



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY

UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA, FACULTAD DE CIENCIAS



FACULTAD DE
CIENCIAS

UDELAR | fcien.edu.uy

"Construcción de un Baculovirus recombinante para la expresión de la proteína VP1 de Norovirus"

Tesina de grado

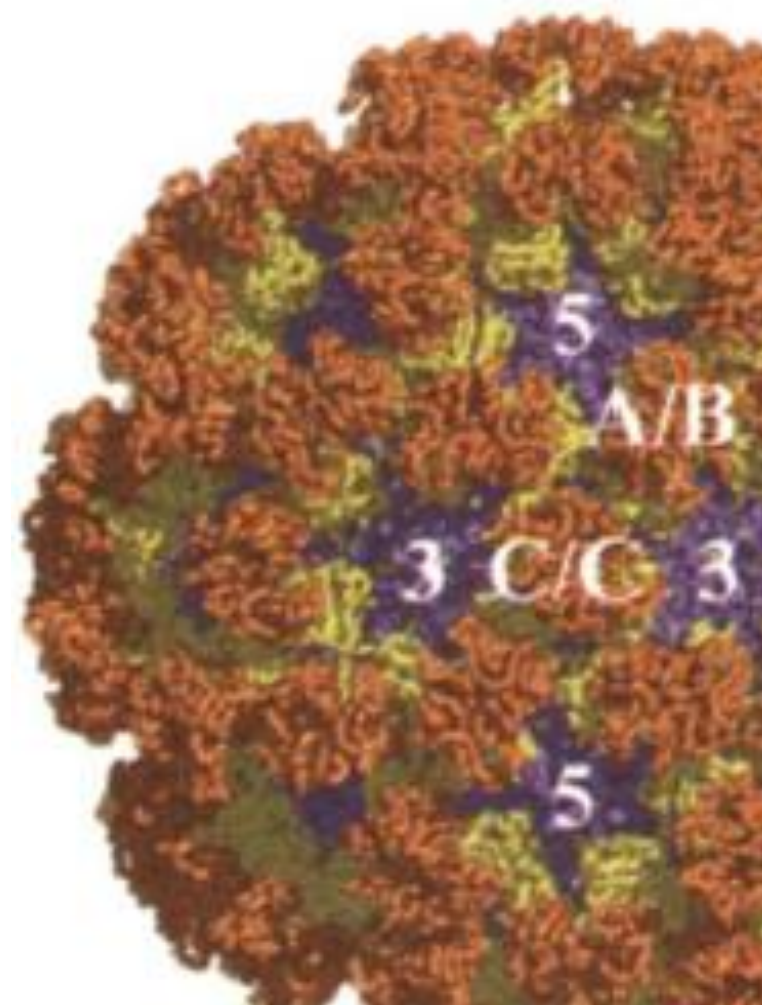
Licenciatura en Ciencias Biológicas

Bach. Darío Porley

Tutor: Dra. Mabel Berois

Co-tutor: MSc. Andrea Blanc

Montevideo, 2013



Contenido

Resumen	5
Introducción	6
La enfermedad y el descubrimiento de los Norovirus	6
Clasificación y epidemiología molecular	8
Genoma y Proteínas Virales	10
Estructura	12
VLPs de Norovirus, su importancia y relación con Baculovirus	14
Objetivos	17
Objetivos Generales	17
Objetivos Específicos.....	17
Desarrollo Metodológico	18
1) Material biológico	18
Virus	18
Células Eucariotas	18
Bacterias.....	18
Plásmidos	18
2) Extracción del ARNsc genómico	19
3) Amplificación del gen de VP1 mediante RT-PCR y del gen de la GFP por PCR	19
3.1) Retro Transcripción	19
3.2) Diseño de oligonucleótidos y clonaje libre de enzimas de restricción	20
3.3) PCR para obtener Mega-cebador.....	20
4) Obtención y producción de los stocks de Baculovirus Recombinante	22
4.1) Construcción de los plásmidos pFastBac1 recombinantes conteniendo los genes foráneos	23
4.2) Construcción de los bácmidos recombinantes conteniendo los genes foráneos.....	24
4.3) Obtención del inoculo inicial de Baculovirus recombinantes.....	25

4.4) Amplificación de los inóculos iniciales de Baculovirus recombinantes	25
4.5) Titulación de los Baculovirus recombinantes por plaqueo viral	26
5) Expresión y purificación de proteínas recombinantes.....	26
6) Detección de la expresión de VP1 y evaluación de la formación de VLPs	27
6.1) SDS-PAGE	27
6.2) Microscopía Electrónica	27
7) Electroforesis en geles de agarosa y secuencias.....	27
Resultados.....	29
1) Obtención del gen de VP1 mediante RT-PCR y GFP por PCR	29
2) Obtención de los Baculovirus recombinantes	30
2.1) Plásmidos pFastBac1 Recombinantes.....	30
2.2) Búcmidos Recombinantes	33
2.3) Obtención de stocks de Baculovirus Recombinante.....	35
2.4) Producción y purificación de proteínas recombinantes	36
3) Expresión de VP1 y evaluación de la formación de VLPs	36
3.1) SDS-PAGE	36
Discusión	40
Perspectivas	43
A corto plazo	43
A largo plazo.....	43
Bibliografía	45
Agradecimientos.....	50

