultivo de rotavirus como fuente de antígeno tradicional. El cultivo de baculovirus recombinantes AcVP6_{RVHA} es más sencillo, dado que las células de insecto *Sf9* crecen tanto en monocapas como en suspensión y no requiere tripsina al momento de la infección.

La premisa sería obtener sueros policlonales específicos contra VP6 HA que tengan una performance optimizada en la detección de RV HA respecto de sueros que se obtienen cuando se inocula virus concentrado y purificado.

CONCLUSIÓN

Se demuestra que la producción local de la proteína estructural intermedia interna de cápside VP6 de rotavirus humano A, a partir de aislamientos de Argentina, usando el sistema de expresión baculovirus-células de insecto es posible, obteniendo una proteína recombinante con funcionalidad y características antigénicas similares a la VP6 de rotavirus A nativa.

Es factible la utilización de la proteína recombinante VP6 HA expresada, como antígeno control positivo, en el ensayo ELISA para la detección de antígeno de rotavirus en heces desarrollado por el Servicio de Vacuna Antirrábica del INPB ANLIS Malbrán.

El presente trabajo es consecuencia de un proyecto cooperativo entre un organismo de salud pública y una Institución abocada al desarrollo e investigación en biotecnología de avanzada (Instituto de Biotecnología CNIA INTA).

Este tipo de vínculo ha potenciado el recurso humano y tecnológico disponible y ha permitido al ANLIS comenzar a establecer nuevas plataformas tecnológicas, en este caso destinadas a garantizar la provisión de reactivos de diagnóstico económicos y de calidad.

Por último establecer y fomentar estas alianzas estratégicas entre organismos del Estado Nacional con miras a la producción pública, propone un cambio de paradigma, al menos en lo que se refiere al rol, que el INPB ANLIS Malbrán debe desempeñar en la ejecución eficaz de políticas sanitarias.

ANEXOS

PROTOCOLOS ANEXOS

Protocolo Anexo 1: Extracción de dcARN de RV HA en materia fecal

Reactivos:

- PBS, pH 7.2
- Vertrel XF (1,1,1,2,3,4,4,5,5,5-decafluoropentano)
- Buffer Guanidinio 6M en 50mM Tris pH 7.5
- 50mM tris- HCl, pH 7.5
- Etanol 100%
- Silica en polvo (Silica Powder RNAID)
- Buffer de lavado (2/3 guanidinio 6 M+ 1/3 Tris 50 mM pH 7.5)

Requerimientos de la muestra

0.25-0.50 ml o 0.25-0.50 gramos de materia fecal de un paciente con diarrea causada por infección con rotavirus A. Las muestras deben ser congeladas a -20°C o -80 °C y enviarse en esta condición al laboratorio.

Procedimiento:

1. Preparar una solución 20% (p/v o v/v) de materia fecal en PBS pH 7.2 en un microtubo de 1.5 ml.
2. Tomar 300 μ l de la muestra y agregarle 300 μ l de Vertrel XF, mezclar con agitación manual 1 min, y centrifugar 10 min a temperatura ambiente a 8000 rpm.
3. Transferir 200 μ l del SN presente sobre la capa de Vertrel XF a un nuevo microtubo.
4. Agregar 400 μ l de tiocianato de guanidinio 6 M en 50mM Tris pH 7.5 a cada tubo, mezclar e incubar a 56° C por 10 min.
5. Agregar 7 μ l de la sílica en polvo RNAID (verificar que esté bien disuelta, en caso contrario agregarle unos μ l de agua estéril) a cada muestra, luego vortexear y agitar 6 min y centrifugar 60 seg a 1250 rpm.
6. Remover el SN de cada muestra y lavar una vez con 600 μ l de buffer de lavado y resuspender completamente el pellet.

7. Centrifugar un min a 1250 rpm.
8. Remover el sobrenadante.
9. Lavar tres veces con 600 μ l de etanol 100 % y centrifugar 1 min a 1250rpm.
10. Ultimo lavado centrifugar 2 min a 10000 rpm.
11. Remover todo el líquido residual de las muestras con cuidado de no levantar la sílica y secar a TA por 30 min aprox.
12. Extraer en 35 μ l de agua estéril incubando 10 min a 56°C, luego centrifugar 2 min 10.000 rpm.
13. Tomar el SN y colocarlo en un nuevo microtubo estéril.
14. Repetir los pasos 13 y 14 y combinar los SN
15. Almacenar los RNAs a -80°C o a -20°C hasta su uso.
16. Antes de usarlo, incubar a 56° C, 10 min y centrifugar 2 min a 10.000rpm

Protocolo Anexo 2: Genotipificación G RT- Nested PCR de VP7 de rotavirus humano A (RV HA)

Reactivos

- 5X AMV buffer
- DMSO
- Mezcla dNTPs 10mM
- AMV-RT (20u/μl)
- 5X Go *Taq* buffer
- Go *Taq* polimerasa
- Agarosa
- Buffer de siembra
- Bromuro de Etidio
- TAE/TBE 1 X
- RNAsin
- ddH₂O libre de nucleasas
- TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8, 0.1 mM EDTA)
- Marcador de peso molecular 100 bp ladder
- Oliogonucleotidos primers: Beg9, End9, aBT1, aCT2, aDT4.

Procedimientos:

1.- Transcripción reversa VP7

1. Rotular tubos de 0.2-ml para cada reacción de retro transcripción
2. Preparar la mezcla de reacción 1 RT (mastermix) en cabina de flujo laminar y mantenerla en hielo. Por reacción:

Mezcla de reacción 1 RT:

2.00 μl 5 X AMV buffer
1.00 μl 10 mM dNTPs mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
0.40 μl RNAsin
0.15 μl AMV RT (stock = 20 U/μl)
0.85 μl ddH₂O libre de nucleasas

Volumen total 4.4 μl

3. Diluir cada primer consenso VP7 Beg 9 (RA1) / End9 (RA4) a una concentración de trabajo de 5µM. Luego agregar 1 µl de cada primer a la mezcla 2.
4. Agregar 3 µl of dsRNA (ARN doble hebra) purificado de cada muestra a la mezcla dsRNA + primers específicos 2.
5. Agregar 0.6 µl de DMSO.
6. Por reacción:

Mezcla de dsRNA + primers específicos 2:

1.00 µl 5 µM VP7 Beg 9 (RA1)
1.00 µl 5 µM VP7 End9 (RA4)
3.00 µl ds RNA
0.60 µl DMSO

Volumen total 5.6 µl

7. Desnaturalizar las muestras durante 5 min a 94°C, y transferir los tubos a un baño de hielo y mantener durante 5 min.
8. Agregar 4.4 µl de la mezcla 1 RT mastermix a cada tubo de mezcla 2 (5.6 µl) y mezclar bien. Centrifugar (Spindown) por 15 sec, e incubar los tubos a 42°C durante 2 hs.

2.- Primer paso (First-round) de amplificación PCR con primers consenso VP7

1. Preparar la mezcla de reacción (mastermix) del primer paso de PCR anidada (*Nested* PCR) en cabina de flujo laminar y mantenerla en hielo.
2. Por reacción.

5.00 µl 5 x Go *Taq* buffer (*Promega*)
12.25 µl ddH₂O
1.00 µl 5 µM VP7 Beg 9 (RA1)
1.00 µl 5 µM VP7 End 9 (RA4)
2.00 µl BSA (10 mg/ml)
0.50 µl 10 mM dNTPs mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
0.25 µl Go *Taq* polymerase (*Promega*)
3.00 µl cDNA RVHA

Volumen total 25 µl

3. Centrifugar los tubos con los productos de retro transcripción (cDNA) durante 15 seg luego de la incubación a 42°C y colocar en hielo.
4. Agregar 3 µl de la RT a cada tubo con la mastermix preparada y mantener en hielo.
5. Colocar los tubos en el termociclador e incubar con el siguiente perfil de amplificación:

30 ciclos

94°C 1 min

42°C, 2 min

72°C, 1 min

1 paso 72°C, 5 min

Mantenimiento a 15°C

3.- Segundo paso de amplificación multiplex PCR genotipo específico VP7

1. Se usan los primers genotipo específico VP7 G1, G2, G4, y como primer reverse VP7 End 9 (Tabla 1).
2. Diluir cada primer específico VP7 G1, G2, G4, y el primer consenso End9 (RA4), a una concentración de trabajo de 5µM. Luego agregar 1 µl de cada primer
3. Preparar la mezcla de reacción (mastermix) del segundo paso de PCR anidada (*Nested* PCR) en cabina de flujo laminar y mantenerla en hielo.
4. Por reacción.

14.25 µl ddH₂O

5.00 µl 5 x Go *Taq* buffer (*Promega*)

1.00 µl 5 µM VP7 End 9 (RA4)

1.00 µl 5 µM VP7 aBT1 G1

1.00 µl 5 µM VP7 aCT2 G2

1.00 µl 5 µM VP7 aDT4 G4

0.50 µl 10 mM dNTPs mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

0.25 µl Go *Taq* polymerase (*Promega*)

1.00 µl de (first-round PCR)

Volumen total 25 µl

5. Agregar 1 µl de la reacción del primer paso de amplificación, mezclar bien y colocar en el termociclador incubando de acuerdo al siguiente perfil de amplificación:

30 ciclos

94°C 1 min

42°C, 2 min

72°C, 1 min

1 paso 72°C, 5 min

Mantenimiento a 15°C

6. Analizar en gel de agarosa 1% TAE / TBE transiluminado con luz U.V. y determinar el tamaño de los amplicones con un marcador de peso molecular de a 100 bp

Gel de agarosa 1 %:

1gr de agarosa en 100 ml de TAE/TBE 1X agregando 5 µl de una solución de bromuro de etidio 10 mg/ml. Sembrar un marcador de peso molecular 100 bp ladder y correr el gel a voltaje constante 80-100 V.

Genotipos VP7 tamaño de los amplicones:

VP7 Beg 9/End9 **1062 bp**

VP7 genotipo **G1 749 bp**

VP7 genotipo **G2 652 bp**

VP7 genotipo **G4 583 bp**

Oligonucleótidos VP7 consenso utilizados

Primer	Secuencia 5' - 3'	Posición
Forward Beg 9	GGC TTT AAA AGA GAG AAT TTC CGT CTG G	nt 1-28
Reverse End 9	GGT CAC ATC ATA CAA TTC TAA TCT AAG	nt 1062 -1036

Oligonucleótidos de genotipificación VP7 específicos (G1, G2, G4,).

