



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Estudio de seroprevalencia de anticuerpos frente a la
proteína VP8* del genotipo P[4] de rotavirus humano.

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: García Martínez, Marta

Tutor/a: Morais Ezquerro, Sergi Beñat

Cotutor/a externo: GOZALBO ROVIRA, ROBERTO VICENTE

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escuela Técnica Superior
de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL

---Trabajo Fin de Grado en Biotecnología ---

*Estudio de seroprevalencia de anticuerpos frente a la
proteína VP8* del genotipo P[4] de rotavirus humano.*

Alumna: Marta García Martínez

Tutor Académico: Sergi Morais Ezquerro

Tutor Externo: Roberto Vicente Gozalbo Rovira

**Curso académico 2022/2023
Valencia, 12 de junio de 2023**



Estudio de seroprevalencia de anticuerpos frente a la proteína VP8* del genotipo P[4] de rotavirus humano.

RESUMEN

Los Rotavirus son la principal causa de gastroenteritis vírica aguda en lactantes y niños menores de cinco años a nivel global, siendo responsables de una elevada tasa de mortalidad y morbilidad en países en vías de desarrollo. Su material genético está compuesto por 11 segmentos de ARN doble cadena que codifican para seis proteínas estructurales y seis no estructurales, entre las que destacan VP4 y VP7 como las principales proteínas responsables de la identificación de los genotipos P y G, respectivamente. Los genotipos mayoritarios a nivel global son el P[8] y el P[4]. Dentro del genotipo P[4] existen diferentes linajes en base a sus características filogenéticas.

El objetivo principal de este trabajo es estudiar la seroprevalencia de los diferentes linajes dentro de la población de cara al desarrollo optimizado de vacunas. Para ello, se realizó el clonaje, expresión y purificación de la proteína VP8* de los diferentes linajes y se evaluó la seroprevalencia de anticuerpos mediante ELISA en 102 sueros humanos. Los resultados obtenidos evidencian diferencias en la seroprevalencia frente a los diferentes linajes filogenéticos del genotipo P[4], lo que condiciona la elección de las cepas incluidas en las vacunas frente a rotavirus. Este trabajo se relaciona con los siguientes ODS de la Agenda 2030: Salud y Bienestar, Educación de calidad e Industria, innovación e infraestructura.

PALABRAS CLAVE: rotavirus, linaje, VP8*, vacunas

Alumna; Marta García Martínez

Valencia, 12 de junio de 2023

Tutor Académico: Sergi Morais Ezquerro

Tutor Externo: Roberto Vicente Gozalbo Rovira

Seroprevalence study of antibodies against the VP8* protein of human rotavirus genotype P[4].

ABSTRACT

Rotaviruses are the leading cause of acute viral gastroenteritis in infants and children under five globally, responsible for high mortality and morbidity rates in developing countries. Their genetic material consists of 11 segments of double-stranded RNA that encode for six structural and six non-structural proteins, with VP4 and VP7 being the main proteins responsible for the identification of genotypes P and G, respectively. The predominant genotypes globally are P[8] and P[4]. The P[4] genotype has different lineages based on their phylogenetic characteristics.

The main objective of this work is to study the seroprevalence of the different lineages within the population with a view to the optimized development of vaccines. For this, the cloning, expression, and purification of the VP8* protein of the different lineages was carried out, and the seroprevalence of studies against the different lineages was evaluated through ELISA in 102 human sera. The results show differences in seroprevalence against the different phylogenetic lineages of the P[4] genotype, determining the choice of strains included in rotavirus vaccines. This work is related to the following SDGs of the 2030 Agenda: Health and Wellness, Quality Education and Industry, innovation and infrastructure.

KEYWORDS: Rotavirus, lineage, VP8*, vaccines

AGRADECIMIENTOS

A Rober y Sergi, por confiar en mí y acompañarme en todo momento.

A Patri, Celia, Paloma, Nuria y Carmen, por estar desde siempre a mi lado y hacerme saber que vais a estar para siempre.

A Vicente, por acompañarme en cada cosa que consigo y hacerme sentir orgullosa.

A David, la suerte de mi vida.

A mi madre, mi padre y mis iaios; esto, como todo lo que tengo, es tan vuestro como mío. Os quiero.

Índice

Índice	V
Índice de figuras	VI
Índice de tablas.....	VII
Abreviaturas.....	VIII
1. Introducción	1
2. Objetivos	6
3. Materiales y métodos	7
3.1. Clonaje de la proteína VP8* del genotipo P[4].	7
3.2. Digestión y ligación del inserto con el plásmido pGEX-2T.....	8
3.3. Transformación del plásmido pGEX-2T en la cepa TOP10 de <i>E. coli</i>.	10
3.4. Transformación en la cepa BL21 de <i>E. coli</i> para la expresión de las proteínas.....	11
3.5. Purificación de la proteína VP8*	12
3.6. Estudio de reactividad. Análisis de sueros humanos.....	13
4. Resultados.....	14
4.1. Clonaje de la proteína VP8*	14
4.2. Purificación de la proteína VP8*	17
4.3. Análisis de sueros humanos	21
5. Conclusiones	25
6. Bibliografía	26
7. Anexos	1

Índice de figuras

Figura 1	<i>Características arquitectónicas del rotavirus.....</i>	<i>1</i>
Figura 2	<i>Esquema de la proteína VP4 de rotavirus.....</i>	<i>2</i>
Figura 3	<i>Gel SDS- PAGE de diferentes proteínas GST:VP8*.....</i>	<i>3</i>
Figura 4	<i>Representación esquemática de la proteína VP4 de rotavirus. Regiones variables y conservadas de la proteína y lugares de corte por tripsina (VP5* y VP8*).....</i>	<i>3</i>
Figura 5	<i>Plásmido pGEX-2T.....</i>	<i>7</i>
Figura 6	<i>Protocolo NucleoSpin Plasmid.....</i>	<i>8</i>
Figura 7	<i>Protocolo NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up.....</i>	<i>9</i>
Figura 8	<i>Resultados de la digestión.....</i>	<i>14</i>
Figura 9	<i>Resultados PCR colonia.....</i>	<i>15</i>
Figura 10	<i>Secuencia de los linajes del I al IV de la proteína VP8* del genotipo P[4] clonados.....</i>	<i>16</i>
Figura 11	<i>Cromatograma de la purificación de la proteína de fusión GST:VP8*.....</i>	<i>17</i>
Figura 12	<i>Cromatograma del linaje III de la proteína VP8* tras desalado.....</i>	<i>18</i>
Figura 13	<i>Proteína antes y después de la digestión con trombina.....</i>	<i>19</i>
Figura 14	<i>Cromatograma de los linajes I y II de la proteína VP8* tras la digestión con trombina.....</i>	<i>20</i>
Figura 15	<i>Gel de poliacrilamida con los diferentes linajes de la proteína VP8.</i>	<i>21</i>
Figura 16	<i>Resultados colorimétricos del ensayo inmunológico ELISA de 6 de los 102 sueros estudiados.....</i>	<i>22</i>
Figura 17	<i>Gráfico circular en el que se representan la cantidad de sueros que reconocen uno, dos, tres, cuatro o ningún linaje del genotipo P[4] de la proteína VP8* de rotavirus.</i>	<i>23</i>
Figura 18	<i>Histograma en el que se representa por cuántos sueros es reconocido cada linaje del genotipo P[4] de la proteína VP8* de rotavirus.</i>	<i>23</i>
Figura 19	<i>Gráfico de barras en el que se representa el porcentaje de la población que reconoce cada uno de los linajes.....</i>	<i>24</i>
Figura 20	<i>Gráfico de barras en el que se representa el porcentaje de la población que reconoce combinaciones de dos linajes.....</i>	<i>24</i>

Figura 21	<i>Gráfico de barras en el que se representa el porcentaje de la población que reconoce combinaciones de tres linajes.....</i>	<i>25</i>
------------------	--	-----------

Índice de tablas

Tabla 1	<i>Seroprevalencia de proteínas anti-rotavirus VP8* en adultos y niños en Valencia, España.....</i>	<i>4</i>
----------------	---	----------

Abreviaturas

2×YT: Medio de 2× triptona de extracto de levadura

BSA: Albúmina de suero bovino

GST: Glutación S-transferasa

IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

LB: Luria Bertani

OD: Densidad óptica

PBS: Tampón fosfato salino 10 mM, pH 7,4

PBS-T: Tampón fosfato salino – Tween (0,05%)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PMFS: Fenil-metil-sulfonil-fluoruro

TC: Tampón de carga

1. Introducción

Los rotavirus del grupo A (RVA) son la principal causa de gastroenteritis y causan 200.000 muertes y varios millones de hospitalizaciones en todo el mundo cada año. El principal modo de transmisión del rotavirus es por vía fecal-oral. Dado que el virus es estable en el medioambiente, la transmisión puede ocurrir también a través de la ingesta de agua o alimentos contaminados. La enfermedad por rotavirus está caracterizada por vómitos y diarrea líquida durante 3 a 8 días, acompañada de fiebre y dolor abdominal, además de pérdida del apetito y deshidratación. El diagnóstico puede hacerse mediante la detección rápida del antígeno del rotavirus en heces (CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION). La inmunidad después de la infección es incompleta, pero las infecciones repetidas tienden a ser menos graves que la infección original (DEPARTMENT OF HEALTH VICTORIAN GOVERNMENT, 2022).

El rotavirus contiene un genoma de ARN de doble cadena segmentado. La proteína VP7 del rotavirus forma la cubierta de proteína de la cápside externa y la proteína VP4 forma los picos que salen a través de la cápside externa (Figura 1).

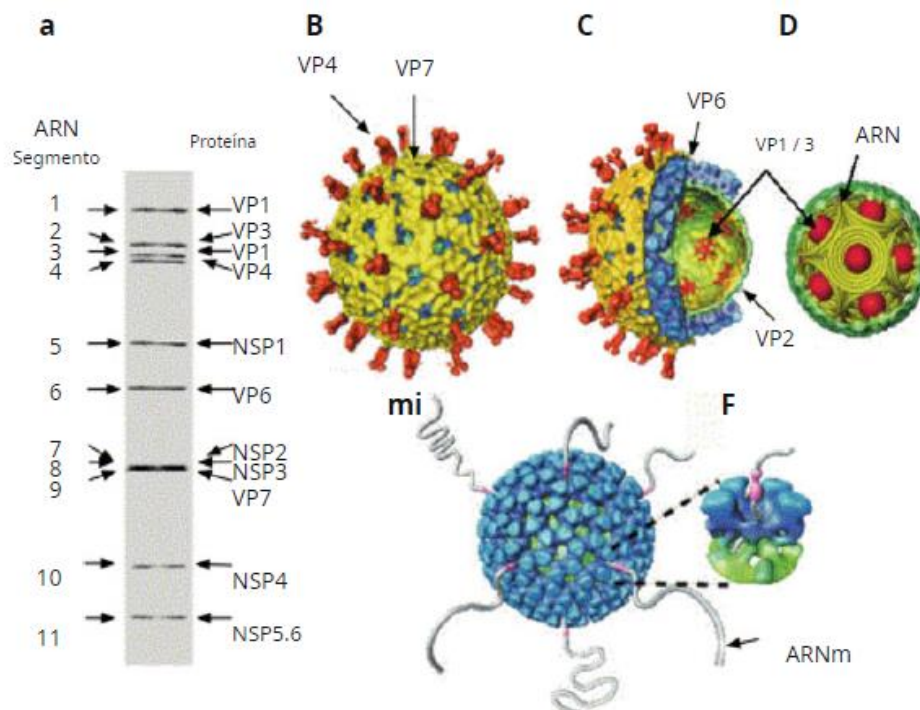


Figura 1. Características arquitectónicas del rotavirus. (a) Gel PAGE que muestra 11 segmentos de dsRNA que componen el genoma del rotavirus. Los segmentos de genes están numerados en la izquierda y las proteínas que codifican se indican en la derecha. (B) Reconstrucción crio-EM de la partícula de triple capa de rotavirus. Las proteínas de la espícula VP4 están coloreadas en naranja y la capa más externa de VP7 en amarillo. (C) Una vista en corte del TLP de rotavirus que muestra las capas de VP6 interno (azul) y VP2 (verde) y las enzimas transcripcionales (mostradas en rojo) ancladas a la capa VP2 en los cinco ejes. (D) Representación esquemática de la organización del genoma en

rotavirus. Los segmentos del genoma se representan como espirales cónicas invertidas que rodean las enzimas de transcripción (mostradas como bolas rojas) dentro de la capa VP2 en verde. (F) Modelo de reconstrucción crio-EM de transcripción de DLP. (Buesa y Rodríguez-Díaz, 2016).