Abreviaturas

3CLpro	Proteasa similar a C3	MOI	Multiplicidad de infección
aa	Aminoácido	μg	Microgramo
ATB	Antibiótico	μL	Microlitro
BSA	Seroalbúmina Bovina	°C	Grados Celsius
ADN	Ácido desoxirribonucleico	ng	Nanogramo
ARN	Ácido ribonucleico	nm	Nanómetro
Da	Dalton	NoV	Norovirus
dNTP's	Desoxinucleótidos	ON	Durante la noche
DTT	Ditiotreitol	ORF	Marco de lectura abierto
EDTA	Ácido etilendiaminetetracético	P	Dominio protruyente de VP1
ELISA	Enzimo-inmuno ensayo	PAGE	Electroforésis en gel de poliacrilamida
EtOH	Etanol	pb	Pares de bases
FCV	Calicivirus felino	PBS	Buffer fosfato salino
GI	Genogrupo 1	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
GII4	Genogrupo 2 y genotipo 4	pg	picogramo
GII12	Genogrupo 2 y genotipo 12	PM	Peso molecular
GIII	Genogrupo 3	ppm	Partes por millón
GIV	Genogrupo 4	RdRp	ARN polimerasa ARN dependiente
GV	Genogrupo 5	RHDV	Virus de la enfermedad hemorrágica de los conejos
GVI	Genogrupo 6	rpm	Revoluciones por minuto
GFP	Proteína verde fluorescente	RT	Retrotranscripción
H ₂ O _{dd}	Agua bidestilada	S	Dominio de coraza de VP1
g	Gramos	sc	Simple cadena
IgA	Inmunoglobulina A	SDS	Dodecilsulfato sódico
IEM	Inmuno microscopía electrónica	SFB	Suero fetal bovino
kb	Kilobase	S.O.C.	Caldo súper óptimo con represión de catabolitos
Kv	Kilovoltio	TAE	Tris-Acetato-EDTA
LB	Caldo de lisogenia	Tn7	Transposón bacteriano Tn7
M	Molar	uff	Unidades formadoras de focos
min	Minutos	ufp	Unidades formadoras de placas
mL	Mililitro	V	Volt
mM	Milimolar	VLP's	Pseudo-partículas virales

Resumen

Los Norovirus, pertenecientes a la familia Caliciviridae, son un importante agente etiológico de brotes de gastroenteritis contagiosa y pueden llegar a ser responsables del 90% de este tipo de afecciones cuando se descarta el componente bacteriano. Estos virus tienen un genoma compuesto por ARN simple hebra de sentido positivo de 7 kb aproximadamente, poli-adenilado y unido en su extremo 5' a una proteína viral. Su genoma codifica para tres marcos de lectura abiertos, el segundo marco de lectura abierto codifica la proteína principal de cápside VP1. De acuerdo a diferencias genéticas en la secuencia de aminoácidos predicha de VP1, los Norovirus se subdividen en 5 genogrupos distintos y estos a su vez se subdividen en múltiples genotipos. Cuando se expresa VP1 en sistemas de expresión heterólogos (particularmente aquellos basados en Baculovirus), se ha observado que forman pseudo-partículas virales (VLPs) con las mismas propiedades que los viriones nativos. Estas VLPs han sido de gran importancia en el estudio de Norovirus ya que no se dispone de un cultivo celular o modelo animal apropiado para su crecimiento. Debido a esto, en este trabajo se propuso construir Baculovirus recombinantes que expresaran la proteína VP1 de cepas de Norovirus autóctonas del Uruguay (cepa NV2011_134_UY y NV2008_001_UY). Para ello se diseñaron cebadores específicos y se logró amplificar y clonar el gen codificante para VP1 de dos cepas distintas. Se utilizó el sistema Bac-to-Bac de Invitrogen infectando células Sf9 obteniendo con éxito un stock inicial de los distintos Baculovirus recombinantes. El stock inicial de los Baculovirus recombinantes fue amplificado para realizar una producción de proteínas recombinantes. Mediante un gel de poliacrilamida se logró detectar la expresión de VP1 para los Baculovirus recombinantes de ambas cepas, mientras que análisis por microscopía electrónica revelaron que las VP1 pertenecientes a ambas cepas fueron capaces de auto-ensamblarse en VLPs con diámetros de entre 27 y 48nm. Estas VLPs presentaron además una conformación con forma de cáliz, típica de los Calicivirus. Se concluyó por consiguiente, que se logro producir Baculovirus recombinantes que expresaran VP1 de Norovirus y que dichas proteínas fueron capaces de auto-ensamblarse, siendo éstas, las primeras VLPs de este virus producidas en el país y más aún las primeras generadas a partir de cepas autóctonas.