Primer	Secuencia 5' - 3'	Posición	Genotipo
Forward aBT1	CAA GTA CTC AAA TCA ATG ATG G	nt 314-335	G1
Forward aCT2	CAA TGA TAT TAA CAC ATT TTC TGT G	nt 411-435	G2
Forward aDT4	CGT TTC TGG TGA GGA GTT G	nt 480-499	G4

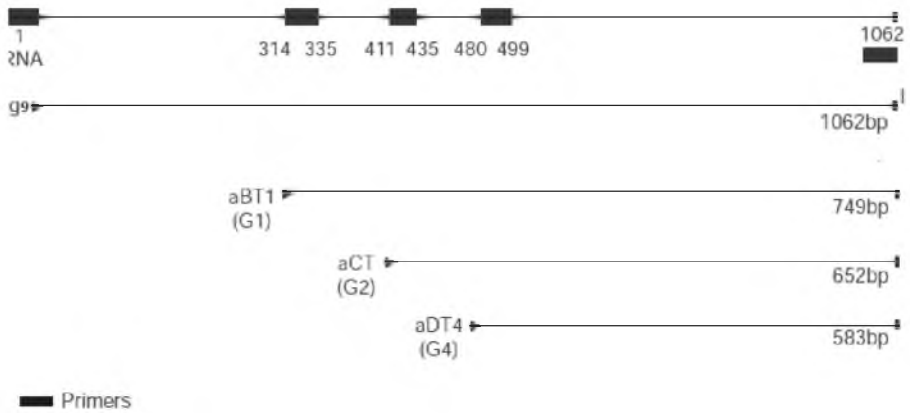


Figura 1.- Esquema de amplificación mediante PCR de VP7 y de la tipificación G según los primers propuestos por Gouvea/Iturriza – Gómara (Gomara, et al., 2000; Iturriza-Gomara, et al., 2004).

Protocolo Anexo 3: RT-PCR para aislar VP6 de RV HA

Reactivos

- RT M-MLV (200 U/ μ l)
- 5 X buffer RT
- Random Primers (Hexameros) 200 ng/ μ l
- DTT
- 5X Go *Taq* buffer
- Mezcla dNTPs 10mM
- 5 X buffer RT
- Go *Taq* polimerasa
- Agarosa
- Buffer de siembra
- Bromuro de etidio
- TAE/TBE 1 X
- RNAsin
- ddH₂O libre de nucleasas
- TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8, 0.1 mM EDTA)
- Marcador de peso molecular 100 bp ladder
- Oligonucleotidos primers: Fwd HVP6 A, Rev HVP6 A1, Rev HVP6 A2.

Procedimientos:

1.- Transcripción reversa con oligonucleótidos hexámeros aleatorios (RT Random Priming)

1. Transferir 15 μ l de los dcARN extraídos a un microtubo de PCR y preparar la siguiente mezcla. Desnaturalizar el dcARN a 98°C por 5 min. Luego enfriar en hielo durante 2 min.
2. Por reacción:

10.25 μ l H₂O libre de nucleasas

15.0 μ l de ARNs RVHA

3.75 μ l Random primers (Hexámeros) (Fermentas)

1.00 μ l RNasin (*Promega*)

Volumen Total 30.0 μ l

1. Desnaturalizar el dcARN a 98°C por 5 min. Luego enfriar en hielo durante 2 min.
2. Preparar la mezcla de reacción de la RT
3. Por reacción:

10.0 µl 5 X buffer RT (Invitrogen)
5.0 µl DTT
2.5 µl dNTPs mix (10 mM)
2.5 RT M-MLV (200 U/µl) Invitrogen

Volumen Total 20.0 µl

4. Agregar 20 µl de la mix de RT a cada tubo conteniendo el dcARN incubado
5. Incubar los tubos a 40°C por 2h. Luego incubar los tubos a 95 °C por 5 min enfriar los microtubos en hielo por 2 min.
6. El cADN puede ser usado directamente en la reacción de PCR o se puede almacenar a -20°C

2.- PCR convencional para amplificar VP6 HA

1. Preparar la mezcla de reacción (mastermix) de la PCR en cabina de flujo laminar y mantenerla en hielo.
2. Por reacción:

10.00 µl 5 x Go *Taq* buffer (*Promega*)
31.50 µl ddH₂O
1 µl 5 µM Fwd HVP6 A
1 µl 5 µM Rev HVP6 A1/A2
1 µl 10 mM dNTPs mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
0.50 µl Go *Taq* polymerase (*Promega*)

3. Agregar 45 µl de la mastermix de PCR a cada microtubo de 0.2 ml en frio. Agregar 5 µl del cADN (de la RT).
4. Colocar los microtubos cargados en el termo ciclador y seguir el siguiente perfil de amplificación:

Inicio 94° C 2 min

35 ciclos

94°C 1 min

46°C, 2 min

72°C, 1 min

1 paso 72°C, 7 min

Mantenimiento a 15°C

Oligonucleótidos diseñados para aislar VP6 HA

Primer	Secuencia 5' - 3'	Posición
Fwd HVP6 A	ATT ATG GAK GTY CTG TAY TCM TTG	nt 1-21 desde ATG
Rev HVP6 A1	TCA CTT AAT YAA CAT GCT	nt 1194-1176
Rev HVP6 A2	TTA TTT GAC AAG CAT GCT	nt 1194-1176

Protocolo Anexo 4: Purificación de productos de PCR de geles de agarosa (*Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega Corp*).

Reactivos

- Etanol 95-100 %
- Agarosa
- Bromuro de etidio
- 1 X TBE / TAE
- Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega Corp

Procedimiento:

1.- Disolución de fragmento de gel que incluye el producto de PCR.

1. Cargar y correr el gel. El ADN puede ser extraído de agarosa estándar o de agarosa de baja fusión, ya sea con TAE o con TBE.
2. Pesar un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml para cada fragmento de ADN que se aísle y anotar el peso.
3. Visualizar y fotografiar los productos amplificados de PCR teñidos con un colorante intercalante como el bromuro de etidio transiluminado con luz UV. Para reducir daños en el DNA, irradiar el gel lo mínimo posible (1-4). Cortar con un bisturí o una hoja de afeitar limpios un fragmento de gel conteniendo el amplicon de interés en un volumen mínimo de agarosa. Transferir el segmento de gel al tubo de microcentrifuga pesado y volver a pesar. Restar el peso del tubo vacío al peso total para obtener el peso del fragmento de gel (ver notas 1-3 a continuación).

Nota: *El segmento de gel se puede almacenar a 4° C o a -20° C por una semana en un tubo bien cerrado y en condiciones libres de nucleasas antes de la purificación.*

4. Agregar al tubo de microcentrifuga, la solución de unión a la membrana (binding solution) en una proporción de 10 µl de solución por 10 mg de fragmento de gel.
5. Agitar por vortex la mezcla (véase nota 4) e incubar a 50-65° C durante 10 minutos o hasta que el fragmento de gel se disuelva por completo. Mezclar mediante vortex el microtubo cada pocos minutos para favorecer la fusión del gel de agarosa. Centrifugar el tubo brevemente a temperatura ambiente para asegurar que el contenido esté en el interior del tubo. Una vez que el gel de agarosa se funde, el gel no se vuelve a solidificar a temperatura ambiente.

Notas:

1) La recuperación de 1% de agarosa de alto punto de fusión es comparable con el 1-2% de agarosa de bajo punto de fusión. Concentraciones de hasta un 3% de agarosa de alto punto de fusión fueron probadas. Fragmentos de geles de agarosa con concentraciones mayores (2-3%) podrían requerir más tiempo para derretirse por completo que fragmentos de geles de 1% de agarosa y podría mostrar una disminución de rendimiento.

2) La máxima capacidad de la columna (SV Minicolumn) es de 350 mg de masa de gel disuelto en 350 µl de la solución de unión a la membrana por paso de la columna. Para fragmentos de geles mayores a 350 mg, se continúa pasando adicionalmente muestra a través de la columna hasta que se haya terminado de procesar. La máxima cantidad de agarosa que pueden ser procesados a través de una sola columna es de aproximadamente 3,5 g (10 x 350 mg) en total.

3) La máxima capacidad de unión de la columna es aproximadamente de 40 µg por columna, y la menor cantidad que ha sido purificado con éxito es de 10 ng.

4) Fragmentos de ADN que son más grandes que 5 kb se deben mezclar con cuidado para evitar el corte. No agitar mediante vortex si el fragmento de ADN es más grande que 5 kb; mezclar por inversión.

2.- Purificación de ADN por centrifugación

1. Colocar una SV Minicolumna en el tubo colector para el gel disuelto
2. Transferir la mezcla de gel disuelto a la columna e incubar 1 min a temperatura ambiente.
3. Centrifugar la columna en una microcentrífuga a 16000 x g (14000 rpm) durante 1 min. Separar la columna del tubo colector y descartar el líquido que paso a través de la columna. Volver a colocar la columna en el tubo colector.

Nota: Si la centrifugación no se realiza a 16000 x g (14000 rpm) podría haber pérdidas de rendimiento.

4. Lavar la columna agregando 700 µl de solución de lavado de la membrana, previamente diluida con etanol al 95%, para la SV Minicolumna. Centrifugar la columna 1 min a 16000 x g (14000 rpm). Vaciar el tubo colector y volver a poner la columna. Repetir el lavado con 500 µl de solución de lavado de la membrana y centrifugar la columna durante 5 min a 16000 x g (14000 rpm).
5. Retirar la columna de la centrífuga con cuidado de no mojar la parte inferior con el líquido que atravesó la columna. Vaciar el tubo colector y volver a centrifugar la columna durante 1 min para eliminar el alcohol residual.
6. Cuidadosamente transferir la columna a un microtubo de 1,5 ml limpio libre de nucleasas. Agregar 50 µl de agua libre de nucleasas directamente en el centro de la columna sin tocar la membrana con el tip de la pipeta. Incubar a temperatura ambiente durante 1 min. Centrifugar 1 min a 16000 x g (14000 rpm).
7. Descartar la columna y guardar el tubo de microcentrífuga que contiene el ADN eluido a 4 °C o a -20 °C.

Nota: El volumen de ADN eluido será de aproximadamente 42-47 µl. Si el ADN debe estar más concentrado, realizar una precipitación con etanol. Por otra parte, el ADN puede ser eluido en tan solo 15 µl del agua libre de nucleasas sin una reducción significativa del rendimiento. Si se utiliza un volumen de elución de 15 µl, se debe comprobar que la membrana esté completamente cubierta con agua libre de nucleasas antes de la centrifugación. No se recomiendan volúmenes de elución menores a 15 µl.