VP7 es una glicoproteína que determina el antígeno de tipo G, mientras que VP4 es una proteína sensible a la proteasa que determina el antígeno de tipo P. La clasificación común de los rotavirus involucra la composición de su genoma y su reactividad serológica, por lo que la comunidad científica utiliza las proteínas VP7, VP4 y VP6 para clasificarlos.

Los rotavirus se clasifican en 7 grupos (A a G) según la reactividad inmunológica de la VP6 (proteína viral de capa media). Los rotavirus de los grupos A a C se han aislado de humanos, pero el más prevalente es el grupo A. Las dos proteínas de la cápside externa, VP7 y VP4 (Figura 2), se utilizan para clasificar los rotavirus en los tipos G y P (genotipos y/o serotipos).

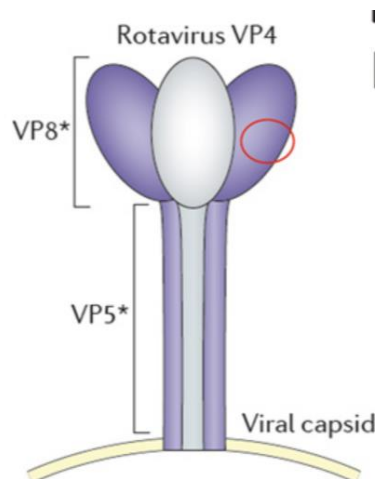


Figura 2. El esquema representa la proteína VP4 de la cápside externa del rotavirus, que se compone de VP5* y VP8*. La proteína es un trímero, pero solo dos de los tres monómeros son visibles en algunas estructuras y, por lo tanto, el tercer monómero se representa en gris. La subunidad VP8* se une a los glicanos (el sitio de unión se indica con un círculo rojo), mientras que la subunidad VP5* facilita la penetración en la membrana (Stencel-Baerenwald, 2014).

Hoy en día se han descrito más de 36 genotipos G diferentes y 51 genotipos P (Figura 3). La proteína de la espícula VP4 se procesa por escisión proteolítica en dos subunidades, VP5* y VP8* (Figura 4). VP8* está implicado principalmente en el proceso de unión virus-célula, mientras que VP5* está implicado en la translocación del virus al citoplasma de las células huésped (Vila-Vicent *et al.*, 2020).

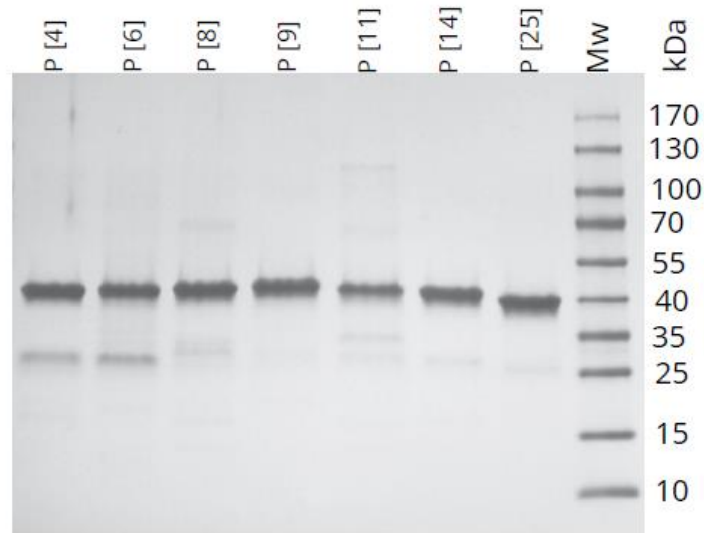


Figura 3. Gel SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie que muestra las diferentes proteínas GST+VP8*. El genotipo de cada una de las proteínas se indica en la parte superior del gel. Los pesos moleculares (kDa) del marcador (Mw) se indican a la derecha del gel (Vila-Vicent *et al.*, 2020).

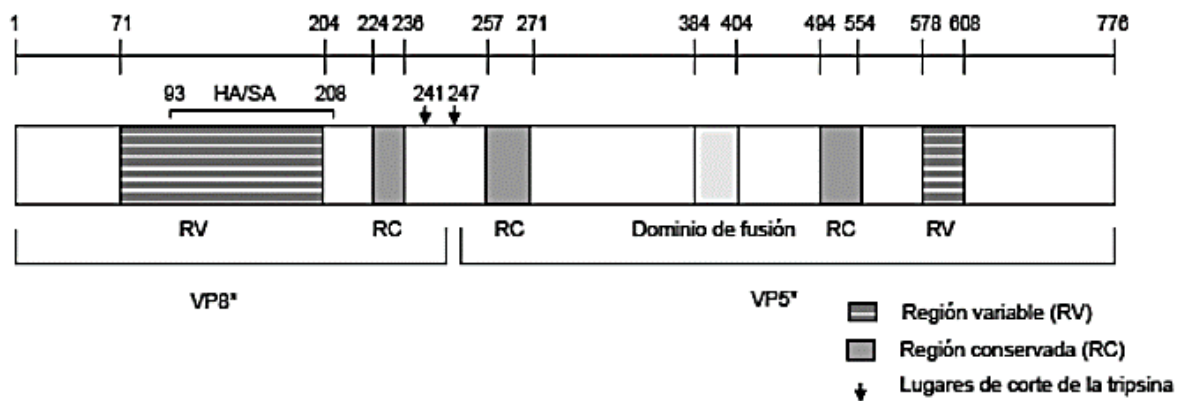


Figura 4. Representación esquemática de la proteína VP4 de rotavirus. Regiones variables y conservadas de la proteína y lugares de corte por tripsina (VP5* y VP8*) (Téllez, 2013).

Para el desarrollo de vacunas frente al rotavirus, es necesario contar con una base de conocimientos sobre la epidemiología de los serotipos/genotipos G y P (Tabla 1) del rotavirus en todo el mundo. Según un estudio realizado con 45.571 cepas recolectadas globalmente de 124 estudios informados en 52 países en cinco continentes publicados entre 1989 y 2004, cuatro tipos G comunes (G1, G2, G3 y G4) junto con P[8] o P[4] representaron más del 88% de las cepas analizadas en todo el mundo (Santos y Hoshino, 2005). La prevalencia de los diferentes genotipos de rotavirus varía entre áreas geográficas (Iturriza-Gomara *et al.*, 2000). Un estudio realizado el 2011 en Europa central y oriental, reveló que tres combinaciones de genotipos, G1P[8], G4P[8] y G2P[4], estaban presentes en todos los países para los que se disponía de datos completos de genotipado (Ogilvie *et al.*, 2011).

Tabla 1. Seroprevalencia de proteínas anti-rotavirus VP8* en adultos y niños en Valencia, España. Los niveles de significación se indican para cada genotipo. $P < 0,05$ se considera estadísticamente significativo (*) (Vila-Vicent *et al.*, 2020).

VP8* Genotipo	Adultos	Niños	Prueba de X ²
P[4]	26/47 (56%)	33/41 (80%)	P = 0,01
P[6]	32/47 (68%)	28/41 (68%)	P = 0,98
P[8]	23/47 (49%)	29/41 (70%)	P = 0,04
P[9]	16/47 (34%)	22/41 (53%)	P = 0,06
P[11]	0/47 (0%)	11/41 (27%)	P = 0,0006
P[14]	27/47 (57%)	18/41 (44%)	P = 0,2
P[25]	14/47 (30%)	20/41 (49%)	P = 0,06
Cualquier genotipo	46/47 (98%)	36/41 (88%)	P = 0,6

Hasta el momento se han descrito 24 genotipos P en relación con la proteína VP4, siendo los más frecuentes los genotipos P[4], P[6] y P[8] y aunque cabría pensar que los genotipos G y P son independientes, existen asociaciones que se repiten con mayor frecuencia, como son G1, G3 y G4 con el genotipo P[8] y el G2 con el P[4] (Téllez, 2013).

Estos genotipados se pueden realizar mediante una amplia variedad de métodos moleculares, principalmente basados en PCR de transcripción inversa para el genotipado rápido, específico y sensible de los rotavirus (Mousavi-Nasab *et al.*, 2020).

Debido al genoma segmentado, el rotavirus muestra una enorme diversidad genética que conduce a la evolución de nuevos genotipos que pueden influir en la eficacia de las vacunas actuales. La necesidad actual es un programa global de vigilancia de RV para monitorear la prevalencia y la variabilidad antigénica de nuevos genotipos para formular la planificación futura del desarrollo de vacunas (Sadiq *et al.*, 2018).

Cuatro vacunas contra el rotavirus (RotarixTM, RotaTeqTM, RotavacTM ROTASIIL) han sido precalificadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), pero las dos vacunas recién precalificadas (RotavacTM ROTASIIL) actualmente solo se usan en Palestina e India, respectivamente. En 2009, la OMS propuso que las vacunas contra el rotavirus se incluyeran en el programa de vacunación de rutina de todos los países del mundo. (Sadiq *et al.*, 2022)

Las vacunas más utilizadas son Rotarix, que es una vacuna monovalente compuesta por una sola cepa humana G1P[8] y RotaTeq, que es una vacuna recombinante humano-bovina pentavalente que comprende G1P[5], G2P[5], G3P[5], cepas G4P[5] y G6P[8]. Rotasiil y Rotavac se utilizan principalmente en la India. Rotasiil es una vacuna recombinante humano-bovina pentavalente

compuesta por G1P[5], G2P[5], G3P[5], G4P[5] y G9[5]. Rotavac es una vacuna monovalente compuesta por una cepa recombinante G9P[11] natural (Donato y Bines, 2021).

RotaTeq ha sido aprobada para su uso desde 2006 y se administra en tres dosis a los 2 meses, 4 meses y 6 meses de edad. Por su parte, Rotarix ha sido aprobada para su uso desde 2008 y se administra en dos dosis a los 2 y 4 meses de edad. Ambas vacunas se administran vía oral. La primera dosis debe administrarse antes de las 15 semanas y deben recibir todas las dosis antes de cumplir los 8 meses. Por otra parte, RotaTeq demostró una protección del 98% contra la gastroenteritis grave por rotavirus. Rotarix mostró una protección del 85-96% contra la gastroenteritis grave por rotavirus (CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION).

Los estudios de seroprevalencia se realizan sobre una muestra de población con el fin de investigar el nivel y distribución de la inmunidad inducida por infección natural de determinados agentes infecciosos o por vacunación frente a los mismos (Limia *et al.*, 2019).

Según el Diccionario de cáncer del NCI, la seroprevalencia es el *porcentaje de personas en una población que tienen unas proteínas en la sangre, llamadas anticuerpos, que indican que han estado expuestas a un virus u otro tipo de organismo infeccioso. Por ejemplo, al estudiar la seroprevalencia de anticuerpos contra un virus específico se puede determinar la cantidad de personas que ese virus ha infectado* (INSTITUTO NACIONAL DEL CÁNCER).

El éxito de la vacunación se debe al uso de productos altamente efectivos y seguros, pero también al buen funcionamiento de los sistemas de vigilancia y estudios epidemiológicos realizados, como los estudios de seroprevalencia, los cuales proporcionan información precisa sobre la distribución, frecuencia y dinámica de las enfermedades transmisibles (Limia y Olmedo, 2021).

En la búsqueda de nuevos conocimientos en el campo del rotavirus A, se ha prestado una atención significativa al genotipo P[8], el cual ha demostrado ser el más predominante. Los estudios actuales se han centrado en este genotipo, explorando sus linajes y determinando sus prevalencias. No obstante, un aspecto sorprendente es la falta de información sobre el genotipo P[4]. Es en este contexto se enmarca este trabajo de fin de grado, el cual tiene como objetivo avanzar y ampliar nuestros conocimientos actuales sobre el genotipo P[4] del rotavirus A.

2. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo fin de grado es estudiar la seroprevalencia de los diferentes linajes del genotipo [P4] dentro de la población de cara al desarrollo optimizado de vacunas. Para ello, se han establecido los siguientes objetivos parciales:

- Producir las proteínas VP8* de los diferentes linajes del genotipo P[4] del rotavirus A mediante expresión en *E. coli*.
- Estudiar la seroprevalencia de los linajes del genotipo P[4] mediante ensayos inmunológicos tipo ELISA con sueros humanos para determinar la presencia de anticuerpos contra los linajes del genotipo P[4].
- Contribuir al desarrollo de vacunas más efectivas contra el rotavirus A, proponiendo mejoras en la formulación de la vacuna a través de la inclusión de los linajes más prevalentes y reactivos.