Introducción

La enfermedad y el descubrimiento de los Norovirus

Los Norovirus (NoV) son un importante agente etiológico de gastroenteritis epidémica y esporádica. La enfermedad provoca diarreas acuosas con al menos tres episodios de heces acuosas durante 14 días [22], además pueden presentar vómitos abundantes y cólicos abdominales. Los casos de diarrea por NoV son frecuentes durante todo el año pero parece presentar un aumento en los meses fríos en climas templados [47]. Se ha constatado que entre el 60 a 95% de los brotes de gastroenteritis viral son causados por este virus. Aproximadamente un 20% de los adultos que consultan un médico por diarrea aguda infecciosa presentan evidencia de NoV. En cuanto a niños, aproximadamente del 7 a 9% con esta afección presenta evidencia de NoV [22]. En los Estados Unidos, utilizando datos epidemiológicos obtenidos entre los años 2000 y 2009, se estimó que NoV es el principal agente causal de intoxicación alimenticia. De un total de 9.4 millones de episodios de este tipo de enfermedad que sucederían por año, el 58% sería ocasionado por NoV, además también se encontraría entre las principales causas de hospitalización y muerte con una incidencia del 26% y 11% respectivamente [53]. Estudios sero-epidemiológicos en Estados Unidos y Bangladesh sugerirían que la mayoría de los niños adquieren anticuerpos contra NoV en los primeros 5 a 15 años de vida, si bien la infección no causa inmunidad a largo plazo y es específica de cepa [19].

La diagnosis de gastroenteritis aguda ocasionada por NoV es poco común por varias razones. Entre ellas al ser una enfermedad que por lo general se resuelve por sí misma, los individuos afectados no realizan consultas médicas, por lo cual muestras de vómito y materia fecal no son colectadas. Además, no hay disponibles exámenes de rutina en laboratorios clínicos y comerciales, la mayoría de los brotes no son estudiados, y los casos esporádicos no son reportables [22]. La vía de transmisión de NoV es fecal-oral y además del consumo de alimentos contaminados otras formas de contraer el virus incluyen el consumo de agua contaminada, el contacto persona a persona y los fómites (**Figura 1**). Esto puede deberse a la baja cantidad de virus necesarios para iniciar una infección (menos de 100 partículas virales) permitiendo la transmisión por medio de aerosoles de persona a persona. Además, los individuos infectados pueden dejar de presentar síntomas pero seguir liberando virus al ambiente por una semana luego del cese de dichos síntomas. Sumado a esto, el virus es estable en agua clorada hasta 10 ppm y mantiene la infectividad luego de ser congelado y calentado hasta 60°C [19]. Es común que brotes de NoV se detecten en restaurantes, cruceros, hospitales, casas de retiro, hospitales geriátricos, escuelas y básicamente cualquier entorno en el que grandes cantidades de gente consuman alimentos preparados por otra persona, como en los servicios de catering (**Figura 1**) ocasionando grandes pérdidas económicas y problemas sanitarios [22]. Si bien NoV es capaz de infectar a todas las franjas etarias su impacto puede ser aún mayor en casos donde los pacientes sean niños menores de 5 años, sobretodo de países en desarrollo, donde se da el 95% de las muertes por gastroenteritis aguda [50]. Otra población de riesgo son las personas mayores a 65 años, estimándose en el Reino Unido que aproximadamente el 20% de las muertes por gastroenteritis aguda no relacionada con

Clostridium difficile se debían a NoV [27]. Por último, otro importante grupo de riesgo son los individuos inmuno-suprimidos debido a trasplantes, enfermedades adquiridas o condiciones pre-existentes que afecten la robustez inmunológica del individuo [11].

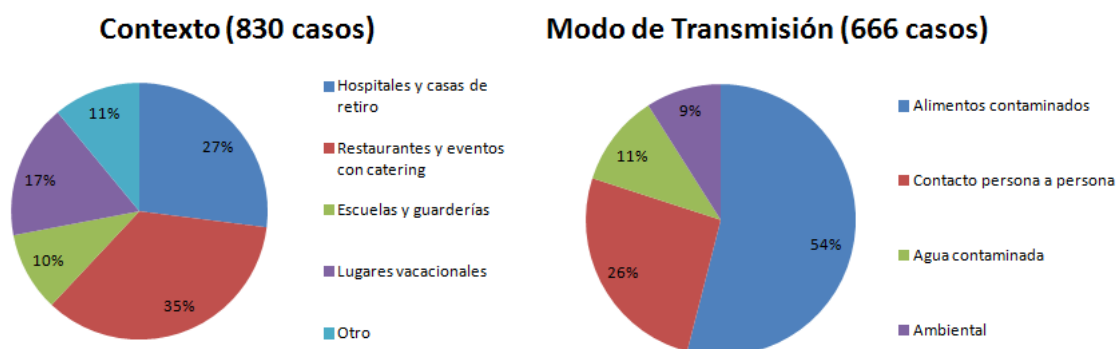


Figura 1- Esquema del contexto y modos de transmisión de una extensa revisión bibliográfica de brotes de gastroenteritis ocasionada por Norovirus entre los años 1993 y 2011. Adaptado de Matthews y cols, 2012 [44].