Protocolo Anexo 5: Inserción de fragmentos de PCR en el vector pGEM®-T Easy

Reactivos

- Kit de clonado pGEM®-T Easy vector

Procedimiento:

1.- Reacción de ligación

1. Determinar la cantidad del inserto de ADN (ng/μl)
2. Calcular la relación inserto:vector en ng usando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{ng del vector} \times \text{tamaño en kb del inserto}}{\text{tamaño del vector en kb}} \times \text{relación molar inserto:vector} = \text{ng inserto}$$

3. Centrifugar el vector por 15 sec.
4. Vortexear el buffer de ligación 2 X y la T4 AND Ligasa antes de usarla
5. Preparar la reacción de ligación

1 μl de pGEM®-T Easy Vector (50ng/μl) (*Promega*)

5 μl de Buffer de ligación 2 X

3 μl de fragmento purificado (20-60ng/μl)

1 μl de Ligasa (3 U Weiss/μl)

Volumen total 10 μl

6. Incubar ON a 4 °C

Protocolo Anexo 6: Aislamiento del ADN Plasmídico (Wizard Plus SV minipreps DNA Purification System, Promega).

Reactivos:

- Bacterias competentes (DH5 α).
- Kit Wizard Plus SV minipreps DNA Purification System, Promega
- Medio LB
- Ampicilina
- Etanol 95-100 %
- TE 1 x 10 mM Tris HCL pH 8, 1 mM EDTA

Procedimiento: Minipreps

1.- Producción del lisado clarificado

1. Crecer las bacterias DH5 α que contienen el plásmido con el inserto de interés, ON a 37 °C con agitación (200 rpm)
2. Centrifugar 1-5 ml (alto número de copias del plásmido) del cultivo durante 5 min a 10.000 x g.
3. Agregar 250 μ l de la solución de re suspensión celular en el tubo y resuspender completamente mediante vortex o pipeteando.
4. Adicionar 250 μ l de Solucion de lisis y mezclar por inversión del tubo 3-4 veces, suavemente (no vortexaar), incubar hasta que la suspensión celular se clarifica.
5. Agregar 10 μ l de solución de proteasa alcalina y mezclar 4 veces por inversión del tubo. Incubar 5 minutos a RT (no pasar de 5 minutos el tiempo de incubación).
6. Agregar 350 μ l de Solución de neutralización e inmediatamente mezclar por inversión del tubo 4 veces (no vortexear)
7. Centrifugar el tubo 10 min a 4 °C, a 13 000 rpm en una microcentrífuga.

2.- Aislamiento del ADN plasmídico y protocolo de purificación por centrifugación.

1. Transferir el sobrenadante lisado clarificado (aprox 850 μ l) o a la columna de unión del ADN evitando transferir precipitados blancos con el sobrenadante y centrifugar por 1 min a 13000 rpm RT.
2. Descartar lo que pasó a través de la columna y volver a colocar la columna dentro del tubo de colección.
3. Agregar 750 μ l de la solución de lavado, previamente diluida con 95 % etanol y centrifugar a 13000 rpm durante 1 min.
4. Descartar lo que pasó a través de la columna y lavar nuvamente con 250 μ l de solución de lavado y centrifugar durante 20 min.

5. Secar la columna con una centrifugación adicional 1 min a 13000 rpm.
6. Transferir la columna a un nuevo microtubo esteril para microcentrífuga de 1,5 ml.
7. Adicionar 50-100 μ l de agua libre de nucleasas o buffer TE 1 x 10 mM Tris HCL pH 8, 1 mM EDTA a la columna y esperar 1 min para la elución.
8. Eluir el ADN plasmídico centrifugando 1 min a 13 000 rpm y descartar la columna
9. El ADN es estable en agua si se conserva a -20° C o menos

Protocolo Anexo 7: Confirmación de la inserción de VP6 HA en pGEM®-T Easy:

Reactivos:

- Kit *EcoRI* Promega
- ddH₂O libre de nucleasas
- Agarosa
- Bromuro de etidio
- 1 X TBE / TAE
- 1 Kb bp ladder
- Kit Wizard Plus SV minipreps DNA Purification System, Promega

1.- Análisis de restricción con *EcoRI*

Procedimiento:

Digestión del clon pGEM®-T Easy VP6 HA:

1. Preparar la mezcla de digestión en un microtubo de 0.5 ml estéril.
2. Por reacción:

2.0 µl Buffer de restricción 10 X
0.2 µl BSA Acetilada (10 µg/µl)
0.5 µl *EcoRI* (10U/µl) (*Promega*)
13.3 µl ddH₂O

4 µl ADN pGEM®-T Easy VP6 HA (0.2-1.5µg)

Volumen total 20 µl

3. Transferir 16 µl de la mezcla de restricción a cada tubo y mezclar pipeteando, luego centrifugar para coleccionar el contenido en el fondo del tubo.
4. Agregar 4 µl ADN plasmídico (0.2-1.5µg). Incubar a 37° C durante 1-2 hs y sembrar el producto de digestión en un gel de agarosa 1 %, y visualizar mediante transiluminación UV.

Protocolo Anexo 8: Secuenciación de VP6 HA en pGEM®-T Easy:

La secuenciación de los vectores pGEM T Easy fue realizada en el servicio de secuenciación de la Unidad de Genómica del Instituto de biotecnología INTA Castelar usando un secuenciador automático capilar ABI 3500 (*Applied Biosystems*). En todos los casos se utilizó la mezcla preparada de dideoxinucleótidos fluorescentes *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (*Applied Biosystems*).

1.- Análisis de secuencias usando NCBI BLAST

Procedimiento:

1. ingresar en la página web NCBI BLAST, Basic Local Alignment Search Tool, url: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>.
2. Seleccionar la opción Nucleotide-nucleotide BLAST (blastn).
3. Pegar la secuencia de interés a analizar en la casilla disponible a tal efecto: Enter query sequence (copiar y pegar; no incorporar números en la búsqueda)
4. Seleccionar la base de datos: Choose Search Set Database (ej: nucleotide collection (nr/nt))
5. Seleccionar en Program Selection: Highly similar sequences (megablast)
6. En una nueva ventana los resultados de la alineación aparecerán.

Protocolo Anexo 9: Ligación de VP6 HA en pFastBac1

Reactivos:

- Kit *EcoRI* Promega
- C.I.P (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase)
- Vector pUC control
- Vector pFastBac1
- T4 ligasa 3 U/μl
- Buffer Ligasa T4 10 X
- ddH2O libre de nucleasas
- Agarosa
- Bromuro de etidio
- 1 X TBE / TAE
- 1Kb bp ladder
- Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

Procedimiento:

1.- Digestión de los clones pGEM®-T Easy seleccionados para liberar VP6 HA:

1. Preparar la mezcla de digestión en un microtubo de 0.5 ml estéril.
2. Por reacción:

2.0 μl Buffer de restricción 10 X

0.2 ul BSA Acetilada (10 μg/μl)

0.5 ul *EcoRI* (10U/μl)

13.3 μl ddH2O

4 μl ADN pGEM®-T Easy VP6 HA (0.2-1.5μg)

Volumen total 20 μl

3. Transferir 16 μl de la mezcla de restricción a cada tubo y mezclar pipeteando, luego centrifugar para coleccionar el contenido en el fondo del tubo.
4. Agregar 4 μl ADN plasmídico (0.2-1.5μg). Incubar a 37° C durante 2-4 hs y sembrar el producto de digestión en un gel de agarosa 1 %, y visualizar mediante transiluminación UV.
5. Escindir del gel de agarosa el fragmento de interés (VP6 HA ~ 1200 bp) y purificar mediante el kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega).

2.- Digestión del vector pFastBac1 con *EcoRI*

Procedimiento:

Digestión de pFastBac1 (Linearización):

1. Preparar la mezcla de digestión por reacción como sigue:

14.3 μ l ddH₂O libre de nucleasas
2.0 μ l Buffer de restricción 10 X
0.2 μ l BSA Acetilada (10 μ g/ μ l)
0.5 μ l *EcoRI* (10U/ μ l) (*Promega*)

3 μ l ADN pFastBac1 (0.2-1.5 μ g)

Volumen total 20 μ l

2. Transferir 17 μ l de la mezcla de restricción a cada tubo y mezclar pipeteando, luego centrifugar para coleccionar el contenido en el fondo del tubo.
3. Agregar 3 μ l ADN plasmídico (0.2-1.5 μ g). Incubar a 37 ° C durante 2-4 hs.
4. Luego agregar 0.5 μ l 1U de C.I.P (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) e incubar 15 min a 37° C
5. Sembrar el producto de digestión en un gel de agarosa 1 %, y visualizar mediante transiluminación UV.
6. Escindir del gel de agarosa el fragmento de interés (pFastBac1~ 4775 bp) y purificar mediante el kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (*Promega*).

3.- Reacción de ligación de VP6 HA y pFastBac1

Procedimiento:

1. Centrifugar el vector por 15 sec.
2. Vortexear el buffer de ligación 10 X y la T4 ADN Ligasa antes de usarla
3. Preparar la reacción de ligación a un volumen final de 10 µl según la tabla x
4. Las mezclas de reacción se incuban a 4° C durante toda la noche (ON) se mantiene una relación molar de ligación (6:1) inserto:vector que resulto exitosa.

	- pUC Vector control - (~ 2.7 kb)	+ Vector pFastBac1 (~4.7 Kb)
Vector	4 µl (~50 ng)	4 µl (~50 ng)
Inserto VP6 HA (~1.2 kb)	---	2 µl (~75 ng)
Buffer Ligasa T4 10 X	1 µl	1 µl
ddH2O libre de nucleasas	4 µl	2 µl
T4 Ligasa	1 µl (3U)	1 µl (3U)

Protocolo Anexo 10: Verificación de la inserción y orientación correcta de VP6 HA en pFastBac1

Reactivos:

- Kit *EcoRI* (10U/μl) Promega
- Kit *HindIII* (10U/μl)
- Kit *NheI* (10U/μl)
- ddH₂O libre de nucleasas
- Agarosa
- Bromuro de etidio
- 1 X TBE / TAE
- 1 Kb bp ladder
- Kit Wizard Plus SV minipreps DNA Purification System, Promega

1.- Análisis de restricción con *EcoRI* (Inserción)

Procedimiento:

Digestión del clon pFastBac1 VP6 HA con *EcoRI*:

1. Preparar la mezcla de digestión por reacción como sigue:

2.0 μl Buffer de restricción 10 X
0.2 μl BSA Acetilada (10 μg/μl)
0.5 μl *EcoRI* (10U/μl) (*Invitrogen*)
12.3 μl ddH₂O

5 μl ADN pFastBac1 (0.2-1.5μg)

Volumen total 20 μl

2. Transferir 15 μl de la mezcla de restricción a cada tubo y mezclar pipeteando, luego centrifugar para colectar el contenido en el fondo del tubo.
3. Agregar 5 μl ADN plasmídico pFastBac1 (0.2-1.5μg). Incubar a 37° C durante 2-4 hs y sembrar el producto de digestión en un gel de agarosa 1 %, y visualizar mediante transiluminación UV para seleccionar los clones VP6 HA positivos.