Los objetivos se alinean con un grado de relación alto con varios Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) encontrados en el Anexo I:

- ODS 3 - Salud y bienestar: El TFG aborda el problema de los Rotavirus, que son una causa importante de gastroenteritis vírica aguda en lactantes y niños pequeños en países en desarrollo. Al estudiar la seroprevalencia de diferentes linajes de Rotavirus y evaluar la respuesta inmunológica mediante ELISA, se contribuye a comprender la epidemiología de la enfermedad y facilitar el desarrollo optimizado de vacunas más efectivas.
- ODS 4 - Educación de calidad: El TFG implica una investigación científica en el campo de la biotecnología y la inmunología. Al llevar a cabo el clonaje, expresión y purificación de la proteína VP8* de los diferentes linajes de Rotavirus, he adquirido conocimientos técnicos y habilidades en laboratorio. Además, al compartir los resultados obtenidos en el trabajo, se contribuye a la difusión del conocimiento científico y al avance de la educación en el campo de la salud.
- ODS 9 - Industria, innovación e infraestructura: El TFG implica técnicas avanzadas de biotecnología, como el clonaje y la expresión de proteínas. Estos avances tecnológicos son fundamentales para la investigación y generación de información relevante que pueda utilizarse para mejorar las estrategias de vacunación y reducir la carga de enfermedad asociada con estos virus.

3. Materiales y métodos

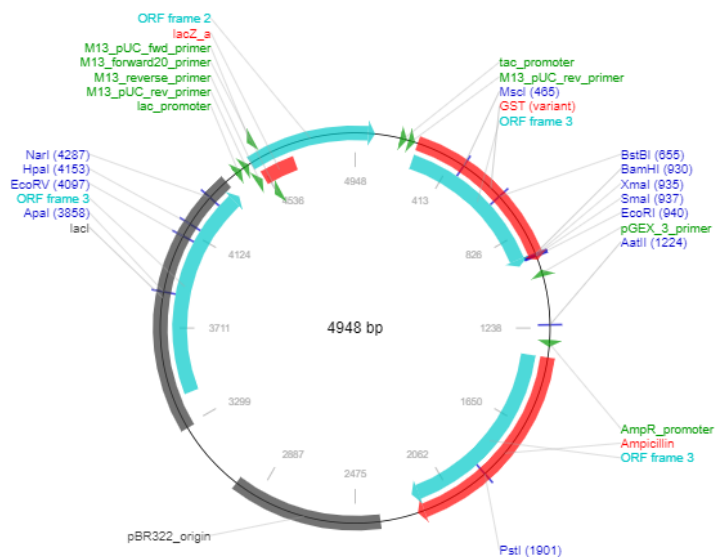
3.1. Clonaje de la proteína VP8* del genotipo P[4].

En esta sección se describe el proceso de clonación de la secuencia correspondiente a los linajes I, II, III y IV de la proteína VP8* del genotipo P[4]. Debido a la falta de muestras clínicas de rotavirus de este genotipo para amplificar por PCR, se utilizó un gen sintético adquirido a la empresa Genearth de Thermo Fischer Scientific. Los linajes se obtuvieron en el plásmido pMX, que contiene la secuencia que codifica para la proteína VP8* flanqueada por la secuencia de corte para *Bam*HI y *Sma*I, que posteriormente se introduce en el plásmido pGEX-2T como vector de expresión.

El primer paso consistió en la transformación del plásmido pMX en las células TOP 10 de *Escherichia coli* (*E. coli*) (Invitrogen) para aumentar la cantidad de plásmido y permitir su posterior digestión. La transformación se realizó pipeteando 2 μ L (100 ng) de plásmido (50 ng/ μ L) en las células TOP 10, seguida de incubación en hielo durante 15 minutos, 1 minuto a 42 °C en un termobloque y finalmente 5 minutos en un baño de hielo. Las células transformadas (50 μ L) se sembraron en placas Petri conteniendo agar LB y ampicilina (100 μ g/mL), y se incubaron durante la noche a 37 °C. A continuación, se seleccionaron las colonias que crecieron en presencia de ampicilina, lo cual indicaba que habían incorporado el plásmido. Con el fin de obtener muestras adicionales para uso futuro, se realizó un glicerinado del plásmido pMX. Para ello, se inocularon cuatro tubos Falcon de 15 mL con 5 mL de medio LB-amp y los respectivos linajes, y se incubaron durante la noche a 37 °C y 250 rpm. Posteriormente, se reservaron 800 μ L de cada cultivo, se añadió glicerol hasta alcanzar una concentración del 15% y se almacenaron a -80 °C.

En la Figura 5 se muestra el mapa del plásmido pGEX-2T, que contiene una secuencia que codifica para GST y servirá como vector de expresión para obtener la proteína de fusión GST:VP8*.

Figura 5. Mapa del plásmido pGEX-2T. El plásmido pGEX-2T ha sido diseñado para contener una secuencia que codifica para la proteína GST (glutación S-transferasa). Esta construcción permite la obtención posterior de una proteína de fusión GST:VP8*, la cual facilita la purificación mediante el uso de una columna GSTrap. El plásmido incluye en su secuencia un gen de resistencia al antibiótico ampicilina.



Una vez obtenidos los plásmidos pMX y pGEX-2T, se realizó una miniprep siguiendo el protocolo NucleoSpin Plasmid/Plasmid (Macherey Nagel) para extraer el ADN plasmídico (Figura 6).

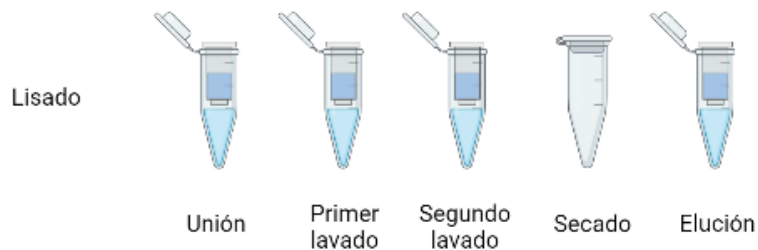


Figura 6: Protocolo NucleoSpin Plasmid: Kit de extracción de ADN plasmídico. Las bacterias sedimentadas se resuspendieron en tampón A1, seguido de la liberación del ADN plasmídico de las células huésped de *E. coli* mediante SDS/lisis alcalina en tampón A2. El tampón A3 neutralizó el lisado resultante y creó las condiciones adecuadas para la unión del ADN plasmídico a la membrana de sílice de la columna. Posteriormente, la proteína precipitada, el ADN genómico y los restos celulares se sedimentaron mediante centrifugación. El sobrenadante se cargó en otra columna. Utilizando el kit NucleoSpin Plasmid/Plasmid (NoLid), se eliminaron las sales, metabolitos y componentes celulares macromoleculares solubles mediante un lavado con el Tampón A4, que contiene etanol. Finalmente, el ADN plasmídico purificado se eluyó en condiciones de baja fuerza iónica utilizando un tampón AE ligeramente alcalino (Tris/HCl 5 mM, pH 8,5).

3.2. Digestión y ligación del inserto con el plásmido pGEX-2T.

Una vez obtenidos los plásmidos, se procedió a la digestión utilizando las enzimas de restricción *BamHI* y *SmaI* (Thermo Fischer Scientific). Debido a las diferencias en las temperaturas de actuación de cada enzima, se realizó la digestión por separado. Primero, se llevó a cabo la digestión con *SmaI* (CCC[^]GGG), generando extremos romos en los plásmidos pGEX-2T y pMX. Se utilizó 20 µL de ADN, 2,5 µL de buffer Tango 10X y 2,5 µL de enzima *SmaI*, y la reacción se incubó durante toda la noche a 25 °C. Una vez finalizada la digestión, se procedió a la purificación utilizando el protocolo NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up (Macherey Nagel) (Figura 7) y el ADN se eluyó con 20 µL de agua.

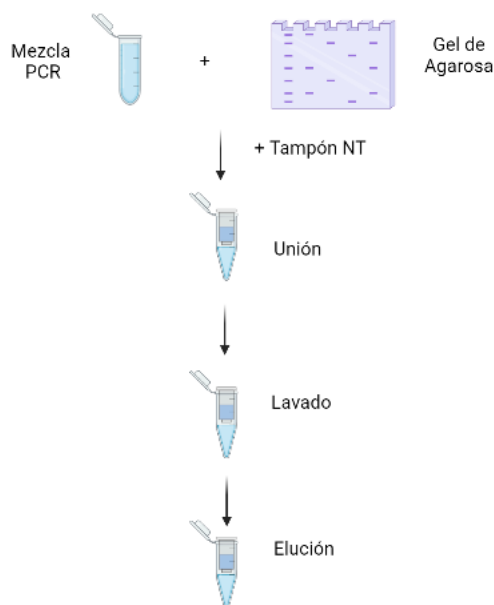


Figura 7: Protocolo NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up. El kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up permite la purificación de fragmentos de ADN de reacciones enzimáticas, como PCR, así como de geles de agarosa. La muestra se mezcló con Binding Buffer NTI y, en el caso de una banda de gel recortada, se calentó para disolver la agarosa. Mediante el uso de una columna de limpieza de PCR y gel NucleoSpin, el ADN se unió a la membrana de sílice en presencia de sal caotrópica. Las impurezas se eliminaron mediante lavados con Wash Buffer NT3 etanólico. Finalmente, el ADN puro se eluyó en condiciones de baja salinidad utilizando Elution Buffer NE ligeramente alcalino (5 mM Tris/HCl, pH 8,5).

Posteriormente, se llevó a cabo la digestión del ADN plasmídico con la enzima de restricción *Bam*HI, generando extremos cohesivos (G^ATATCC). Para ello, se utilizó una muestra de 20 µL de ADN, 2,5 µL de buffer de digestión *Bam*HI 10X y 2,5 µL de la enzima *Bam*HI, y se incubó durante toda la noche a 37 °C. Una vez completada la digestión del plásmido pMX con la enzima *Bam*HI, se procedió a la separación del inserto del resto del plásmido mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. La muestra cargada en el gel consistió en 20 µL de ADN plasmídico y 4,0 µL de tampón de carga 6X. En el caso del plásmido pGEX-2T, se realizó nuevamente la purificación utilizando el protocolo NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up, debido a que el fragmento resultante de la digestión tenía una longitud de aproximadamente 6 pb y no fue retenido en el proceso de purificación. Una vez que se localizó la banda correspondiente al inserto en el gel de agarosa, se extrajo mediante corte del fragmento de interés y se siguió el protocolo NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up. Posteriormente, la concentración de ADN se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm utilizando el Nanodrop (Thermo Fischer Scientific).

3.3. Transformación del plásmido pGEX-2T en la cepa TOP10 de *E. coli*.

En esta etapa, la ligación del inserto resultante se llevó a cabo con el plásmido pGEX-2T. Se utilizó una relación 3:1 a favor del inserto para aumentar la eficiencia del proceso. Se prepararon dos viales Eppendorf, cada uno con 2,0 µL de tampón de carga (5x Rapid Ligation Buffer), 1,0 µL de enzima T4 DNA ligasa (Thermo Fisher Scientific), 1 µL del nuevo vector y 6 µL del inserto correspondiente a cada linaje. La reacción se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente.

Posteriormente, se procedió a la transformación de las células con el plásmido pGEX-2T que codifica la proteína de fusión GST:VP8*, utilizando el método de choque térmico. Se etiquetaron cuatro viales Eppendorf, uno para cada linaje, y se añadieron 5,0 µL de plásmido y 25 µL de células competentes TOP10 de *E. coli*. Los viales se incubaron en hielo durante 30 minutos, luego se colocaron durante 1 minuto en un termobloque a 42 °C y finalmente se devolvieron al hielo durante 5 minutos. Transcurrida la incubación, las células se resuspendieron en 1,0 mL de medio SOC estéril para asegurar una alta eficiencia de transformación de *E. coli*. La suspensión celular se incubó a 37 °C con agitación en un termobloque durante 20 minutos para favorecer la transformación. A continuación, se sembraron 100 µL de la suspensión en placas Petri con LB ampicilina y se incubaron durante toda la noche para permitir el crecimiento de las colonias que incorporaron el plásmido con el inserto que codifica para la proteína de fusión.