El establecimiento de NoV como responsable de gastroenteritis fue un proceso largo y tedioso, resultado de lo dificultoso que resulta crecer estos virus en cultivo celular [36]. Debido a esto, se tuvo que valer de experimentos con voluntarios. En estos experimentos se administraba de forma oral a voluntarios adultos, filtrados de materia fecal, libre de bacterias pertenecientes a pacientes enfermos, generando enfermedad en dichos voluntarios [23, 34, 39]. Se intentó aislar el agente causal en estos filtrados de materia fecal en cultivos celulares, pero resultó inútil. Como consecuencia una gran cantidad de casos de gastroenteritis permaneció sin diagnóstico de un agente causal hasta que en 1972 se descubrió el virus de Norwalk [37]. Esto se logró examinando materia fecal de voluntarios enfrentados a filtrados libres de bacterias provenientes de un brote de gastroenteritis en una escuela de Norwalk, Ohio en Octubre de 1968 [1]. La presencia de un virus se constató mediante la técnica de inmuno microscopía electrónica (IEM por sus siglas en inglés), que involucra la observación directa de complejos antígeno-anticuerpo mediante microscopía electrónica. La aplicación de esta técnica fue importante ya que anticuerpos específicos en el suero de pacientes convalecientes se agregaban y cubrían la partícula viral de manera que estas aparecían como partículas solas o en pares, facilitando su detección [36]. Las partículas del virus de Norwalk resultaron ser pequeñas, redondeadas y se describieron con un diámetro mínimo de 27 nm y 32 nm como máximo (**Figura 2**). La técnica de IEM además, resulto esencial para establecer la relación existente entre la partícula del virus de Norwalk y la enfermedad. El filtrado de materia fecal fue incubado con suero obtenido de un voluntario previo al contacto con el virus y con suero en fase convaleciente del mismo voluntario luego de haber sido enfrentado (y haber contraído la enfermedad) al filtrado (**Figura 2**). El aumento de los anticuerpos específicos para el virus de Norwalk en el suero de fase convaleciente de voluntarios enfrentados con filtrados del brote

llevaron a la conclusión de que éste era el agente etiológico responsable del brote. De esta forma el virus de Norwalk se convirtió en la cepa prototipo de un gran grupo relacionado de virus pequeños, redondos llamados Norovirus.

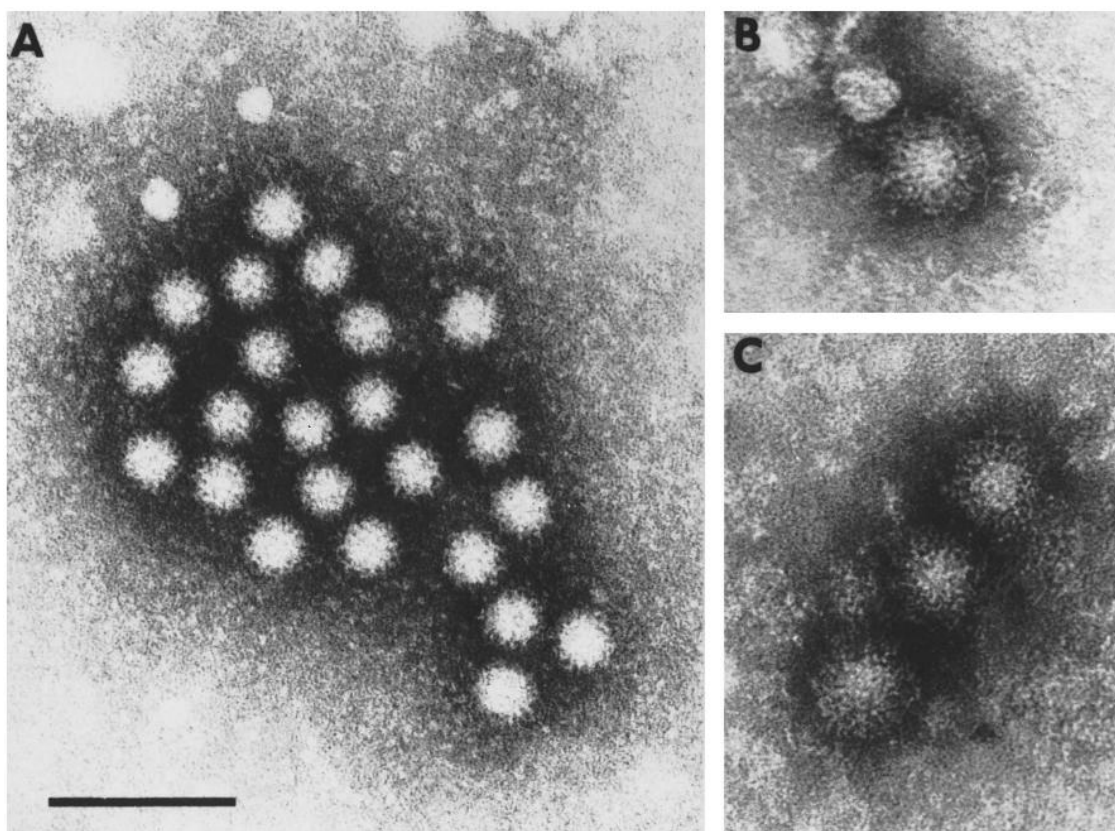


Figura 2- Imágenes de Inmuno Microscopía Electronica de partículas virales de virus de Norwalk. A- Partículas incubadas con suero de voluntarios previo al enfrentamiento a filtrados de materia fecal de brote de gastroenteritis. Las partículas se ven conglomeradas en grandes grupos y levemente cubiertas de anticuerpos. B y C- Partículas incubadas con suero de voluntarios en fase convaleciente luego de que el individuo se enfrentara al filtrado. En la parte B se ve una partícula viral aislada y cubierta de anticuerpos y en la parte C se ven tres. La barra corresponde a 100 nm y se aplica a todas las imágenes. Adaptado de Kapikián, 2000 [36].