2.- Análisis de restricción con *NheI/HindIII* (Orientación)

Procedimiento:

Digestión del clon pFastBac1 VP6 HA con *Nhe/HindIII*:

1. Preparar la mezcla de digestión por reacción como sigue:

11.8 µl ddH₂O libre de nucleasas
2.0 µl Buffer de restricción 10 X
0.2 µl BSA Acetilada (10 µg/µl)
0.5 µl *NheI* (10U/µl)
0.5 µl *HindIII* (10U/µl)

5 µl ADN pFastBac1 (0.2-1.5µg)

Volumen total 20 µl

1. Transferir 15 µl de la mezcla de restricción a cada tubo y mezclar pipeteando, luego centrifugar para coleccionar el contenido en el fondo del tubo.
2. Agregar 5 µl ADN plasmídico (0.2-1.5µg). Incubar a 37 ° C durante 2-4 hs y sembrar el producto de digestión en un gel de agarosa 1 %, y visualizar mediante transiluminación UV para seleccionar los clones con la orientación correcta.

Protocolo Anexo 11: Análisis de los bácmidos recombinantes mediante PCR

Reactivos:

- 10X *Taq* buffer
- Mezcla dNTPs 10mM
- Platinum® *Taq* polymerase (5U/μl) (*Invitrogen*)
- ddH₂O libre de nucleasas
- Agarosa
- Bromuro de etidio
- 1 X TBE / TAE
- 1 Kb bp ladder
- Oligonucleotidos M13 Fwd (-40), M13 Rev.

Procedimiento:

1. Preparar la mezcla de reacción (mastermix) de PCR en microtubos de 0.2 ml en cabina de flujo laminar y mantenerla en hielo.
2. Por reacción:

19.0 μl ddH₂O libre de nucleasas

2.50 μl 10 X PCR Buffer

0.50 μl 10 mM dNTP

0.75 μl 50 mM MgCl₂

0.50 μl M13 Fwd (-40) (100 ng/μl)

0.50 μl M13 Rev (100 ng/μl)

0.25 μl Platinum® *Taq* polymerase (5U/μl) (*Invitrogen*)

1 μl ADN Bácmido recombinante (100 ng)

25 μl de volumen final.

3. Transferir 24 μl de la mezcla de reacción a cada tubo y mezclar pipeteando.
4. Agregar 1 μl ADN bácmido recombinante (100 ng).
5. Colocar los tubos en el termociclador, e incubar con el siguiente perfil de ampli-ficación:

Desnaturalización inicial 94° C 3 min

35 ciclos

94° C 45 seg

55° C 45 seg

72°C, 5 min

1 paso 72° C, 7 min

Mantenimiento a 15° C

6. Analizar en gel de agarosa 0.8 % TAE / TBE transiluminado con luz U.V. y determinar el tamaño de los amplicones con un marcador de peso molecular de 1 Kb plus (*Invitrogen*).

Muestras amplificadas	Tamaño del producto de PCR (Amplicon bp)
Bácmido solo	~300 bp
Bácmido pFastBac1 con transposición OK	~3,5 kb (~ 2300 pb pFastBac1 + Inserto ~1200 pb VP6 HA)

Protocolo Anexo 12: Amplificación del stock viral

Procedimiento:

1. Para amplificar el stock viral, infectar células *Sf9* con una MOI (multiplicity of infection) de 0.05 a 0.1. La multiplicidad de infección MOI se define como el número de partículas virales por célula. Mediante la siguiente formula calcular que volumen de stock viral se debe agregar a un pasaje a partir de una MOI específica:

$$\text{Volumen de inóculo} = \frac{\text{MOI (ufp/cel)} \times \text{número de células}}{\text{Titulo del stock viral ufp/ml}}$$

2. En este caso se estimo el stock viral P1 en 1×10^6 ufp/ml para infectar frascos T25 de 50 ml para P2 se requiere el siguiente volumen de inóculo P1:

$$\text{Inóculo P1} = \frac{0.05 \text{ ufp/cel} \times 2 \times 10^6 \text{ células}}{1 \times 10^6 \text{ ufp/ml}}$$

$$\text{Inóculo requerido} = 0.1 \text{ ml} = 100 \mu\text{l}$$

Protocolo Anexo 13: Inmunodetección por Western Blot

La expresión de la proteína recombinante producida se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Se prepararon geles separadores de poliacrilamida 10 % 12 % sembrando 12 µl de extractos de células *Sf9* infectadas con el baculovirus recombinante AcVP6_{RVHA} con buffer cracking. Las proteínas separadas se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa 0,2 µm (Whatman Protran) en buffer de transferencia (Tris-HCl 25 mM, Glicina 192 mM, 20% Metanol, pH 8.3).

Reactivos:

- Buffer de transferencia
- Rojo Ponceau
- TBS
- Leche descremada en polvo
- Tween 20
- Buffer B.R.E.F.A
- NBT
- BCIP
- ddH₂O

Procedimiento:**1.- Western blot:**

Trabajar siempre con guantes.

1. Equilibrar durante 30 min los papeles de filtro, la membrana de nitrocelulosa, los *fiber pads* y el gel en buffer de transferencia.
2. Ensamblar el sándwich, cuidando que no queden burbujas entre el gel y la membrana de nitrocelulosa según el esquema: negro /cátodo-esponja –papel de filtro-gel-nitrocelulosa-papel de filtro-esponja –rojo/ánodo+
3. Agregar el buffer de transferencia a la cuba y transferir durante toda la noche a 30 volts y a 4° C con hielo en el sistema Mini Protean III (*Bio-Rad*).
4. Retirar la membrana y teñirla con rojo Ponceau. Identificar las bandas en la membrana
5. Lavar la membrana 4 veces con TBS, 5 minutos cada vez.

Nota: muy importante antes de empezar chequear el pH del TBS (1x).

6. bloqueo: TBS + leche descremada 5 %.
7. incubación: 60 min temperatura ambiente
8. 1er set de lavados: 4 veces con TBS, 5 min cada vez.
9. Anticuerpo primario: los sueros se diluyen en TBS + leche descremada 3 %
10. Incubación: 60 min a temperatura ambiente
11. 2do set de lavados: 4 veces con TBS-Tween 20 0,01%, 5 min cada vez.
12. Anticuerpo secundario: diluidos en TBS + leche descremada 3 %
13. Incubación: 60 min a temperatura ambiente
14. 3er set de lavados: 4 veces con TBS-Tween 20 0,01%, 5 min cada vez.

2.- Revelado con anticuerpo secundario conjugado a la fosfatasa alcalina:

Procedimiento:

Se prepara la solución de revelado fresca antes de usar

Buffer B.R.E.F.A.: 10 ml

NBT: 66 μ l

BCIP: 33 μ l

1. Lavar la membrana con 10 ml de B.R.E.F.A durante 5 min para estabilizar el pH.
2. A una solución de 10 ml de buffer B.R.E.F.A., agregar 66 μ l y 33 μ l de BCIP, incubar a temp ambiente hasta aparición de señal. La reacción se detiene con H_2O destilada.

Protocolo Anexo 14: Revelado con el kit ECL Plus (GE Healthcare Life Sciences) de detección por electroquimioluminiscencia usando un anticuerpo secundario conjugado a HRP (Análisis de las VLPs 2/6).

Reactivos:

- Kit ECL Plus (GE Healthcare Life Sciences)
- Papel film

Procedimiento:

1.- Detección:

1. Preparar los reactivos de detección del kit y dejar equilibrar a temp ambiente antes de su uso.
2. Mezclar las soluciones A y B en una relación 40:1 (2 ml Sc A + 50 μ l de Sc B).
3. Sacar el exceso de buffer de lavado de la membrana y colocar la misma en una hoja de papel film limpio boca arriba. Pipetear el volumen de la mezcla de detección preparado por encima de la membrana uniformemente.
4. Incubar durante 5 min a temp ambiente.

2.- Revelado electroquimioluminiscente:

1. Sacar el exceso de los reactivos de detección tomando la membrana por su extremo superior con la ayuda de pinzas de disección. Ubicar la misma boca abajo en un nuevo papel film y envolver con cuidado sin dejar burbujas entre la membrana y el papel film.
2. Ubicar la membrana envuelta boca arriba en una placa de revelado por rayos X.
3. Colocar la hoja film de autoradiografía arriba de la membrana. Cerrar la placa y exponer durante 30 seg a 1 min.
4. Revelar el film y observar.

Protocolo Anexo 15: ELISA de CAPTURA para antígeno de RV grupo A en materia fecal

Procedimiento del Kit producido (Anlis-Malbrán):

1. Cubrir los pocillos con 50 μ l de anticuerpo de captura (IgG purificada anti Rota virus) en cc 10 μ g/ml en buffer carbonato-bicarbonato 0.1 M (Cc stock de IgG: 4.5 mg/ml)
2. Incubar 60 min TA y lavar 4 veces con buffer de lavado.
3. Diluir la muestra 1/10 y control positivo, extracto total de células *Sf9* coinfectadas con baculovirus AcVP6_{RVHA} dil 1:2, vortexear las muestras y dejarlas sedimentar unos minutos tomando la muestra del sobrenadante.
4. Como control negativo: buffer diluyente. Sembrar 50 μ l por pocillo.
5. Colocar un blanco de muestra.
6. Incubar 60 min 37° C y lavar 4 veces.
7. Diluir el conjugado*HRP 1/2000 en buffer PBS-BSA 1% y colocar 50 μ l en cada pocillo.
8. Incubar 60 min 37° C y lavar 4 veces.
9. Agregar TMB 50 μ l por pocillo o 2 gotas
10. Incubar 10 min TA.
11. Agregar 50 μ l o 2 gotas de solución stop.
12. Leer a 450 nm contra blanco.