Después de la incubación y la visualización de las colonias en las placas Petri, se seleccionaron 6 colonias de cada linaje y se realizó una PCR de colonias para identificar aquellas que incorporaron el inserto. Se preparó una mezcla master mix para la PCR con un volumen final de 500 µL, que incluía 100 µL de tampón 10x, 30 µL de primer pGEX2t_forward, 30 µL de primer pGEX2t_reverse, 20 µL de dNTPs (10 mM), 10 µL de Taq pol y 810 µL de agua miliQ. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 1) 5 min a 95 °C; 2) 30 s a 95 °C; 3) 30 s a 60 °C; 4) 1 min a 72 °C; 5) 30 ciclos (pasos 2-4); 6) 10 min a 72 °C.

Para la selección y marcado de colonias transformadas, se utilizaron 6 tubos de PCR para cada linaje de interés. En cada vial se agregó un total de 25 µL de Master Mix. En cada uno de los tubos, se inoculó una colonia obtenida a partir de la transformación, la cual posteriormente sería lisada durante el proceso de PCR para liberar el ADN plasmídico que serviría como molde. La placa original resultante de la transformación fue marcada con los números correspondientes a las colonias seleccionadas, lo que permitió identificar la ubicación de cada colonia en la placa tras la selección de clones positivos. Después de realizar la PCR con las colonias seleccionadas, se procedió a analizar los resultados mediante un gel de agarosa al 1,5%. Las muestras cargadas en el gel consistieron en el contenido del vial de PCR anterior (25 µL) y 5,0 µL de tampón de carga. A través de la observación de las bandas amplificadas en la PCR, fue posible deducir si el inserto de interés se había introducido correctamente en el vector, ya que los primers utilizados flanqueaban el sitio de clonaje. La presencia de una banda de aproximadamente 100 pb indicaba la ausencia del inserto de interés, mientras que la presencia de un

fragmento de aproximadamente 600 pb confirmaba que el inserto de interés se había clonado adecuadamente.

Las colonias positivas seleccionadas se inocularon en medio de cultivo LB con ampicilina y se dejaron incubar toda la noche a 37 °C. Posteriormente, se realizó una miniprep para extraer los plásmidos, los cuales fueron enviados al servicio de secuenciación del Centro de Investigación Príncipe Felipe para garantizar la correcta secuencia del inserto. Una vez confirmada la secuencia, estos plásmidos se transformaron en la cepa BL21 (Thermo Fischer Scientific) de *E. coli* para la expresión eficiente de las proteínas. Esto permitió que el vector de expresión generara la proteína de fusión de interés, GST:VP8*, siendo la presencia de GST útil para la purificación posterior mediante afinidad al glutatión y ayudando al correcto plegamiento de VP8*. Tras la incubación, se realizó un glicerinado al 15%.

3.4. Transformación en la cepa BL21 de *E. coli* para la expresión de las proteínas.

La transformación se llevó a cabo utilizando células de la cepa BL21 de *E. coli* y el plásmido anteriormente generado para cada linaje como vector de expresión. El proceso de transformación se realizó siguiendo los siguientes pasos: las células se incubaron en hielo durante 30 minutos, luego se transfirieron a un termobloque a 42 °C durante 1 minuto, y se volvieron a incubar en hielo durante 5 minutos. Para mejorar la eficiencia de la transformación, se añadió 1,0 mL de la disolución SOC estéril y se mantuvo a 37 °C con agitación. Posteriormente, se centrifugó el cultivo durante 2 minutos a 10.000 g en una microcentrífuga refrigerada, se eliminó la mayor parte del sobrenadante y se resuspendió el pellet resultante, el cual se sembró en una nueva placa de agar LB con ampicilina.

Para cada linaje, se prepararon 2 matraces de 2xYT con un volumen de 1 L cada uno. A cada matraz se añadió 1,0 mL de ampicilina. A continuación, se agregaron 5,0 mL de la cepa VP8* correspondiente al linaje con el que se estaba trabajando. Se tomó una muestra al comienzo, que sirvió como referencia para comparar las medidas de densidad óptica a 600 nm en un tiempo determinado. Cuando la densidad óptica alcanzó un valor de 0,6-0,9 OD, indicando que las células se encontraban en fase exponencial de crecimiento, se añadió IPTG (Thermo Fischer Scientific) hasta alcanzar una concentración final de 0,25 mM. Esto permitió inducir la expresión de la proteína al activar el promotor del operón lac, y la temperatura se redujo a 20-25 °C para evitar problemas de plegamiento incorrecto debido a una producción excesiva. La incubación se llevó a cabo durante 16 horas a 250 rpm. Este procedimiento se repitió para cada linaje de la proteína VP8* del genotipo P[4].

Para la purificación de la proteína de fusión GST:VP8* de los linajes I-IV de la proteína VP8* del genotipo P[4], los cultivos fueron centrifugados durante 12 minutos a 6.500 rpm a 4 °C utilizando el rotor R7A en una centrífuga Himac CR30nx. Tras desechar el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 10 mL de tampón de lisis compuesto por 50 mg de lisozima (1,0 mg/mL), 20 µL de DNasa I y enrasado hasta 50 mL con PBS. A continuación, se añadieron 250 µL del inhibidor de proteasas fluoruro de fenilmetilsulfonilo (1,0 mM) y se incubó a temperatura ambiente en una placa en movimiento durante

30 minutos. Luego, se realizaron sonicaciones durante 10 minutos en pulsos de 30 segundos con una amplitud del 60%. Finalmente, las soluciones se centrifugaron durante 40 minutos a 16.000 rpm y 4 °C, recogiendo el sobrenadante de los tubos en un vaso de precipitados.

3.5. Purificación de la proteína VP8*

El procedimiento de purificación de las proteínas VP8* de los linajes en estudio comprendió varias etapas: purificación de la proteína de fusión GST:VP8*, desalado, digestión de la proteína de fusión con trombina y eliminación de la etiqueta GST.

En primer lugar, se llevó a cabo la purificación de las proteínas de fusión GST:VP8* mediante cromatografía de afinidad. Utilizando el equipo ÄKTAprime plus y la columna GSTrap se aplicó un flujo de 0,7 mL/min. La elución de la proteína se realizó mediante una disolución de glutatión 10 mM en tampón Tris-HCL 50 mM pH 8 (7,0 mL). Cuando se detectó la señal correspondiente al glutatión, se detuvo la bomba del equipo durante 5 minutos para permitir que el glutatión interactuara con la proteína GST:VP8*. Se recolectaron fracciones de 1,4 mL a un flujo de 1.0 mL/min. Mediante el análisis de la conductividad y la absorbancia, se identificaron las fracciones que contenían la proteína de interés.

A continuación, se procedió al desalado mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Se reemplazó la columna GSTrap por una columna Hi-Trap para intercambiar el tampón de la muestra de interés. El flujo utilizado fue de 1 mL/min. La proteína purificada se almacenó en tubos de 15 mL congelados para su posterior análisis.

Para realizar la digestión de la proteína de fusión GST:VP8* con trombina y alcanzar una concentración final de 1.0 mg/mL, se prepararon cuatro viales Eppendorf, uno para cada linaje. En cada vial se agregaron 15 µL de trombina (15 unidades) junto con 1,5 mg de proteína. Los viales Eppendorf se incubaron a 37 °C y 91 rpm durante 16 horas. Para confirmar la correcta digestión de la proteína, se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida. El gel se cargó con 5,0 µL de marcador de peso molecular, 5,0 µL de cada linaje de proteína sin digerir y 20 µL de cada linaje de proteína digerida (4,0 µL de proteína + 10 µL de TC + 6,0 µL de PBS). La presencia de dos bandas indicó una digestión exitosa: una banda de 25 kDa correspondiente a la GST y una banda de 18 kDa correspondiente a la proteína.

Posteriormente, se procedió a la purificación de la proteína VP8* eliminando la etiqueta GST mediante el equipo ÄKTAprime plus. De esta manera, se obtuvo la proteína VP8* purificada y digerida en el eluido, es decir, en la fracción que no interactuó con la columna GSTrap. Con el fin de verificar la pureza de esta proteína, se realizó un gel de poliacrilamida. En el primer carril del gel se cargaron 5,0 µL de marcador de pesos moleculares, seguido de los cuatro carriles correspondientes a los linajes resultantes de VP8*. La concentración de proteína se determinó utilizando el equipo Nanodrop, midiendo la absorbancia a 280 nm.

3.6. Estudio de reactividad. Análisis de sueros humanos.

El estudio de reactividad se llevó a cabo mediante ensayos ELISA en placa utilizando 102 sueros de diferentes pacientes clínicos con patologías no asociadas. En primer lugar, las placas se tapizaron con la proteína VP8* de cada linaje a una concentración final de 1,0 µg/mL en tampón 50 mM carbonato/bicarbonato, pH 9,6, y se dejaron incubar durante 16 h a 4 °C. A continuación, el exceso de antígeno se eliminó mediante un lavado con PBST (200 µL/pocillo). Posteriormente, a cada pocillo se añadieron 200 µL de una disolución al 3% de BSA (p/v) en PBS para evitar uniones inespecíficas. Esta etapa de bloqueo transcurrió a 37 °C. Después de una hora, la placa se lavó de nuevo con PBS-T, y a continuación se añadieron los diferentes sueros diluidos (1/500) en PBS-T con BSA al 1% (p/v). Las muestras se incubaron durante una hora a 37 °C. A continuación, se realizaron 3 lavados con PBS-T como anteriormente y se añadió el anticuerpo secundario marcado con HRP a una dilución de 1:5.000 en PBST, y se incubó durante una hora a 37 °C. De nuevo, la placa se lavó tres veces con 200 µL de PBS-T/pocillo antes de añadir el sustrato enzimático (OPD; 100 µL/pocillo). Transcurridos 10 min, la reacción enzimática se paralizó añadiendo 50 µL/pocillo de H₂SO₄ 3M. La absorbancia a 490 nm se midió utilizando un lector de placas (Multiskan, Thermo Fischer).

4. Resultados

4.1. Clonaje de la proteína VP8*

En el estudio realizado, se procedió a la digestión del plásmido pMX para cada linaje de la proteína VP8* siguiendo el protocolo descrito en materiales y métodos. Es importante destacar que el proceso de digestión es ampliamente utilizado y permite separar y analizar los fragmentos de ADN presentes en el plásmido, lo que es esencial para la clonación de secuencias de interés. Así pues, este proceso es fundamental para fragmentar el plásmido pMX. Como se muestra en la Figura 8, la digestión se realizó correctamente. El análisis de las bandas en el gel reveló la presencia de dos componentes principales en el ADN plasmídico. La primera banda correspondía a un fragmento de aproximadamente 2.000 pares de bases (pb), que representa la secuencia del propio plásmido. La segunda banda, de alrededor de 500 pb, correspondía al inserto específico de interés que se había insertado en el plásmido pMX. Así, la presencia de estas bandas proporciona una evidencia visual clara de que el proceso de digestión transcurrió según lo esperado.

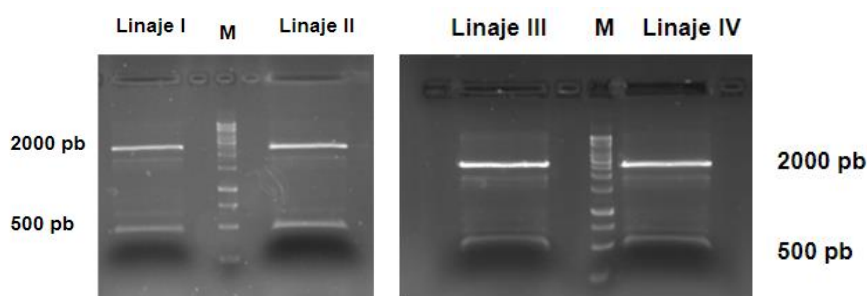


Figura 8. Resultados de la digestión del plásmido pMX con las enzimas *Bam*HI y *Sma*I. M (Marker 1 Kb ladder - Biotools). En los carriles correspondientes a los cuatro linajes, se pueden observar dos bandas; la banda de 2.000 pb corresponde al plásmido en sí, mientras que la banda de 500 pb corresponde al inserto que codifica para la proteína VP8*.

Tras realizar la digestión del plásmido pMX utilizando las enzimas *Bam*HI y *Sma*I, se procedió a cuantificar el ADN obtenido. Los resultados de la cuantificación mostraron las siguientes concentraciones para cada linaje: 23,1 ng/μL para el linaje I, 16,6 ng/μL para el linaje II, 17,8 ng/μL para el linaje III y 19,3 ng/μL para el linaje IV.