Clasificación y epidemiología molecular

Los NoV pertenecen a la familia *Caliciviridae*, compuesta por virus desnudos pequeños (27 a 40 nm) con un genoma de ARN simple hebra lineal de sentido positivo. La familia se compone principalmente de 4 géneros *Vesivirus*, *Lagovirus*, *Sapovirus* y *Norovirus* cada uno de ellos formando un clado genético distinto [25]. Sin embargo, recientemente se ha propuesto la existencia de un nuevo género llamado *Recovirus* cuya cepa tipo fue aislada de muestras de materia fecal de monos Rhesus juveniles en cautiverio [16]. Los mayores patógenos humanos dentro de la familia son los NoV y los Sapovirus que causan gastroenteritis aguda. También se encuentran patógenos de interés veterinario como por ejemplo dentro de los Vesivirus, el Calicivirus felino (FCV por sus siglas en inglés) que causa enfermedades respiratorias en gatos,

así como el virus de la enfermedad hemorrágica de los conejos (RHDV por sus siglas en inglés) un Lagovirus que causa una enfermedad frecuentemente fatal en conejos.

El género *Norovirus* a su vez se divide en base a su relación en la proteína de cápside VP1, que debería correlacionarse con la especificidad antigénica[3, 35, 61]. Esta clasificación divide al género en 5 clados filogenéticos o genogrupos, a los que se llaman GI, GII, GIII, GIV y GV. Recientemente se ha propuesto que existiría un genogrupo GVI en base a una cepa aislada en un huésped canino [45]. Además, los genogrupos GI, GII y GIII se subdividen en 8, 19 y 3 clusters genéticos o, genotipos, respectivamente (**Figura 3**).

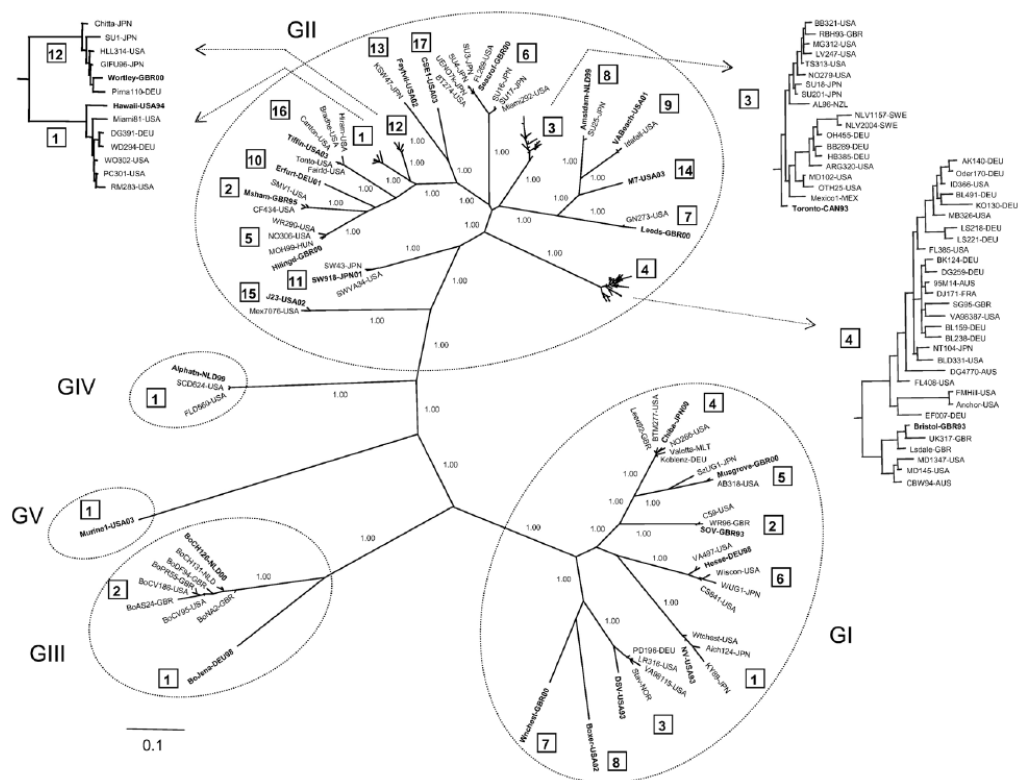


Figura 3- Esquema de la división filogenética de Norovirus en los 5 principales genogrupos y sus diferentes genotipos basado en la secuencia predicha de aminoácidos del gen codificante para VP1. Adaptado de Zheng y cols, 2006 [61].