Cut off: 0.219 +/- 10 %. Si la muestra tiene un valor dentro de este 10 % debe repetirse. Si es mayor a 0.2409 es positivo. Si es menor a 0.1971 es negativa.

ORIGEN DE LAS ILUSTRACIONES

Figura 1: Adaptada de <http://www.microbes-edu.org/etudiant/imggastro/reoviridae.gif>

Figura 2: Adaptada de ViralZone: www.expasy.org/viralzone, Swiss Institute of Bioinformatics

Figura 3: Adaptada de Pesavento JB, Estes MK, Prasad BVV (2003). Structural organization of the genome in rotavirus. In: *Viral Gastroenteritis* (eds U Desselberger, J Gray), pp 115-127. Elsevier Science, Amsterdam, 2003.

Figura 4: Adaptada de ViralZone: www.expasy.org/viralzone, Swiss Institute of Bioinformatics

Figura 5: Adaptada de ViralZone: www.expasy.org/viralzone, Swiss Institute of Bioinformatics.

Figura 6: Adaptada de Pesavento JB, Estes MK, Prasad BVV (2003). Structural organization of the genome in rotavirus. In: *Viral Gastroenteritis* (eds U Desselberger, J Gray), pp 115-127. Elsevier Science, Amsterdam, 2003.

Figura 7: Adaptada de ViralZone: www.expasy.org/viralzone, Swiss Institute of Bioinformatics

Figura 8: Adaptada de ViralZone: www.expasy.org/viralzone, Swiss Institute of Bioinformatics.

Figura 9: Adaptada de ViralZone: www.expasy.org/viralzone, Swiss Institute of Bioinformatics.

Figura 10: Adaptada de Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System. Technical manual, Version D 6 pp 5 April 2004 10359. Invitrogen life technologies.

Figura 11: Adaptada de pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems, technical manual, Part # TM042. pp. 10. Promega.

Figura 12: Adaptada de pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems, technical manual, Part # TM042. pp. 11. Promega.

Figura 13: Adaptada de Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System. Technical manual, Version D 6 pp 53 April 2004 10359. Invitrogen life technologies.

Figura 14: Adaptada de Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System. Technical manual, Version D 6 pp 5 April 2004 10359. Invitrogen life technologies.

Figura 15: Adaptada de Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System. Technical manual, Version D 6 pp 23 April 2004 10359. Invitrogen life technologies.

Figura 16: Adaptada de http://www.biontex.com/con_4_6_4/cms/upload/bilder/Transfektion3_en.png

AGRADECIMIENTOS

Mi sincero agradecimiento:

- a la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud “Dr. Carlos G. Malbrán” por darme acceso a la formación propuesta por esta maestría;
- al Instituto de Biotecnología del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (CNI-INTA Castelar) por haberme dado la posibilidad y los medios para realizar el trabajo de tesis;
- al Lic. Oscar Pérez, del Servicio de vacuna antirrábica INPB ANLIS-Malbrán, por su iniciativa y colaboración en cada etapa del proceso;
- a mi Directora, Dra. Andrea Peralta por su invalorable ayuda en la realización de mi tesis y por compartir su valiosa experiencia durante el desarrollo de este trabajo;
- al Dr. Oscar Taboga y equipo, del Instituto de Biotecnología INTA-Castelar por sus aportes y colaboración en la ejecución de este proyecto;
- a la Dra. Graciela Glikmann y equipo, de la Universidad Nacional de Quilmes, Laboratorio de Inmunología y Virología por su cooperación en la provisión del material de aislamientos de RVs humanos;
- a la Bioq. Mg. Rosana Jurado del Servicio de vacuna antirrábica INPB-ANLIS- Malbrán, por su colaboración con el ensayo ELISA.
- a mis padres, familia, amigas y amigos, que siempre me acompañan.

AREVIATURAS Y UNIDADES

Aa	Aminoácidos
AcMNPV	<i>Autographa californica</i> Multiple Nuclear Polyhedrosis Virus Virus de la polihedrosis nuclear multiple de <i>Autographa californica</i>
ADN	Acido desoxirribonucleico
APC	Antigen Presenting Cells Células presentadoras de antígeno
attTn7	sitio de transposición
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, p-toluidine salt, reactivo de revelado de Fosfatasa alcalina
Bluo-gal	halogenated indolyl- β -galactoside, β galactosido halogenado
BREFA	Buffer de revelado de fosfatasa alcalina
BV	budded virus, Progenie viral
C.I.P	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase fosfatasa alcalina intestinal de ternero
CD	Cluster de diferenciacion
CLPs	Core layered particle, partícula uni capa
CNIA-INTA	Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias - Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
CPE	Citopathic effect, Efecto citopático
CsCl	Cloruro de Cesio
dcARN	Acido ribonucleico de doble cadena
DD₅₀	50% dosis causante de diarrea
DMSO	Dimetil sulfoxido
DO	Densidad óptica
EDTA	Acido etileno-diamina-tetraacético
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas.
Fwd	Prefijo cebadores sentido
HA	Humano A
HRP	Horse Raddish Peroxidase, Peroxidasa de rabano
HRV	Rotavirus humano
Hsc70	Human heat shock cognate protein 70
IFN	Interferon
Ig	inmunoglobulinas
INPB ANLIS	Instituto Nacional de Producción de Biológicos Administración Nacional de Laboratorios
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
IRF	Interferon regulatory factor, factor de transcripción
ISG	Interferon stimulatory genes, genes estimuladores de interferon

kD	Kilo Dalton, unidad de pesomolecular de proteínas
<i>lacZα</i>	Gen bacteriano de alfa galactosidasa Z
LB	Luria Broth Caldo de Luria Medio de cultivo de bacterias
mARN	Acido ribonucleico mensajero
MCS	Sitio múltiple de clonado
MHC	Moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad
MMDB	Molecular Modeling Database
MOI	Multiplicity of infection Multiplicidad de infección
MSAL	Ministerio de Salud de la Nación
NBT	Nitro blue tetrazolium, reactivo de revelado Fosfatasa alcalina
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Nested PCR	PCR anidada segunda amplificación del DNA por PCR utilizando primers internos diferentes de la primera PCR
NSP	Non structural protein proteína no estructural
ODV	Ocluded derived virus, virus ocluidos en la matriz proteica
OPD	O-fenilendiamina
ORF	Marco abierto de lectura, Open reading frame
PCR	Polimerase Chain Reaction Reacción en cadena de la Polimerasa
PM	Peso molecular
RdRp	ARN polimerasas ARN dependientes
RE	retículo endoplásmico
RER	Retículo endoplásmico rugoso
Rev	Prefijo cebadores antisentido
RNase A	Enzima de digestión de ARN
Rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcripción reversa
RT AMV	Enzima de retrotranscripción del virus de la mieloblastosis aviar
RT M-MLV	Enzima de retrotranscripción del virus Moloney de la leucemia murina
RV	Rotavirus
RV HA	Rotavirus Humano A
SA11	Cepa de rotavirus de Simio A11
SDS	Sodio dodecil sulfato
SDS-PAGE	Sodium dodecil sulfate, Poli(acrilamida gel electroforesis Electroforesis en geles de poli(acrilamida con sodio dodecil sulfato
SFB	Suero fetal Bovino
SIRV-A	Simian rotavirus A rotavirus de simio A
SOC	Super Optimal Broth, Medio de cultivo de bacterias.

ssARN	Acido ribonucleico simple hebra
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription, Factor de transcripción
SV40	Simian virus 40 promotor del virus de simio 40
Ta	Temperatura de hibridizacion de un oligonucleótido, annealing temp
TAE	Buffer de electrophoresis Tris –Acetico-EDTA
TBS	Buffer, Tris buffered saline
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil etilendiamina
TLPs	Particulas Virales Triple capa, Triple layered particles
Tm	Temperatura de fusión melting
TMB	Tetrametil-bencidina
TMNC	Buffer 10 mM Tris-HCl pH 7, 1mM MgCl ₂ , 150 mM NaCl, 10 mM CaCl ₂
TNM-FH	Medio de cultivo de células de insecto.
Ufp	Unidades formadoras de placa
UNQ	Universidad Nacional de Quilmes
UV	Luz Ultra violeta
VLPS	Particulas similares a virus Viral Like Particles
VP	Viral Protein, proteína viral
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranósido

UNIDADES Y PREFIJOS DE UNIDAD

°C Grados celsius

g Gramos

L Litros

M Molar

bp Pares de bases (base pairs)

K 10^3

m 10^{-3}

μ 10^{-6}

n 10^{-9}

p 10^{-12}

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, W. R., & Kraft, L. M. (1963). Epizootic diarrhea of infant mice: identification of the etiologic agent. *Science*, 141(3578), 359-360.
- Aiyegbo, M. S., Sapparapu, G., Spiller, B. W., Eli, I. M., Williams, D. R., Kim, R., et al. (2013). Human rotavirus VP6-specific antibodies mediate intracellular neutralization by binding to a quaternary structure in the transcriptional pore. *PLoS One*, 8(5), e61101.
- Altmann, F., Schwihla, H., Staudacher, E., Glossl, J., & Marz, L. (1995). Insect cells contain an unusual, membrane-bound beta-N-acetylglucosaminidase probably involved in the processing of protein N-glycans. *J Biol Chem*, 270(29), 17344-17349.
- Anderson, D., Harris, R., Polayes, D., Ciccarone, V., Donahue, R., Gerard, G., et al. (1995). Rapid generation of recombinant baculoviruses and expression of foreign genes using the Bac-To-Bac® Baculovirus Expression System. *FOCUS* 17, 53 - 58.
- Angel, J., Franco, M. A., & Greenberg, H. B. (2012). Rotavirus immune responses and correlates of protection. *Curr Opin Virol*, 2(4), 419-425.
- Azevedo, M. P., Vlasova, A. N., & Saif, L. J. (2013). Human rotavirus virus-like particle vaccines evaluated in a neonatal gnotobiotic pig model of human rotavirus disease. *Expert Rev Vaccines*, 12(2), 169-181.
- Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System. Technical manual. (April 2004). Invitrogen life technologies.
- Ball, J. M., Tian, P., Zeng, C. Q., Morris, A. P., & Estes, M. K. (1996). Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science*, 272(5258), 101-104.
- Barry, G. F. (1988). A broad-host-range shuttle system for gene insertion into the chromosomes of gram-negative bacteria. *Gene*, 71(1), 75-84.
- Berkova, Z., Crawford, S. E., Trugnan, G., Yoshimori, T., Morris, A. P., & Estes, M. K. (2006). Rotavirus NSP4 induces a novel vesicular compartment regulated by calcium and associated with viroplasm. *J Virol*, 80(12), 6061-6071.
- 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*, 2(7841), 1281-1283.
- Blackhall, J., Fuentes, A., & Magnusson, G. (1996). Genetic stability of a porcine rotavirus RNA segment during repeated plaque isolation. *Virology*, 225(1), 181-190.
- Boletín Epidemiológico Anual 2010. (2011). from http://msal.gov.ar/hm/site/sala_situacion/ PANEALES/bep-anual-2010/BEPANUAL_2010.pdf.
- Boublik, Y., Di Bonito, P., & Jones, I. M. (1995). Eukaryotic virus display: engineering the major surface glycoprotein of the Autographa californica nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) for the presentation of foreign proteins on the virus surface. *Biotechnology (N Y)*, 13(10), 1079-1084.