Posteriormente, se llevó a cabo una PCR utilizando 6 colonias de cada linaje de la proteína VP8* para identificar las colonias positivas. Las muestras de PCR fueron analizadas mediante un gel de agarosa al 1,5% (Figura 9), siguiendo el procedimiento detallado en los materiales y métodos. Este análisis permitió determinar qué colonias presentaban el fragmento de interés. En base a estos resultados, se seleccionaron las colonias 3, 1, 2 y 1 para los linajes I, II, III y IV, respectivamente.

Tras la selección de las colonias positivas, se procedió a inoculación en medio LB con ampicilina y se incubaron durante toda la noche. A continuación, se llevó a cabo una miniprep para obtener los plásmidos pGEX-2T con el inserto que codifica para la proteína de fusión GST:VP8*. Estos plásmidos fueron enviados al servicio de secuenciación del Centro de Investigación Príncipe Felipe para obtener sus secuencias correspondientes.

Los resultados de la secuenciación revelaron las secuencias obtenidas para los linajes I al IV de la proteína VP8* del genotipo P[4] (Figura 10). Estas secuencias proporcionan información detallada sobre la composición genética de las proteínas de interés en cada linaje, lo que resulta fundamental para el posterior análisis y estudio de las características funcionales de dichas proteínas.

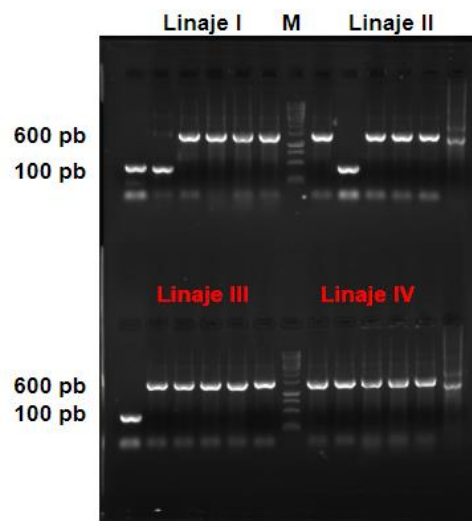


Figura 9. Resultados de la PCR de colonias. M (Marker 100 bp ladder - Biotools). En la figura se muestran los resultados de cada linaje. Se observan bandas de 600 y 100 pb. Las colonias seleccionadas son las que migran hasta la banda correspondiente a 600 pb, lo cual indica que el inserto se ha incorporado correctamente.

>linajel

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQ
SMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAISMLEGAVLDIRYGVSRIAYSKDFETLKVDFLSKLPEMLKMF
DRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIPQIDKYLKSSKYIA
WPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRGSPVLDGPYQPTTFKPPNDYWLLISSNTNGVVYESTNNS
DFWTAVIAVEPHVSQTNRQYILFGENKQFNVENNSDKWKFFEMFKGSSQGFDFSNRRTLSSNRL
VGMLKYGGRVWTFHGETPRATTDSSNTADLNNISIIHSEFYIIPRSQESKCNEYINNGLP*

>linajell

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQ
SMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAISMLEGAVLDIRYGVSRIAYSKDFETLKVDFLSKLPEMLKMF
DRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIPQIDKYLKSSKYIA
WPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRGSPVLDGPYQPTTFKPPNDYWLLISSNTDGVVYESTNNS
DFWTAVIAVEPHVSQTNRQYILFGENKQFNIENNSDKWKFFEMFKGSSQGFDFSNRRTLSSNRL
GMLKYGGRVWTFHGETPRATTDSSNTADLNNISIIHSEFYIIPRSQESKCNEYINNGLP*

>linajelll

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQ
SMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAISMLEGAVLDIRYGVSRIAYSKDFETLKVDFLSKLPEMLKMF
DRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIPQIDKYLKSSKYIA
WPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRGSPVLDGPYQPTTFKPPNDYWLLISSNTDGVVYESTNNS
DFWTAVIAVEPRVSQTNRQYILFGENKQFNIENNSDKWKFFEMFKGSSQGFDFSNRRTLSSNRL
GMLKYGGRVWTFHGETPRATTDSSNTADLNNISIVIHSEFYIIPRSQESKCNEYINNGLP*

>linajelV

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQ
SMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAISMLEGAVLDIRYGVSRIAYSKDFETLKVDFLSKLPEMLKMF
DRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIPQIDKYLKSSKYIA
WPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRGSPVLDGPYQPTTFKPPNDYWLLISSNTDGVVYESTNNS
DFWTAVIAVEPHVSQTNRQYILFGENKQFNIENNSDKWKFFEMFKGSSQGFDFSNRRTLSSNRL
GMLKYGGRVWTFHGETPRATTDSSNTSDLNNISIIHSEFYIIPRSQESKCNEYINNGLP*

Figura 10. Secuencia obtenidas para los linajes del I al IV de la proteína VP8* del genotipo P[4] clonados. En la región amino terminal se encuentra la secuencia de la GST, representando la zona marcada en rojo los últimos aminoácidos de esta. La trombina, utilizada posteriormente para obtener únicamente la VP8*, corta entre la serina y la prolina de esta región, obteniéndose así tras un segundo proceso de purificación, la proteína VP8* separada de la etiqueta GST.

El Anexo II muestra los resultados del proceso de alineamiento de las secuencias realizado para observar diferencias y similitudes entre los diferentes linajes adjunto en el Anexo II. Se puede observar una alta homología entre secuencias, con diferencias en los aminoácidos que ocupan las posiciones 26, 36, 48, 67, 86, 87, 97, 109, 124, 126, 128 y 136,

4.2. Purificación de la proteína VP8*

El proceso de purificación comenzó con la expresión de la proteína de fusión GST:VP8* en la cepa BL21 de *E. coli*, seguido de la centrifugación del cultivo para obtener un *pellet*. Posteriormente, el *pellet* se resuspendió en tampón de lisis y la proteína se purificó, siguiendo el protocolo descrito en el apartado de materiales y métodos. De esta manera, la proteína de fusión GST:VP8* se retuvo en la columna de inmunoafinidad, y luego se eluyó añadiendo glutatión en exceso (Figura 11). La presencia de la proteína GST:VP8* durante el proceso de purificación se evidenció en el cromatograma mediante el pico correspondiente al tiempo de elución 181s, donde se observó un aumento en la absorbancia UV representada por la línea azul.

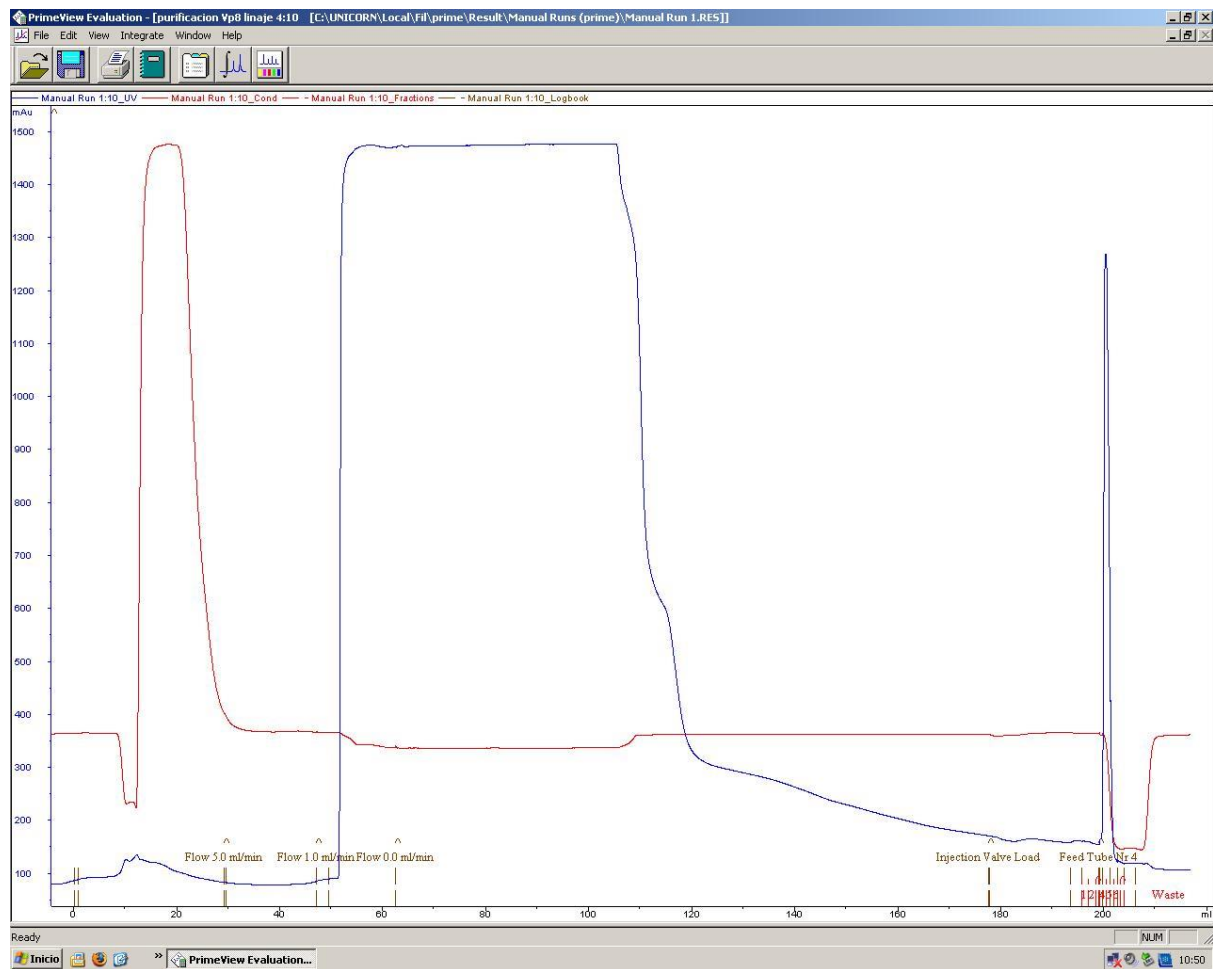


Figura 11. Figura 10. Cromatograma tipo del proceso de purificación de la proteína GST:VP8* en un equipo ÄKTA prime y columna GSTrap. En azul se observa la absorbancia a 280 nm y en rojo la conductividad. El proceso de purificación se inicia con el lavado de la columna con NaOH 0,5 M para eliminar cualquier impureza de la columna (ml 12 al 30), posteriormente se aplica el lisado celular a un flujo de 1,0 ml/min (ml 52 al 102), más tarde se lava la columna con PBS para eliminar las proteínas unidas de forma inespecífica (ml 102 al 195). Finalmente, la proteína GST:VP8* se eluye por competición mediante la aplicación de una disolución de glutatión 10 mM, con lo que la proteína es liberada de la columna (ml 200 al 210).

Tras la purificación se procedió al desalado o cambio de tampón de la disolución que contenía la proteína. La proteína anteriormente purificada se cargó en la columna Hi-Trap, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado de materiales y métodos. Se recolectaron diferentes fracciones de proteína desalada y se generaron los cromatogramas correspondientes a los diferentes linajes (Figura 12).