Estudios epidemiológicos moleculares a gran escala arrojaron observaciones interesantes en cuanto a características genéticas de los Norovirus. Los NoV GII, particularmente los del genotipo 4 (GII4) son los virus predominantes, un patrón reflejado en estudios en otras partes del mundo [48] y también en la región [4, 17, 20, 21]. A nivel regional NoV ha sido detectado en Argentina, Brasil, Chile y Paraguay. En un estudio en particular en Argentina, se encontró una alta prevalencia del virus en muestras de brotes ocurridos en el 2004, de 100 muestras procesadas 37 fueron positivas para NoV[21]. En este mismo país se detectó la presencia de NoV en brotes ocurridos entre 2005 y 2006 siendo cepas correspondientes a virus GII4 las predominantes [20]. Siguiendo con este patrón, un análisis de muestras de aguas residuales

del 2009 en Córdoba, Argentina, encontró que de 28 muestras procesadas 11 fueron positivas para NoV y todas las secuencias pertenecían a virus GII4 [9]. En Paraguay, donde la gastroenteritis aguda es la tercera causa de muerte más frecuente en niños menores de 5 años, se encontró que de 378 muestras colectadas de niños en hospitales entre los años 2004 y 2005, 161 fueron positivas para NoV. En este estudio NoV GII fue responsable del 58% de las infecciones mientras que el 42% restante se vinculó a NoV pertenecientes al genogrupo GI [18]. Recientemente, en el 2010, se constató un brote de gastroenteritis aguda en Antofagasta, Chile con 31036 casos reportados. Detectándose la presencia de NoV nuevamente del genogrupo II en muestras clínicas y ambientales [13]. Además, en Brasil, se realizó una vigilancia desde 2005 a 2008 en Rio de Janeiro, donde se encontró que de 1.087 muestras de pacientes con gastroenteritis negativas para Rotavirus, el 35.1% fue positivo para NoV, una cantidad incluso mayor que los positivos para Rotavirus [17]. Otro estudio realizado en niños hospitalizados en la ciudad de Belem en el 2003, encontró que 9.8% de las 305 muestras resultaron positivas para NoV [4]. En el Uruguay se detectó NoV recientemente, en un estudio en el cual se procesaron 230 muestras fecales y se detectó este virus en el 14.8%. Estas cepas fueron caracterizadas como GII4 además de una cepa recombinante, teniendo como cepas parentales una cepa GII12 y una GII13 [2]. Este estudio halló por primera vez esta cepa recombinante en Sudamérica. De hecho, es de este estudio del cual surgen las muestras utilizadas en este trabajo. Si bien, numerosas cepas de Norovirus pueden causar infecciones en la comunidad, periódicamente una sola cepa predomina sobre un área geográfica grande. Un estudio describió una epidemia mundial entre 1995 y 1996 relacionada a una cepa de NoV GII4, previamente rara, que alcanzó predominancia en un período de 6 meses, causando hasta un 65% de todos los brotes. Sin embargo, luego de un año, esta cepa epidémica pasó a ser poco común [48]. Una cepa similar GII4 en Holanda en el mismo período de tiempo triplicó la cantidad de epidemias ocurridas en este país[40]. En el 2002 y 2003 un Norovirus previamente no descrito, GII4/Farmington Hills, causó un incremento dramático en el número de brotes de NoV en Estados Unidos en 10 estados diferentes y en cruceros [10, 59]. Por 12 meses esta cepa fue el agente causal de más de la mitad de los brotes de gastroenteritis debida a NoV. Este tipo de patrón se ha repetido hasta la actualidad y debido a esto, se han generado preguntas sobre el rol de las diferencias entre cepas en la gastroenteritis ocasionada por NoV. Varios autores han propuesto que las cepas epidémicas que causan el incremento en brotes de gastroenteritis son más virulentas o más persistentes en el ambiente[10, 43, 59]. El mecanismo exacto por el cual se dan las variaciones en predominancia de cepas y virulencia diferencial, no se conoce.

Genoma y Proteínas Virales

Los *Calicivirus* poseen un genoma de ARN lineal, simple cadena, positivo, que puede ir desde 7.3 a 8.5 kb de longitud. Poseen una cola poli-adenilada y regiones no traducidas tanto en su extremo 5' como en el 3' [41]. El genoma está organizado en dos o tres marcos de lectura abiertos (ORF's por sus siglas en ingles) dependiendo del género (**Figura 4**). Recovirus, el nuevo género propuesto para la familia Caliciviridae, presenta 3 ORF's [16]. Las proteínas no estructurales, junto con una proteína estructural (VPg), están codificadas al principio del genoma, cerca del extremo 5', en el ORF1. El resto de las proteínas estructurales (VP1 y VP2) están codificadas hacia el extremo 3' del genoma, en la región sub-genómica. Los Norovirus y los Vesivirus codifican la proteína VP1 en un ORF distinto (ORF2), mientras que los Sapovirus y

Lagovirus codifican la VP1 concomitantemente con el ORF1 conteniendo las proteínas no estructurales. Todos los Calicivirus tienen un pequeño ORF cerca del extremo 3' del genoma cuya información codifica para la proteína menor de cápside VP2.