- Bugarcic, A., & Taylor, J. A. (2006). Rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 is secreted from the apical surfaces of polarized epithelial cells. *J Virol*, 80(24), 12343-12349.
- Burns, J. W., Siadat-Pajouh, M., Krishnaney, A. A., & Greenberg, H. B. (1996). Protective effect of rotavirus VP6-specific IgA monoclonal antibodies that lack neutralizing activity. *Science*, 272(5258), 104-107.
- Campagna, M., Eichwald, C., Vascotto, F., & Burrone, O. R. (2005). RNA interference of rotavirus segment 11 mRNA reveals the essential role of NSP5 in the virus replicative cycle. *J Gen Virol*, 86(Pt 5), 1481-1487.
- Cellfectin® Reagent Technical manual. Invitrogen life technologies.
- Ciccarone, V. C., Polayes, D. A., & Luckow, V. A. (1997). Generation of Recombinant Baculovirus DNA in E.coli Using a Baculovirus Shuttle Vector *Molecular Diagnosis of Infectious Diseases* (Vol. 13, pp. 213-235).
- Condreay, J. P., Witherspoon, S. M., Clay, W. C., & Kost, T. A. (1999). Transient and stable gene expression in mammalian cells transduced with a recombinant baculovirus vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(1), 127-132.
- Conner, M. E., Zarley, C. D., Hu, B., Parsons, S., Drabinski, D., Greiner, S., et al. (1996). Virus-like particles as a rotavirus subunit vaccine. *J Infect Dis*, 174 Suppl 1, S88-92.
- Contin, R., Arnoldi, F., Campagna, M., & Burrone, O. R. (2010). Rotavirus NSP5 orchestrates recruitment of viroplasmic proteins. *J Gen Virol*, 91(Pt 7), 1782-1793.
- Cortese, M. M., Immergluck, L. C., Held, M., Jain, S., Chan, T., Grizas, A. P., et al. (2013). Effectiveness of monovalent and pentavalent rotavirus vaccine. *Pediatrics*, 132(1), e25-33.
- Corthesy, B., Benureau, Y., Perrier, C., Fourgeux, C., Parez, N., Greenberg, H., et al. (2006). Rotavirus anti-VP6 secretory immunoglobulin A contributes to protection via intracellular neutralization but not via immune exclusion. *J Virol*, 80(21), 10692-10699.
- Coulson, B. S., Londrigan, S. L., & Lee, D. J. (1997). Rotavirus contains integrin ligand sequences and a disintegrin-like domain that are implicated in virus entry into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(10), 5389-5394.
- Crawford, S. E., Labbe, M., Cohen, J., Burroughs, M. H., Zhou, Y. J., & Estes, M. K. (1994). Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells. *J Virol*, 68(9), 5945-5952.
- Criglar, J. M., Hu, L., Crawford, S. E., Hyser, J. M., Broughman, J. R., Prasad, B. V., et al. (2014). A novel form of rotavirus NSP2 and phosphorylation-dependent NSP2-NSP5 interactions are associated with viroplasm assembly. *J Virol*, 88(2), 786-798.
- Current Protocols in Molecular Biology*. (1994). John Wiley & Sons.
- Cheung, W., Gill, M., Esposito, A., Kaminski, C. F., Courousse, N., Chwetzoff, S., et al. (2010). Rotaviruses associate with cellular lipid droplet components to replicate in viroplasms, and compounds disrupting or blocking lipid droplets inhibit viroplasm formation and viral replication. *J Virol*, 84(13), 6782-6798.
- De Grazia, S., Bonura, F., Colomba, C., Cascio, A., Di Bernardo, F., Collura, A., et al. (2014). Data mining from a 27-years rotavirus surveillance in Palermo, Italy. *Infect Genet Evol*, 28, 377-384.
-

- Deal, E. M., Lahl, K., Narvaez, C. F., Butcher, E. C., & Greenberg, H. B. (2013). Plasmacytoid dendritic cells promote rotavirus-induced human and murine B cell responses. *J Clin Invest*, 123(6), 2464-2474.
- Degiuseppe, J. I., Giovacchini, C., & Stupka, J. A. (2013). [Rotavirus epidemiology and surveillance in Argentina: 2009-2011]. *Arch Argent Pediatr*, 111(2), 148-154.
- Desselberger, U. (1999). Rotavirus infections: guidelines for treatment and prevention. *Drugs*, 58(3), 447-452.
- Desselberger, U., & Gray, J. (2013). Viral gastroenteritis. *Medicine*, 41(12), 700-704.
- Ebina, T. (1996). Prophylaxis of rotavirus gastroenteritis using immunoglobulin. *Arch Virol Suppl*, 12, 217-223.
- Eichwald, C., Rodriguez, J. F., & Burrone, O. R. (2004). Characterization of rotavirus NSP2/NSP5 interactions and the dynamics of viroplasm formation. *J Gen Virol*, 85(Pt 3), 625-634.
- Estes, M. K., & Atmar, R. L. (2003). Viral Pathogens of the Intestine. In H. G (Ed.), *Microbial Pathogenesis and the Intestinal Epithelial Cell* (pp. 525-545). Washington, DC: American Society of Microbiology.
- Estes, M. K., Crawford, S. E., Penaranda, M. E., Petrie, B. L., Burns, J. W., Chan, W. K., et al. (1987). Synthesis and immunogenicity of the rotavirus major capsid antigen using a baculovirus expression system. *J Virol*, 61(5), 1488-1494.
- Estes, M. K., Greenberg, H.B. (2013). Rotaviruses. In D. M. Knipe, Howley, P.M. (Ed.), *Fields Virology* (6th ed., Vol. 1, pp. 1347-1401.). Philadelphia, PA.: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins.
- Feng, N., Franco, M. A., & Greenberg, H. B. (1997). Murine model of rotavirus infection. *Adv Exp Med Biol*, 412, 233-240.
- Flewett, T. H., Bryden, A. S., & Davies, H. (1973). Letter: Virus particles in gastroenteritis. *Lancet*, 2(7844), 1497.
- Franco, M. A., Angel, J., & Greenberg, H. B. (2006). Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines. *Vaccine*, 24(15), 2718-2731.
- Franco, M. A., & Greenberg, H. B. (1995). Role of B cells and cytotoxic T lymphocytes in clearance of and immunity to rotavirus infection in mice. *J Virol*, 69(12), 7800-7806.
- Gaunt, E. R., Zhang, Q., Cheung, W., Wakelam, M. J., Lever, A. M., & Desselberger, U. (2013). Lipidome analysis of rotavirus-infected cells confirms the close interaction of lipid droplets with viroplasms. *J Gen Virol*, 94(Pt 7), 1576-1586.
- Gentsch, J. R., Laird, A. R., Bielfelt, B., Griffin, D. D., Banyai, K., Ramachandran, M., et al. (2005). Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. *J Infect Dis*, 192 Suppl 1, S146-159.
- Gomara, M. I., Green, J., & Gray, J. (2000). Methods of rotavirus detection, sero- and genotyping, sequencing, and phylogenetic analysis. *Methods Mol Med*, 34, 189-216.
- Graff, J. W., Ewen, J., Ettayebi, K., & Hardy, M. E. (2007). Zinc-binding domain of rotavirus NSP1 is required for proteasome-dependent degradation of IRF3 and autoregulatory NSP1 stability. *J Gen Virol*, 88(Pt 2), 613-620.
-

- Graff, J. W., Mitzel, D. N., Weisend, C. M., Flenniken, M. L., & Hardy, M. E. (2002). Interferon regulatory factor 3 is a cellular partner of rotavirus NSP1. *J Virol*, 76(18), 9545-9550.
- Graham, D. Y., Dufour, G. R., & Estes, M. K. (1987). Minimal infective dose of rotavirus. *Arch Virol*, 92(3-4), 261-271.
- Graham, K. L., Halasz, P., Tan, Y., Hewish, M. J., Takada, Y., Mackow, E. R., et al. (2003). Integrin-using rotaviruses bind alpha2beta1 integrin alpha2 I domain via VP4 DGE sequence and recognize alphaXbeta2 and alphaVbeta3 by using VP7 during cell entry. *J Virol*, 77(18), 9969-9978.
- Green, K. Y., & Kapikian, A. Z. (1992). Identification of VP7 epitopes associated with protection against human rotavirus illness or shedding in volunteers. *J Virol*, 66(1), 548-553.
- Greenberg, H. B., Valdesuso, J., van Wyke, K., Midthun, K., Walsh, M., McAuliffe, V., et al. (1983). Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies directed at two surface proteins of rhesus rotavirus. *J Virol*, 47(2), 267-275.
- Groft, C. M., & Burley, S. K. (2002). Recognition of eIF4G by rotavirus NSP3 reveals a basis for mRNA circularization. *Mol Cell*, 9(6), 1273-1283.
- Guarino, A., Dupont, C., Gorelov, A. V., Gottrand, F., Lee, J. K., Lin, Z., et al. (2012). The management of acute diarrhea in children in developed and developing areas: from evidence base to clinical practice. *Expert Opin Pharmacother*, 13(1), 17-26.
- Guerrero, C. A., Bouysounade, D., Zarate, S., Isa, P., Lopez, T., Espinosa, R., et al. (2002). Heat shock cognate protein 70 is involved in rotavirus cell entry. *J Virol*, 76(8), 4096-4102.
- Gutierrez, M., Isa, P., Sanchez-San Martin, C., Perez-Vargas, J., Espinosa, R., Arias, C. F., et al. (2010). Different rotavirus strains enter MA104 cells through different endocytic pathways: the role of clathrin-mediated endocytosis. *J Virol*, 84(18), 9161-9169.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- Haselhorst, T., Fleming, F. E., Dyason, J. C., Hartnell, R. D., Yu, X., Holloway, G., et al. (2009). Sialic acid dependence in rotavirus host cell invasion. *Nat Chem Biol*, 5(2), 91-93.
- He, B., Yang, F., Yang, W., Zhang, Y., Feng, Y., Zhou, J., et al. (2013). Characterization of a novel G3P[3] rotavirus isolated from a lesser horseshoe bat: a distant relative of feline/canine rotaviruses. *J Virol*, 87(22), 12357-12366.
- Holloway, G., & Coulson, B. S. (2013). Innate cellular responses to rotavirus infection. *J Gen Virol*, 94(Pt 6), 1151-1160.
- Holloway, G., Truong, T. T., & Coulson, B. S. (2009). Rotavirus antagonizes cellular antiviral responses by inhibiting the nuclear accumulation of STAT1, STAT2, and NF-kappaB. *J Virol*, 83(10), 4942-4951.
- Hung, T., Chen, G. M., Wang, C. G., Yao, H. L., Fang, Z. Y., Chao, T. X., et al. (1984). Waterborne outbreak of rotavirus diarrhoea in adults in China caused by a novel rotavirus. *Lancet*, 1(8387), 1139-1142.
- Hyser, J. M., Collinson-Pautz, M. R., Utama, B., & Estes, M. K. (2010). Rotavirus disrupts calcium homeostasis by NSP4 viroporin activity. *MBio*, 1(5).