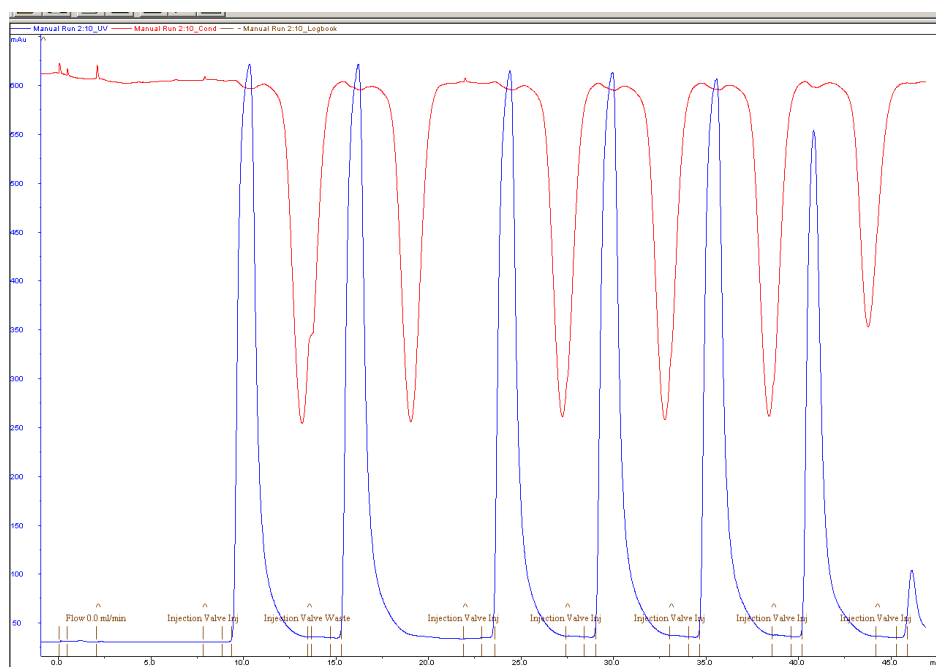


Figura 12. Cromatograma del linaje III de la proteína VP8* tras el proceso de desalado. Cromatograma del linaje III de la proteína VP8* tras el proceso de desalado. Dado que la muestra obtenida es de un volumen mayor del que se puede inyectar, se realiza en varias inyecciones. En este paso se desea separar la proteína VP8* del tampón en el que se encuentra y estabilizarla en PBS, utilizando una columna Hi-Trap. La línea roja representa la conductividad; se puede observar cómo al inyectar la muestra, la conductividad baja. La línea azul representa la absorbancia UV; cada pico azul corresponde al momento en el que la proteína VP8* sale de la columna y se recoge en fracciones. Esta misma proteína es estabilizada en PBS, el cual se suministra al equipo ÄKTAprime plus.

Posteriormente, se llevó a cabo la digestión de las proteínas de fusión GST:VP8* utilizando la enzima trombina. La secuencia de reconocimiento de escisión de la trombina, Leu - Val - Pro - Arg - Gly - Ser, permitió la separación de la proteína VP8* unida a la proteína GST. Previamente a la digestión, se cuantificó la proteína para determinar la cantidad necesaria a digerir. Se obtuvieron concentraciones de 1,36 mg/mL para el linaje I, 2,96 mg/mL para el linaje II, 1,47 mg/mL para el linaje III y 3,88 mg/mL para el linaje IV. Para verificar la correcta realización de la digestión, se realizó un gel de poliacrilamida (Figura 13), donde se pudo observar la proteína antes y después de la digestión con trombina.

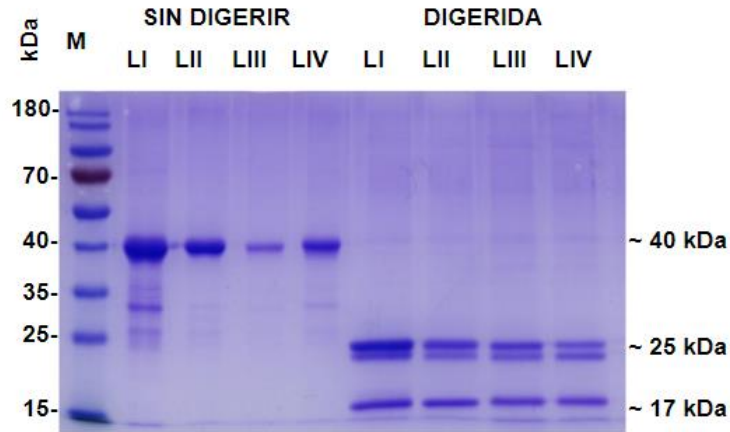


Figura 13. Proteína antes y después de la digestión con trombina. M (Page ruler, ThermoFisher Scientific). En los carriles 2,3,4 y 5 se observan las bandas a 40 kDa correspondientes a las proteínas de fusión GST:VP8* sin digerir con trombina. Por otro lado, en los carriles 6,7,8 y 9 se observan las bandas correspondientes a la proteína digerida; la banda de 25 kDa corresponde a la etiqueta GST y la banda de 17 kDa, a la proteína VP8*.

A continuación, se llevó a cabo la eliminación de la etiqueta GST utilizando nuevamente el equipo ÄKTAprime plus con la columna GSTrap. En este paso, la proteína GST se retuvo en la columna, mientras que el producto digerido, la proteína VP8*, fue recolectada en el paso de columna. Se generaron los cromatogramas correspondientes a los diferentes linajes (Figura 14).

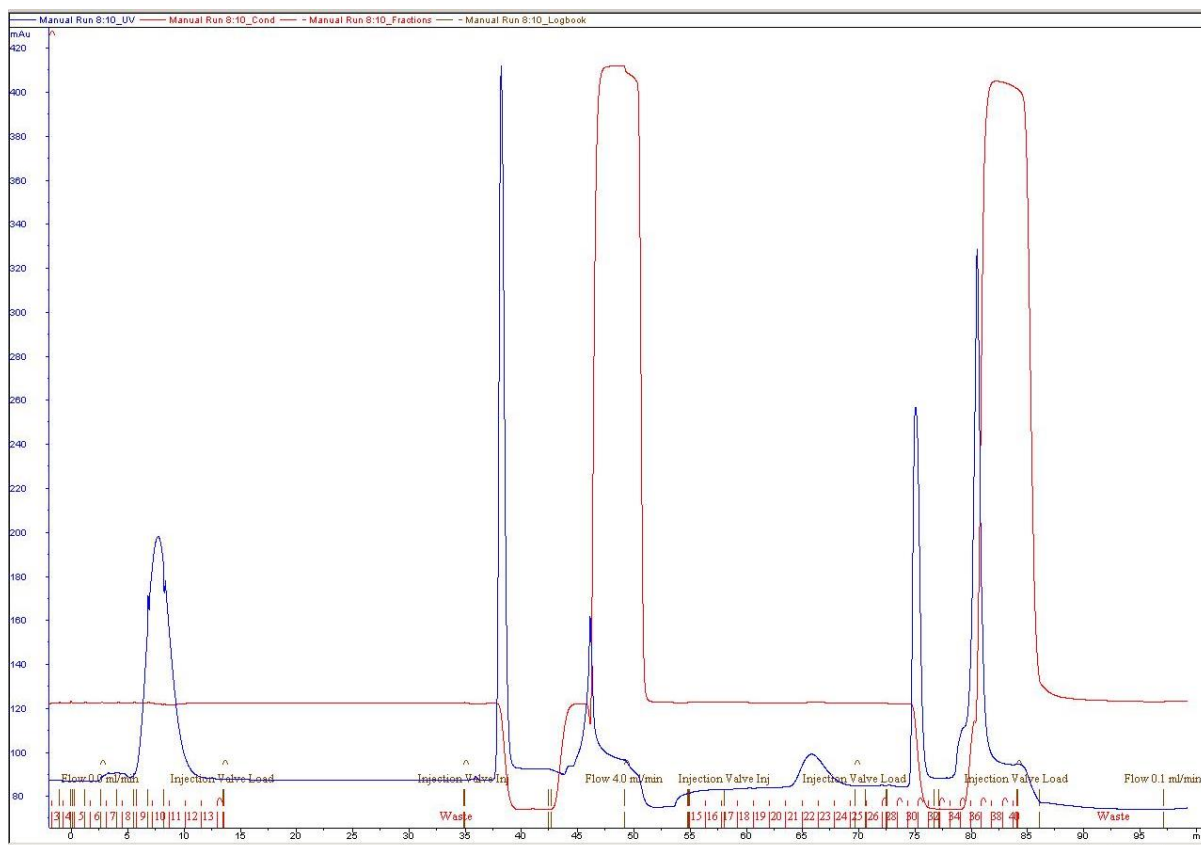


Figura 14. Cromatograma tipo del proceso de purificación de la digestión con trombina de las proteínas GST:VP8* de los linajes I y II en un equipo AKTA prime y columna GSTrap. En azul se observa la absorbancia a 280 nm y en rojo la conductividad. El primer pico (min. 6 al 10) se corresponde con la proteína VP8* ya digerida sin GST que pueda interactuar con la columna, por lo que no se retiene. El segundo pico (min. 37 al 39) se corresponde con la elución por competición mediante glutatión de la proteína GST digerida y aquella proteína de fusión GST:VP8* que no haya sido digerida. Por último, la columna se regenera con NaOH 0,5 M (min. 45 al 52) para eliminar cualquier resto de material previamente a la purificación de la proteína VP8* del siguiente linaje (min. 55 al 87).

Finalmente, se realizó un análisis de SDS-PAGE para verificar la presencia de los diferentes linajes de la proteína VP8*. En el gel de poliacrilamida (Figura 15), se observó una banda correspondiente a los linajes, con un peso molecular aproximado de 18 kDa. Con esta confirmación, se llevaron a cabo los ensayos inmunológicos para estudiar la reactividad de los linajes de la proteína VP8* del genotipo P[4] con sueros de 102 pacientes.

Antes de llevar a cabo los ensayos inmunológicos, fue necesario verificar la presencia de los distintos linajes de la proteína VP8*. Para este fin, se realiza una electroforesis en gel de poliacrilamida (Figura 18), en el cual se puede observar la presencia de estos linajes en una banda que se sitúa

aproximadamente en los 18 kDa. Una vez confirmado el resultado, se procede a llevar a cabo los ensayos inmunológicos con el objetivo de estudiar la reactividad de los diferentes linajes de la proteína VP8* del genotipo P[4] utilizando sueros procedentes de 102 pacientes.

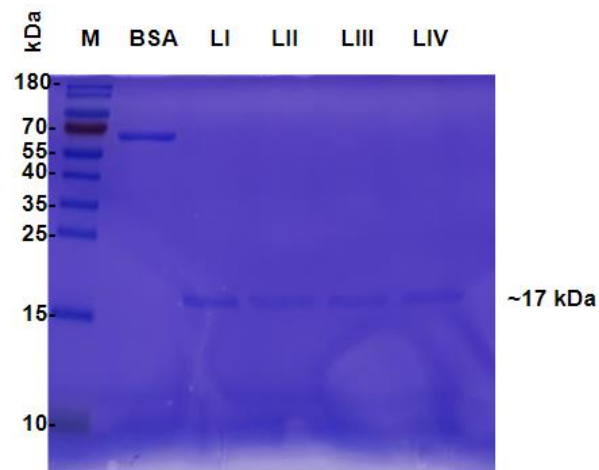


Figura 15. Imagen del gel de poliacrilamida con los diferentes linajes de la proteína VP8*. M (Page ruler, ThermoFisher Scientific). En el gel se puede observar en cada carril correspondiente a cada linaje, la presencia de una banda situada a 17 kDa, lo cual indica la presencia de la proteína VP8* para todos los linajes.

4.3. Análisis de sueros humanos

Este estudio se llevó a cabo utilizando 102 muestras de suero obtenidas del servicio de Microbiología del Hospital Clínico. Las muestras fueron anonimizadas para preservar la confidencialidad de los participantes, y el estudio fue realizado con la aprobación del comité ético del hospital.

La Figura 16 muestra una imagen representativa de los resultados obtenidos en el estudio. En esta imagen una mayor intensidad colorimétrica se correlaciona con un mayor título de los anticuerpos frente a la proteína VP8*. Esta relación indica que hay más cantidad de anticuerpos en las muestras, poniendo de manifiesto una respuesta inmunológica específica frente a la proteína VP8*, lo cual es un indicador positivo de la capacidad de reconocimiento y potencial respuesta inmune contra dicha proteína. Los resultados de este estudio se muestran en el Anexo III.

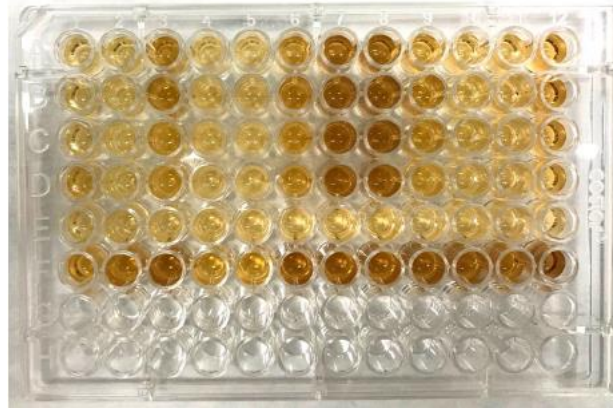


Figura 16. Resultados colorimétricos del ensayo inmunológico ELISA para 6 de los 102 sueros analizados. Este ensayo ELISA se ha realizado primeramente tapizando la placa con el antígeno, añadiendo la muestra y el anticuerpo detector marcado y por último, revelando la actividad enzimática mediante la adición del sustrato. La reacción enzimática genera un producto cuya intensidad se relaciona directamente con la cantidad de anticuerpo presente en la muestra..