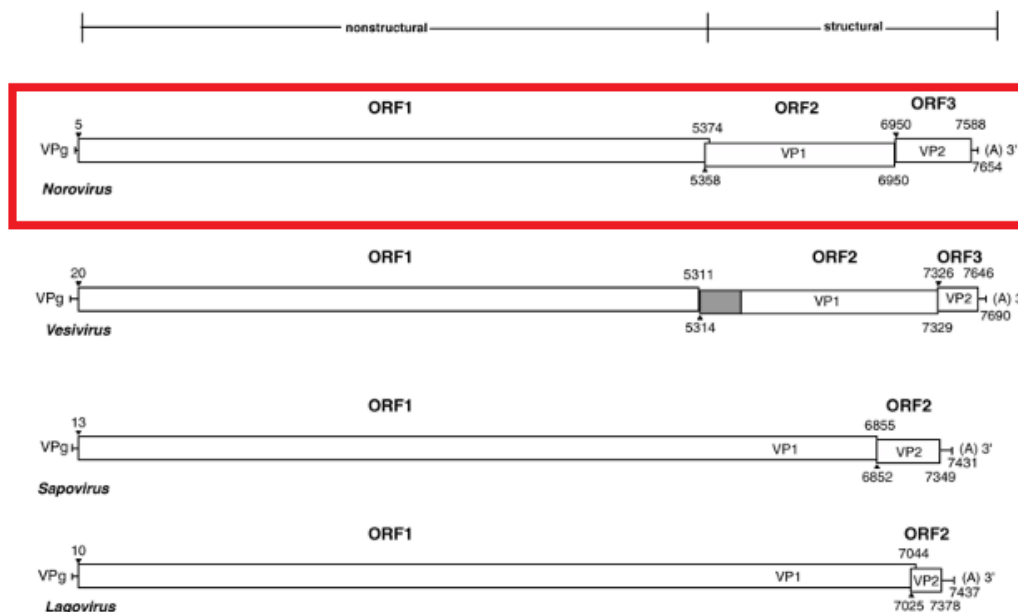


Figura 4-Ilustración de la organización genómica de los principales géneros de *Caliciviridae*, se recuadra en rojo la organización correspondiente a Norovirus. Adaptado de Fields Virology, 5ta edición [24].

VP1, VP2 y VPg se encuentran en el virión maduro y son las proteínas estructurales [24]. VP1 es la proteína de cápside mayoritaria encontrada en los viriones maduros, tiene un peso molecular de aproximadamente 60.000 Da (daltons)[52] y su predominancia en la estructura de la cápside es consistente con su rol crítico como determinante antigénico y en la interacción del virus con la célula hospedadora. VP2 tiene un peso molecular de entre 12.000 y 29.000 Da y es considerada una proteína estructural minoritaria ya que se encuentra solo en dos copias por virión y su presencia no es necesaria para que se generen pseudo-partículas virales (VLPs)[26]. Las VLPs son estructuras no infectivas similares a las cápsides nativas de los virus que se generan espontáneamente cuando se sintetizan proteínas de cápside virales en un sistema heterólogo de expresión génica, debido a la capacidad de estas proteínas de auto-ensamblarse. Sin embargo, se propone que su presencia le confiere estabilidad a la estructura de la partícula viral [7]. Por último VPg es una proteína que se encuentra unida covalentemente a los ARN genómicos y sub-genómicos de este virus en células infectadas y está presente como componente menor de los viriones en una cantidad estimada de una o dos copias por partícula [26].

Las proteínas no estructurales de los Calicivirus derivan del procesamiento protelítico de una gran poliproteína de aproximadamente 200.000 Da (**Figura 5**) codificada por el ORF 1. El procesamiento se da por medio de una proteinasa codificada por el virus, similar a la 3C Cisteín proteinasa (3CLpro por sus siglas en inglés). La poli-proteína de los Norovirus es clivada en 5 sitios, dando lugar a 6 productos maduros [26].

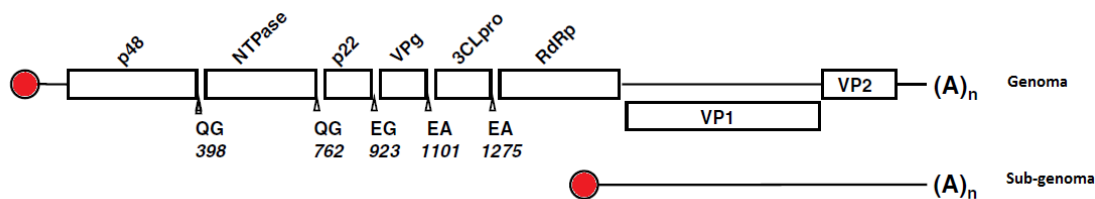


Figura 5- Esquema de la organización genómica de Norovirus con las proteínas estructurales y no estructurales y su ARN sub-genómico. Los sitios de clivaje se marcan con pequeños triángulos. Las proteínas VPg unidas covalentemente al genoma y al sub-genoma se marcan con círculos rojos. Adaptado de Hardy, 2006 [26].