Hyser, J. M., Utama, B., Crawford, S. E., Broughman, J. R., & Estes, M. K. (2013). Activation of the endoplasmic reticulum calcium sensor STIM1 and store-operated calcium entry by rotavirus requires NSP4 viroporin activity. *J Virol*, 87(24), 13579-13588.

Indicadores básicos 2011. (2012). from http://www.deis.gov.ar/publicaciones/archivos/indicadores_2011.pdf.

Isa, P., Realpe, M., Romero, P., Lopez, S., & Arias, C. F. (2004). Rotavirus RRV associates with lipid membrane microdomains during cell entry. *Virology*, 322(2), 370-381.

Iturriza-Gomara, M., Dallman, T., Banyai, K., Bottiger, B., Buesa, J., Diedrich, S., et al. (2011). Rotavirus genotypes co-circulating in Europe between 2006 and 2009 as determined by EuroRotaNet, a pan-European collaborative strain surveillance network. *Epidemiol Infect*, 139(6), 895-909.

Iturriza-Gomara, M., Isherwood, B., Desselberger, U., & Gray, J. (2001). Reassortment in vivo: driving force for diversity of human rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999. *J Virol*, 75(8), 3696-3705.

Iturriza-Gomara, M., Kang, G., & Gray, J. (2004). Rotavirus genotyping: keeping up with an evolving population of human rotaviruses. *J Clin Virol*, 31(4), 259-265.

Iturriza Gomara, M., Wong, C., Blome, S., Desselberger, U., & Gray, J. (2002). Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. *J Virol*, 76(13), 6596-6601.

Jarvis, D. L. (1997). Baculovirus Expression Vectors. In L. K. Miller (Ed.), *The Baculoviruses* (pp. 389-431). Boston, MA: Springer US.

Jayaram, H., Estes, M. K., & Prasad, B. V. (2004). Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. *Virus Res*, 101(1), 67-81.

Jiang, B., Gentsch, J. R., & Glass, R. I. (2002). The role of serum antibodies in the protection against rotavirus disease: an overview. *Clin Infect Dis*, 34(10), 1351-1361.

Jiang, S., Ji, S., Tang, Q., Cui, X., Yang, H., Kan, B., et al. (2008). Molecular characterization of a novel adult diarrhoea rotavirus strain J19 isolated in China and its significance for the evolution and origin of group B rotaviruses. *J Gen Virol*, 89(Pt 10), 2622-2629.

Johansson, E., Istrate, C., Charpilienne, A., Cohen, J., Hinkula, J., Poncet, D., et al. (2008). Amount of maternal rotavirus-specific antibodies influence the outcome of rotavirus vaccination of newborn mice with virus-like particles. *Vaccine*, 26(6), 778-785.

Jurado, R. (2008). *Producción y validación de un enzimo inmuno ensayo (ELISA) para la detección de antígeno de rotavirus (grupo A) en heces*. Unpublished Maestría en Microbiología Molecular Universidad Nacional de San Martín - Anlis Malbrán, Argentina.

Kang, G., Desai, R., Arora, R., Chitambar, S., Naik, T. N., Krishnan, T., et al. (2013). Diversity of circulating rotavirus strains in children hospitalized with diarrhea in India, 2005-2009. *Vaccine*, 31(27), 2879-2883.

Kerin, T. K., Kane, E. M., Glass, R. I., & Gentsch, J. R. (2007). Characterization of VP6 genes from rotavirus strains collected in the United States from 1996-2002. *Virus Genes*, 35(3), 489-495.

- Keswick, B. H., Pickering, L. K., DuPont, H. L., & Woodward, W. E. (1983). Survival and detection of rotaviruses on environmental surfaces in day care centers. *Appl Environ Microbiol*, 46(4), 813-816.
- Kindler, E., Trojnar, E., Heckel, G., Otto, P. H., & Johne, R. (2013). Analysis of rotavirus species diversity and evolution including the newly determined full-length genome sequences of rotavirus F and G. *Infect Genet Evol*, 14, 58-67.
- Kordasti, S., Sjøvall, H., Lundgren, O., & Svensson, L. (2004). Serotonin and vasoactive intestinal peptide antagonists attenuate rotavirus diarrhoea. *Gut*, 53(7), 952-957.
- Kost, T. A., & Condey, J. P. (2002). Recombinant baculoviruses as mammalian cell gene-delivery vectors. *Trends Biotechnol*, 20(4), 173-180.
- Kost, T. A., Condey, J. P., & Jarvis, D. L. (2005). Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat Biotechnol*, 23(5), 567-575.
- La Frazia, S., Ciucci, A., Arnoldi, F., Coira, M., Gianferretti, P., Angelini, M., et al. (2013). Thiazolides, a new class of antiviral agents effective against rotavirus infection, target viral morphogenesis, inhibiting viroplasm formation. *J Virol*, 87(20), 11096-11106.
- Lahon, A., Maniya, N. H., Tambe, G. U., Chinchole, P. R., Purwar, S., Jacob, G., et al. (2013). Group B rotavirus infection in patients with acute gastroenteritis from India: 1994-1995 and 2004-2010. *Epidemiol Infect*, 141(5), 969-975.
- Lawton, J. A., Estes, M. K., & Prasad, B. V. (1997). Three-dimensional visualization of mRNA release from actively transcribing rotavirus particles. *Nat Struct Biol*, 4(2), 118-121.
- Liu, L., Johnson, H. L., Cousens, S., Perin, J., Scott, S., Lawn, J. E., et al. (2012). Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet*, 379(9832), 2151-2161.
- Lopez, S., & Arias, C. F. (2004). Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol*, 12(6), 271-278.
- Luckow, V. A., Lee, S. C., Barry, G. F., & Olins, P. O. (1993). Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J Virol*, 67(8), 4566-4579.
- Luckow, V. A., & Summers, M. D. (1988). Signals important for high-level expression of foreign genes in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus expression vectors. *Virology*, 167(1), 56-71.
- Luchs, A., & Timenetsky Mdo, C. (2014). G8P[6] rotaviruses isolated from Amerindian children in Mato Grosso do Sul, Brazil, during 2009: close relationship of the G and P genes with those of bovine and bat strains. *J Gen Virol*, 95(Pt 3), 627-641.
- Ludert, J. E., Michelangeli, F., Gil, F., Liprandi, F., & Esparza, J. (1987). Penetration and uncoating of rotaviruses in cultured cells. *Intervirology*, 27(2), 95-101.
- Malek, M. A., Curns, A. T., Holman, R. C., Fischer, T. K., Bresee, J. S., Glass, R. I., et al. (2006). Diarrhea and rotavirus-associated hospitalizations among children less than 5 years of age: United States, 1997 and 2000. *Pediatrics*, 117(6), 1887-1892.
- Malherbe, H., & Harwin, R. (1963). The cytopathic effects of vervet monkey viruses. *SAfr Med J*, 37, 407-411.

- Marchler-Bauer, A., Anderson, J. B., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., DeWeese-Scott, C., Fong, J. H., et al. (2009). CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Research*, 37(Database issue), D205-D210.
- Marchler-Bauer, A., Lu, S., Anderson, J. B., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., DeWeese-Scott, C., et al. (2011). CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Research*, 39(Database issue), D225-D229.
- Marthaler, D., Rossow, K., Culhane, M., Goyal, S., Collins, J., Matthijnsens, J., et al. (2014). Widespread rotavirus H in commercially raised pigs, United States. *Emerg Infect Dis*, 20(7), 1195-1198.
- Martinez-Laso, J., Roman, A., Rodriguez, M., Cervera, I., Head, J., Rodriguez-Avial, I., et al. (2009). Diversity of the G3 genes of human rotaviruses in isolates from Spain from 2004 to 2006: cross-species transmission and inter-genotype recombination generates alleles. *J Gen Virol*, 90(Pt 4), 935-943.
- Mathieu, M., Petitpas, I., Navaza, J., Lepault, J., Kohli, E., Pothier, P., et al. (2001). Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: implications for the architecture of the virion. *EMBO J*, 20(7), 1485-1497.
- Matthijnsens, J., Ciarlet, M., Heiman, E., Arijis, I., Delbeke, T., McDonald, S. M., et al. (2008). Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *J Virol*, 82(7), 3204-3219.
- Matthijnsens, J., Ciarlet, M., McDonald, S. M., Attoui, H., Banyai, K., Brister, J. R., et al. (2011). Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol*, 156(8), 1397-1413.
- Matthijnsens, J., Ciarlet, M., Rahman, M., Attoui, H., Banyai, K., Estes, M. K., et al. (2008). Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch Virol*, 153(8), 1621-1629.
- Matthijnsens, J., De Grazia, S., Piessens, J., Heylen, E., Zeller, M., Giammanco, G. M., et al. (2011). Multiple reassortment and interspecies transmission events contribute to the diversity of feline, canine and feline/canine-like human group A rotavirus strains. *Infect Genet Evol*, 11(6), 1396-1406.
- Matthijnsens, J., Otto, P. H., Ciarlet, M., Desselberger, U., Van Ranst, M., & Johne, R. (2012). VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Arch Virol*, 157(6), 1177-1182.
- McClain, B., Settembre, E., Temple, B. R., Bellamy, A. R., & Harrison, S. C. (2010). X-ray crystal structure of the rotavirus inner capsid particle at 3.8 Å resolution. *J Mol Biol*, 397(2), 587-599.
- Mebus, C. A., Underdahl, N. R., Rhodes, M. B., & Twiehaus, M. J. (1969). Further studies on neonatal calf diarrhea virus. *Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc*, 73, 97-99.
- Molinari, B. L., Lorenzetti, E., Otonel, R. A., Alfieri, A. F., & Alfieri, A. A. (2014). Species H rotavirus detected in piglets with diarrhea, Brazil, 2012. *Emerg Infect Dis*, 20(6), 1019-1022.
- Molinari, P., Peralta, A., & Taboga, O. (2008). Production of rotavirus-like particles in *Spodoptera frugiperda* larvae. *J Virol Methods*, 147(2), 364-367.
- Morgulis, A., Coulouris, G., Raytselis, Y., Madden, T. L., Agarwala, R., & Schaffer, A. A. (2008). Database indexing for production MegaBLAST searches. *Bioinformatics*, 24(16), 1757-1764.