Con el objetivo de obtener una comprensión más completa de los resultados, se llevó a cabo un análisis estadístico detallado utilizando el lenguaje de programación Python. Basándonos en estos análisis, se ha calculado el porcentaje de la población que muestra reactividad hacia cada linaje individual, así como combinaciones de uno, dos y tres linajes.

Las Figuras 19, 20 y 21 representan los porcentajes obtenidos de la población que reconocen cada linaje y las combinaciones de linajes en el genotipo P[4] de la proteína VP8* del rotavirus A. Estas representaciones gráficas permiten deducir qué linajes son de mayor importancia y deben ser considerados para su inclusión en una vacuna contra el rotavirus humano, con el objetivo de abarcar una gran parte de la población. Además, para facilitar la interpretación de los resultados, se ha generado un gráfico circular (Figura 17), donde se muestra la cantidad de sueros que reconocen uno, dos, tres, cuatro o ningún linaje del genotipo P[4] de la proteína VP8*. Esto proporciona una visualización clara de la distribución de la reactividad entre los diferentes linajes. Así pues, como se observa 32 sueros no reconocieron ninguno de los cuatro linajes, mientras que por el contrario, fueron 17 sueros los que reconocían todos los linajes. Por otro lado, son 23 los sueros que reconocen un linaje, 18 los que reconocen dos linajes y 12 los que reconocen tres de los cuatro linajes estudiados.

Asimismo, la Figura 18 muestra una representación del número de sueros que reconocen cada linaje del genotipo P[4] de la proteína VP8*. Esta representación gráfica permite identificar cuántos sueros reaccionan específicamente con cada linaje, lo cual es relevante para comprender la frecuencia de reconocimiento de cada linaje en la población estudiada. Así pues, se observa que el linaje I es reconocido por 29 sueros, el linaje II por 45, el linaje III por 39 y el linaje IV es reconocido por 44 de los sueros estudiados. En conjunto, estos análisis estadísticos y representaciones gráficas proporcionan

una información crucial para la selección de linajes prioritarios con el objetivo de desarrollar una vacuna eficaz contra el rotavirus humano, y así lograr una cobertura amplia y efectiva en la población objetivo.

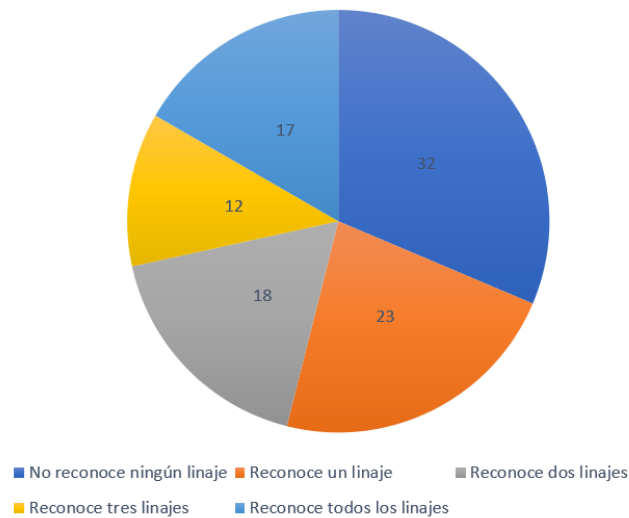


Figura 17. Gráfico circular en el que se representan la cantidad de sueros que reconocen uno, dos, tres, cuatro o ningún linaje del genotipo P[4] de la proteína VP8* de rotavirus. Se puede observar que 32 sueros no reconocen ningún linaje, 23 sueros reconocen un linaje, 18 sueros reconocen dos linajes, 12 sueros reconocen tres linajes y por último, 17 sueros que reconocen todos los linajes.

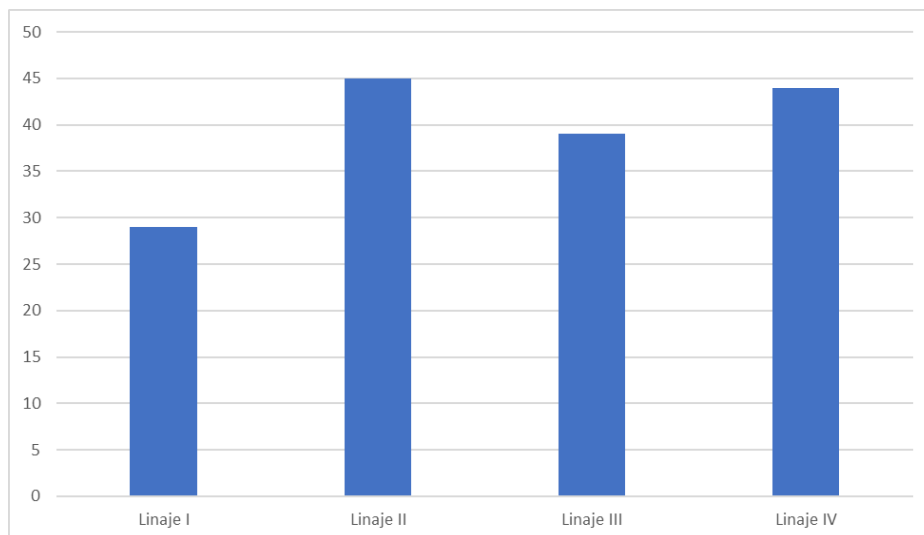


Figura 18. Gráfico de barras mostrando el número de sueros específicos para cada linaje del genotipo P[4] de la proteína VP8* de rotavirus.

Con estos resultados se puede deducir los linajes que deben ser incluidos en la vacuna frente a rotavirus humano para poder abarcar una gran parte de la población. En caso de que se desee realizar la vacuna

incluyendo un único linaje, se opta por incluir el linaje IV (44%) o el linaje II (45%). Si se desea incluir una combinación de dos linajes, la opción elegida será una combinación de los linajes II y IV, pues abarca a un 61% de la población. Por último, si se desea incluir tres linajes en la vacuna frente a Rotavirus A, se elegirán los linajes II, III y IV, incluyendo a un 69% de la población.

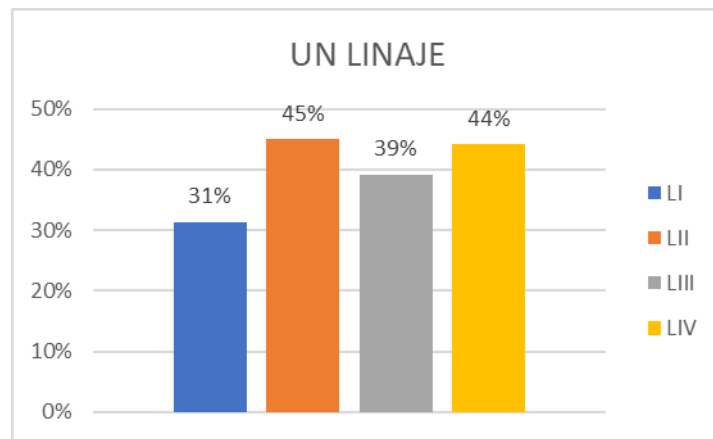


Figura 19. Gráfico de barras en el que se representa el porcentaje de la población que reconoce cada uno de los linajes. Un 31% de la población estudiada reconoce al linaje I y un 39% de la población estudiada reconoce al linaje III. Sin embargo, podemos encontrar porcentajes altos de la población que reconocen al linaje II (45%) y al linaje IV (44%).

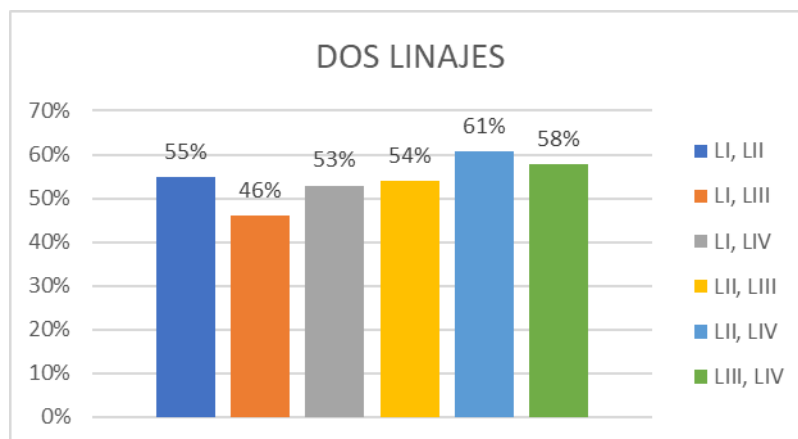


Figura 20. Gráfico de barras en el que se representa el porcentaje de la población que reconoce combinaciones de dos linajes. Se puede observar una destacable diferencia entre el porcentaje de población estudiada que reconoce a los linajes II y IV (61%) y el que reconoce a los linajes I y III (46%). Sin embargo, no hay mucha diferencia entre el porcentaje de la población que reconoce las otras combinaciones de dos linajes.

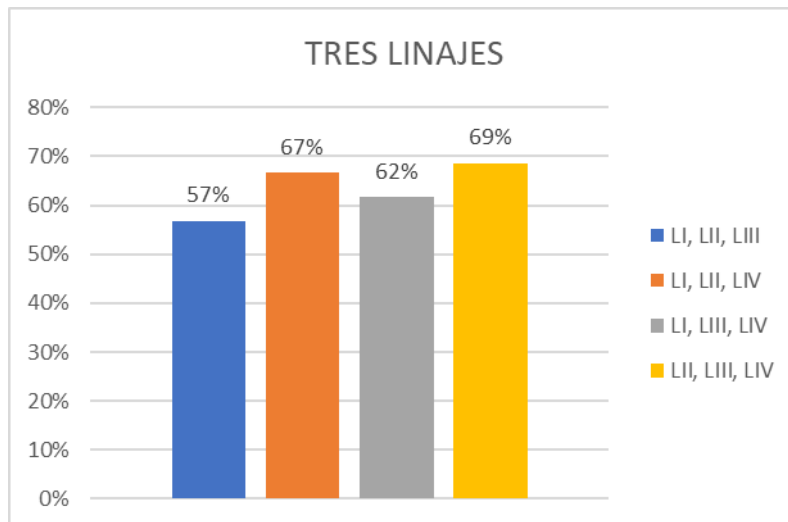


Figura 21. Gráfico de barras en el que se representa el porcentaje de la población que reconoce combinaciones de tres linajes. La combinación de tres proteínas que abarca a un mayor porcentaje de la población estudiada (69%) está formada por los linajes II, III y IV.

5. Conclusiones

El presente estudio se centró en el clonaje y la purificación de la proteína VP8* y en el análisis de sueros humanos para evaluar la respuesta inmunológica. Para el clonaje, se llevó a cabo la digestión del plásmido pMX para cada linaje de la proteína VP8*, lo que permitió separar y analizar los fragmentos de ADN presentes en el plásmido. La presencia de las bandas correspondientes al plásmido y al inserto específico en el gel de agarosa confirmó la correcta digestión.

Posteriormente, se realizó una PCR para identificar las colonias positivas que contenían el fragmento de interés. Las colonias seleccionadas fueron sometidas a una miniprep para obtener los plásmidos pGEX-2T con el inserto codificante para la proteína GST:VP8*. La secuenciación de estos plásmidos reveló las secuencias correspondientes a los linajes I al IV de la proteína VP8* del genotipo P[4], proporcionando información sobre su composición genética.

La purificación de la proteína VP8* se realizó mediante la expresión de la proteína de fusión GST:VP8* en la cepa BL21 de *E. coli* y su retención en una columna de inmunoafinidad. La elución con glutatión permitió obtener la proteína purificada. Posteriormente, se llevó a cabo el desalado de la proteína y la digestión con trombina para separar la proteína VP8* de la etiqueta GST. La eliminación de la etiqueta GST se logró mediante una columna GSTrap.

La cuantificación de la proteína VP8* reveló las concentraciones obtenidas para cada linaje. Finalmente, se verificó la presencia de los diferentes linajes de la proteína VP8* mediante análisis de SDS-PAGE, donde se observaron bandas correspondientes a los linajes con un peso molecular de aproximadamente 17 kDa.

Para evaluar la respuesta inmunológica, se utilizaron sueros humanos obtenidos de 102 pacientes. El análisis mediante ensayos inmunológicos ELISA demostró que una mayor intensidad de absorbancia se correlacionaba con un mayor reconocimiento de los anticuerpos hacia la proteína VP8*. Estos resultados indicaron una respuesta inmunológica específica y una posible capacidad de reconocimiento de la proteína VP8* de los linajes estudiados por parte de los anticuerpos presentes en los sueros analizados.

La selección de estos linajes como objetivo para el desarrollo de una vacuna es debido a que representan una amplia diversidad genética de los rotavirus. Se ha demostrado que la variabilidad de la proteína VP8* es una característica importante para la evasión inmunológica de los rotavirus y su adaptación a diferentes poblaciones. Al incluir los linajes II y IV en la vacuna, se abarcan varias cepas y se maximiza la probabilidad de que la vacuna sea efectiva contra la mayoría de las variantes circulantes.

Es importante destacar que los linajes I y III, aunque menos prevalentes en nuestra población de estudio, también presentaron una seroprevalencia significativa. Estos linajes no deben ser ignorados, ya que pueden estar circulando en otras regiones o grupos de población donde su prevalencia sea mayor. Sería recomendable realizar estudios adicionales para evaluar la seroprevalencia de estos linajes en otras poblaciones y considerar su inclusión en una vacuna ampliada en el futuro.

En conclusión, nuestros resultados respaldan la elección de los linajes II y IV de la proteína VP8* de rotavirus como objetivos principales para el desarrollo de una vacuna. Estos linajes fueron los más prevalentes en la población estudiada y representan una amplia diversidad genética de los rotavirus. Al incluir estos linajes en la formulación de la vacuna, se espera abarcar al menos a un 61% de la población y proporcionar una protección efectiva contra los rotavirus circulantes.

Sin embargo, es importante tener en cuenta que la epidemiología de los rotavirus puede variar en diferentes regiones geográficas y grupos de población. Por lo tanto, es necesario realizar estudios adicionales en otras áreas para evaluar la prevalencia de otros linajes y considerar su inclusión en futuras vacunas.

6. Bibliografía

Buesa, J & Rodríguez-Díaz, J. (2016). *The Molecular Virology of Enteric Viruses*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-30723-7_3

Diccionario de cáncer del NCI. (s.f.). Instituto Nacional del Cáncer. <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/seroprevalencia>

Donato, C. M., & Bines, J. E. (2021). Retrieved from <https://www.mdpi.com/2076-0817/10/8/959>

Estes, M. K., Palmer, E. L., & Obijeski, J. F. (1983). Rotaviruses: A Review. En *Current Topics in Microbiology and Immunology* (pp. 123–184). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-69159-1_3

Health.vic. (s.f.). Health.vic | health.vic.gov.au. <https://www.health.vic.gov.au/>

Información clínica acerca del rotavirus | CDC. (s.f.). Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/rotavirus/clinical-sp.html>

Iturriza-Gómara, M., Green, J., Brown, D. W. G., Ramsay, M., Desselberger, U., & Gray, J. J. (2000). Molecular epidemiology of human group A rotavirus infections in the United Kingdom between 1995 and 1998. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(12), 4394-4401. <http://doi:10.1128/jcm.38.12.4394-4401.2000>

Limia Sánchez, Aurora, Labrador Cañadas, María Vicenta, Ory Manchón, Fernando de, Sánchez-Cambronero Cejudo, Laura, Rodríguez Cobo, Iria, Cantero Gudino, Elena, Vázquez Moreno, Julio, & Arce Arnáez, Araceli. (2019). Metodología del 2º estudio de seroprevalencia en España. *Revista Española de Salud Pública*, 93, e201904021. Epub 07 de septiembre de 2020. Recuperado en 04 de junio de 2023, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1135-57272019000100018&lng=es&tlng=es.

Limia Sánchez, A., & Olmedo Lucerón, C. (2021). 2º Estudio de Seroprevalencia en España, 2017-2018 [2nd Seroprevalence Study in Spain, 2017-2018]. *Revista española de salud pública*, 95, e202103059.

Mousavi-Nasab, S. D., Sabahi, F., Kaghazian, H., Paryan, M., Mirab Samiee, S., Ghaderi, M., ... Makvandi, M. (2020). A real-time RT-PCR assay for genotyping of rotavirus. Retrieved from <http://ibj.pasteur.ac.ir/article-1-3158-en.html>

Ogilvie, I., Khoury, H., El Khoury, A. C., & Goetghebeur, M. M. (2011). Burden of rotavirus gastroenteritis in the pediatric population in central and eastern europe: Serotype distribution and burden of illness. *Human Vaccines*, 7(5), 523-533. <http://doi:10.4161/hv.7.5.14819>

Sadiq, A., Bostan, N., Jadoon Khan, & Aziz, A. (2022). Effect of rotavirus genetic diversity on vaccine impact. *Reviews in medical virology*, 32(1), e2259. <https://doi.org/10.1002/rmv.2259>

Sadiq, A., Bostan, N., Yinda, K. C., Naseem, S., & Sattar, S. (2018). Rotavirus: Genetics, pathogenesis and vaccine advances. *Reviews in medical virology*, 28(6), e2003. <https://doi.org/10.1002/rmv.2003>

Santos, N., & Hoshino, Y. (2005). Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Reviews in Medical Virology*, 15(1), 29-56. <https://doi:10.1002/rmv.448>

Stencel-Baerenwald, J. E., Reiss, K., Reiter, D. M., Stehle, T., & Dermody, T. S. (2014). The sweet spot: defining virus-sialic acid interactions. *Nature reviews. Microbiology*, 12(11), 739–749. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3346>

Téllez, Carlos. (2013). Análisis filogenético de los genes VP7 y NSP4 de cepas de rotavirus de niños con gastroenteritis en Valencia y Castellón. Universitat de València. Mobiroderic.

Vila-Vicent, S., Gozalbo-Rovira, R., Rubio-Del-Campo, A., Santiso-Bellón, C., Navarro-Lleó, N., Muñoz, C., Buesa, J., & Rodríguez-Díaz, J. (2020). Sero-epidemiological study of the rotavirus VP8* protein from different P genotypes in Valencia, Spain. *Scientific reports*, 10(1), 7753. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64767-x>

7. Anexos

Anexo I.

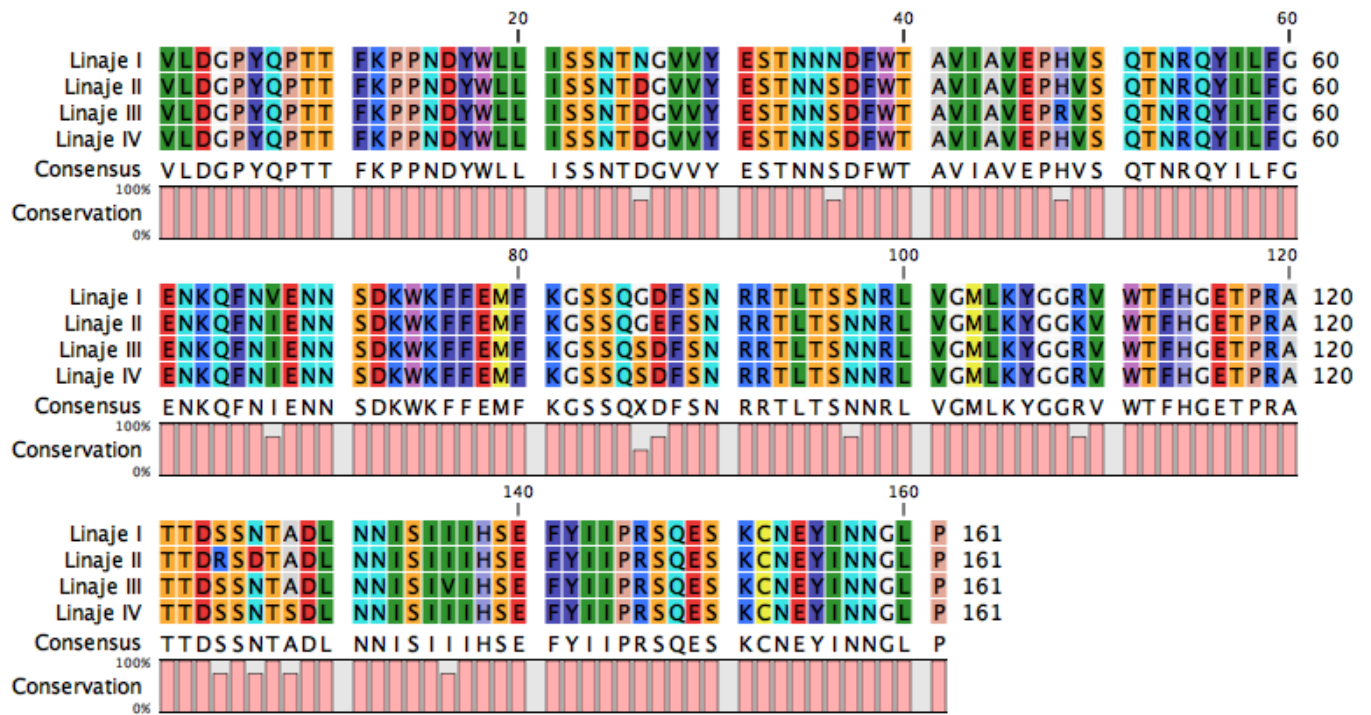
Objetivos de desarrollo sostenible.

OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE



Anexo II.

Alineamiento de las secuencias de los diferentes linajes del genotipo P[4] de la proteína VP8* de rotavirus.



Anexo III.

Resultados obtenidos en el estudio de reactividad de los sueros (S.) frente a las proteínas VP8* de los linajes I-IV pertenecientes al genotipo P[4]. Se considera positivo (+) o negativo (-) si el resultado obtenido es mayor o menor, respectivamente, que tres veces la media de la señal del blanco más la desviación estándar.

Linaje					Linaje					Linaje					Linaje					Linaje									
S.	I	II	III	IV	S.	I	II	III	IV	S.	I	II	III	IV	S.	I	II	III	IV	S.	I	II	III	IV	S.	I	II	III	IV
1	+	-	-	-	18	+	-	+	-	35	+	+	+	+	52	-	-	-	-	69	+	+	+	+	86	-	+	-	-
2	-	-	-	-	19	-	-	-	+	36	-	-	+	-	53	+	-	+	-	70	+	+	+	+	87	-	+	-	-
3	+	+	-	+	20	-	-	-	+	37	-	-	-	-	54	+	+	+	+	71	+	+	-	+	88	-	+	+	+
4	+	-	+	-	21	-	-	-	+	38	-	-	-	-	55	-	-	-	-	72	-	+	-	-	89	+	+	+	+
5	+	-	-	-	22	-	-	-	-	39	-	+	+	+	56	-	-	-	-	73	-	-	-	-	90	+	+	+	+
6	+	-	+	-	23	-	-	-	-	40	-	-	-	-	57	-	-	-	-	74	-	+	+	-	91	+	+	+	+
7	-	-	-	-	24	-	-	-	+	41	-	-	-	+	58	-	-	+	-	75	-	+	+	-	92	+	+	+	+
8	-	-	-	-	25	+	+	+	+	42	+	-	+	+	59	-	-	-	-	76	+	+	+	+	93	+	+	+	+
9	-	-	-	+	26	-	+	+	-	43	-	-	-	-	60	+	-	+	+	77	+	-	-	+	94	-	+	+	-
10	-	+	-	-	27	+	+	+	+	44	-	-	-	+	61	-	-	-	-	78	-	-	-	+	95	+	+	-	-
11	+	+	-	-	28	-	-	-	+	45	-	+	+	+	62	-	-	-	+	79	-	+	-	-	96	-	-	-	-
12	-	-	-	-	29	-	+	-	-	46	+	-	+	+	63	-	-	-	-	80	-	+	+	-	97	+	+	+	-
13	-	+	-	-	30	-	-	-	-	47	-	-	-	-	64	+	+	+	+	81	-	+	+	+	98	-	+	-	+
14	-	+	-	+	31	-	-	-	-	48	-	-	-	-	65	-	-	-	+	82	+	+	+	+	99	+	+	+	+
15	+	+	+	+	32	-	-	-	+	49	-	-	-	-	66	-	-	-	-	83	-	-	-	-	100	+	+	+	+
16	-	-	-	-	33	-	+	+	+	50	-	+	-	+	67	-	-	-	-	84	-	-	-	-	101	-	+	+	-
17	-	-	-	-	34	-	+	+	+	51	-	+	-	+	68	-	-	-	-	85	-	-	-	-	102	-	+	+	-