- Mullick, S., Mukherjee, A., Ghosh, S., Pazhani, G. P., Sur, D., Manna, B., et al. (2013). Genomic analysis of human rotavirus strains G6P[14] and G11P[25] isolated from Kolkata in 2009 reveals interspecies transmission and complex reassortment events. *Infect Genet Evol*, 14, 15-21.
- Newton, K., Meyer, J. C., Bellamy, A. R., & Taylor, J. A. (1997). Rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 alters plasma membrane permeability in mammalian cells. *J Virol*, 71(12), 9458-9465.
- Nilsson, M., Svenungsson, B., Hedlund, K. O., Uhnöo, I., Lagergren, A., Akre, T., et al. (2000). Incidence and genetic diversity of group C rotavirus among adults. *J Infect Dis*, 182(3), 678-684.
- O'Neal, C. M., Crawford, S. E., Estes, M. K., & Conner, M. E. (1997). Rotavirus virus-like particles administered mucosally induce protective immunity. *J Virol*, 71(11), 8707-8717.
- O'Reilly, D. R., Miller, L. K., & Luckow, V. A. (1994). *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*: Oxford University Press.
- Offit, P. A. (1994). Rotaviruses: immunological determinants of protection against infection and disease. *Adv Virus Res*, 44, 161-202.
- Offit, P. A., Clark, H. F., Blavat, G., & Greenberg, H. B. (1986). Reassortant rotaviruses containing structural proteins vp3 and vp7 from different parents induce antibodies protective against each parental serotype. *J Virol*, 60(2), 491-496.
- Oker-Blom, C., Airenne, K. J., & Grabherr, R. (2003). Baculovirus display strategies: Emerging tools for eukaryotic libraries and gene delivery. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 2(3), 244-253.
- Otto, P. H., Ahmed, M. U., Hotzel, H., Machnowska, P., Reetz, J., Roth, B., et al. (2012). Detection of avian rotaviruses of groups A, D, F and G in diseased chickens and turkeys from Europe and Bangladesh. *Vet Microbiol*, 156(1-2), 8-15.
- Parashar, U. D., Gibson, C. J., Bresee, J. S., & Glass, R. I. (2006). Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis*, 12(2), 304-306.
- Parashar, U. D., Hummelman, E. G., Bresee, J. S., Miller, M. A., & Glass, R. I. (2003). Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis*, 9(5), 565-572.
- Patel, M. M., & Parashar, U. D. (2009). Assessing the effectiveness and public health impact of rotavirus vaccines after introduction in immunization programs. *J Infect Dis*, 200 Suppl 1, S291-299.
- Peralta, A., Molinari, P., & Taboga, O. (2009). Chimeric recombinant rotavirus-like particles as a vehicle for the display of heterologous epitopes. *Virol J*, 6, 192.
- Perez-Vargas, J., Romero, P., Lopez, S., & Arias, C. F. (2006). The peptide-binding and ATPase domains of recombinant hsc70 are required to interact with rotavirus and reduce its infectivity. *J Virol*, 80(7), 3322-3331.
- pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems, technical manual.
- Piron, M., Vende, P., Cohen, J., & Poncet, D. (1998). Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4G1 and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *EMBO J*, 17(19), 5811-5821.
- Practice Parameter: The Management of Acute Gastroenteritis in Young Children. (1996). *Pediatrics*, 97(3), 424-435.
-

- Prasad, B. V., Rothnagel, R., Zeng, C. Q., Jakana, J., Lawton, J. A., Chiu, W., et al. (1996). Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional complexes in rotavirus. *Nature*, 382(6590), 471-473.
- Rha, B., Tate, J. E., Payne, D. C., Cortese, M. M., Lopman, B. A., Curns, A. T., et al. (2014). Effectiveness and impact of rotavirus vaccines in the United States - 2006-2012. *Expert Rev Vaccines*, 13(3), 365-376.
- Rychlik, W., & Rhoads, R. E. (1989). A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and in vitro amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*, 17(21), 8543-8551.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning* (Vol. 2): Cold spring harbor laboratory press New York.
- Santos, N., & Hoshino, Y. (2005). Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol*, 15(1), 29-56.
- Sen, A., Puijssers, A. J., Dermody, T. S., Garcia-Sastre, A., & Greenberg, H. B. (2011). The early interferon response to rotavirus is regulated by PKR and depends on MAVS/IPS-1, RIG-I, MDA-5, and IRF3. *J Virol*, 85(8), 3717-3732.
- Sen, A., Rott, L., Phan, N., Mukherjee, G., & Greenberg, H. B. (2014). Rotavirus NSP1 protein inhibits interferon-mediated STAT1 activation. *J Virol*, 88(1), 41-53.
- Seo, N. S., Zeng, C. Q., Hyser, J. M., Utama, B., Crawford, S. E., Kim, K. J., et al. (2008). Integrins alpha1beta1 and alpha2beta1 are receptors for the rotavirus enterotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(26), 8811-8818.
- Settembre, E. C., Chen, J. Z., Dormitzer, P. R., Grigorieff, N., & Harrison, S. C. (2011). Atomic model of an infectious rotavirus particle. *EMBO J*, 30(2), 408-416.
- Silvestri, L. S., Taraporewala, Z. F., & Patton, J. T. (2004). Rotavirus replication: plus-sense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasm. *J Virol*, 78(14), 7763-7774.
- Steyer, A., Poljsak-Prijatelj, M., Barlic-Maganja, D., & Marin, J. (2008). Human, porcine and bovine rotaviruses in Slovenia: evidence of interspecies transmission and genome reassortment. *J Gen Virol*, 89(Pt 7), 1690-1698.
- Svensson, L., Sheshberadaran, H., Vene, S., Norrby, E., Grandien, M., & Wadell, G. (1987). Serum antibody responses to individual viral polypeptides in human rotavirus infections. *J Gen Virol*, 68 (Pt 3), 643-651.
- Tate, J. E., Burton, A. H., Boschi-Pinto, C., Steele, A. D., Duque, J., & Parashar, U. D. (2012). 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, 12(2), 136-141.
- Tate, J. E., Mutuc, J. D., Panozzo, C. A., Payne, D. C., Cortese, M. M., Cortes, J. E., et al. (2011). Sustained decline in rotavirus detections in the United States following the introduction of rotavirus vaccine in 2006. *Pediatr Infect Dis J*, 30(1 Suppl), S30-34.
- Tian, P., Ball, J. M., Zeng, C. Q., & Estes, M. K. (1996). The rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 possesses membrane destabilization activity. *J Virol*, 70(10), 6973-6981.
- Tian, P., Hu, Y., Schilling, W. P., Lindsay, D. A., Eiden, J., & Estes, M. K. (1994). The nonstructural glycoprotein of rotavirus affects intracellular calcium levels. *J Virol*, 68(1), 251-257.

- Todd, S., Page, N. A., Duncan Steele, A., Peenze, I., & Cunliffe, N. A. (2010). Rotavirus strain types circulating in Africa: Review of studies published during 1997-2006. *J Infect Dis*, 202 Suppl, S34-42.
- Tosser, G., Labbe, M., Bremont, M., & Cohen, J. (1992). Expression of the major capsid protein VP6 of group C rotavirus and synthesis of chimeric single-shelled particles by using recombinant baculoviruses. *J Virol*, 66(10), 5825-5831.
- Trask, S. D., Ogden, K. M., & Patton, J. T. (2012). Interactions among capsid proteins orchestrate rotavirus particle functions. *Curr Opin Virol*, 2(4), 373-379.
- Trojanar, E., Otto, P., & John, R. (2009). The first complete genome sequence of a chicken group A rotavirus indicates independent evolution of mammalian and avian strains. *Virology*, 386(2), 325-333.
- Velazquez, F. R., Matson, D. O., Calva, J. J., Guerrero, L., Morrow, A. L., Carter-Campbell, S., et al. (1996). Rotavirus infections in infants as protection against subsequent infections. *N Engl J Med*, 335(14), 1022-1028.
- Vigilancia epidemiológica de diarreas causadas por rotavirus: guía práctica, 623 C.F.R. (2007).
- Wang, Y., Geer, L. Y., Chappey, C., Kans, J. A., & Bryant, S. H. (2000). Cn3D: sequence and structure views for Entrez. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(6), 300-302.
- Zarate, S., Cuadras, M. A., Espinosa, R., Romero, P., Juarez, K. O., Camacho-Nuez, M., et al. (2003). Interaction of rotaviruses with Hsc70 during cell entry is mediated by VP5. *J Virol*, 77(13), 7254-7260.
- Zarate, S., Romero, P., Espinosa, R., Arias, C. F., & Lopez, S. (2004). VP7 mediates the interaction of rotaviruses with integrin α 5 β 1 through a novel integrin-binding site. *J Virol*, 78(20), 10839-10847.
- Zhang, M., Zeng, C. Q., Morris, A. P., & Estes, M. K. (2000). A functional NSP4 enterotoxin peptide secreted from rotavirus-infected cells. *J Virol*, 74(24), 11663-11670.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., & Miller, W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol*, 7(1-2), 203-214.