Las identidades y funciones de las proteínas codificadas por el ORF1 fueron deducidas en su mayoría buscando motivos proteicos conservados utilizando predicciones a partir de secuencias codificantes. El primer producto de la poliproteína desde el extremo 5' es p48, de función desconocida y tamaño variable. Se propuso que p48 podría tener una función en el anclado de complejos replicativos. En segundo lugar se constató la presencia de una NTPasa sin actividad helicasa muy similar a 2C de poliovirus [26]. En tercer lugar en la poliproteína se codifica p22, previamente sin evidencia alguna sobre su función, recientemente se ha reportado que podría ser responsable del desmantelamiento del aparato de Golgi interfiriendo con la secreción de proteínas celulares, siendo importante en la patogenia del virus [54, 55]. A continuación se encuentra la proteinasa 3CLpro mencionada anteriormente, encargada del procesamiento proteolítico de la poliproteína codificada por ORF1. Por último, en el orden espacial del ORF1, se dilucidó la presencia de una ARN polimerasa ARN dependiente viral (RdRp por sus siglas en inglés). Además de tener dominios estructurales típicos de RdRp de otros virus de ARN positivo (El dominio palma, dedos y pulgar), el precursor RdRp-3Cpro parecería ser una proteína bifuncional y presentaría funciones mixtas de actividad proteasa y polimerasa [26].

Estructura

Los Calicivirus exhiben una simetría icosaédrica con un número de triangulación $T=3$. La cápside está compuesta por 180 copias de la proteína estructural principal VP1 organizadas en 90 dímeros que forma una cápsula protectora de la cual protruyen 90 capsómeros con forma de arco, estos se arreglan de tal forma que en la superficie del virión se pueden ver 32 estructuras con forma de copa, o cáliz en torno a los ejes de simetría 5 y 3 (**Figura 6**). Fueron estas estructuras las que le dieron el nombre a la familia. El auto-ensamblado de la proteína VP1 en VLPs es un proceso eficaz y no requiere de interacción con ARN [32] o con la proteína menor de la cápside VP2[42]. El hecho de que VP1 sea la única proteína necesaria para generar la cápside de NoV la hace un objeto de estudio muy interesante debido a que en ella se deben encontrar todos los determinantes antigénicos, estructurales y de interacción con el hospedador. Se ha resuelto la estructura atómica de NoV por cristalografía de rayos X [51]. VP1 consta de dos grandes dominios, el dominio de coraza (S, por su nombre en inglés, Shell) y el dominio protruyente (P, por su nombre en inglés, protruding), que a su vez se subdivide en dos, P1 y P2. Ambos dominios se conectan por una región bisagra (**Figura 7**). El dominio S está constituido por los 225 primeros aminoácidos (aa) amino-terminales y parecería tener entre

los aa 50 y 225 una conformación clásica de cápsides virales de 8 hojas β anti-paralelas llamada Jelly-roll.

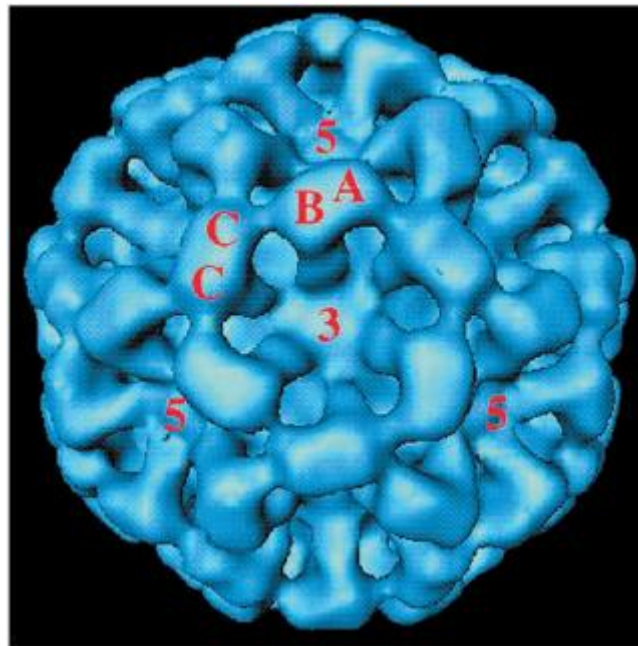


Figura 6- Modelo de la cápside viral de Norovirus, mostrando los capsómeros en su superficie que forman la estructura en forma de cáliz que le da el nombre a la familia *Caliciviridae*. Adaptado de Prasad y col, 1999 [51].

Este dominio es el responsable de formar la parte interna de la cápside, rodeando el ARN genómico y manteniendo los contactos necesarios para el icosaedro de estructura $T=3$. El dominio P (225 aa hacia el extremo C-terminal) es el responsable de los contactos que generan la dimerización de la proteína y de las protrusiones con forma de copa que salen de la cápside. P1 consiste de los aa 226 a 278 y 406 a 520, mientras que P2 es una inclusión en P1 y consiste de los aa 279 a 405 (**Figura 7**). Los dominios S y P1 presentan un grado relativo de conservación de secuencia mientras que la variación parece acumularse en P2, particularmente entre los aa 280 y 400 [51]. Tomando en cuenta esto y la ubicación en la superficie del virión es de esperar que P2 presente las características de especificidad de cepa e interacción con el receptor celular [14].

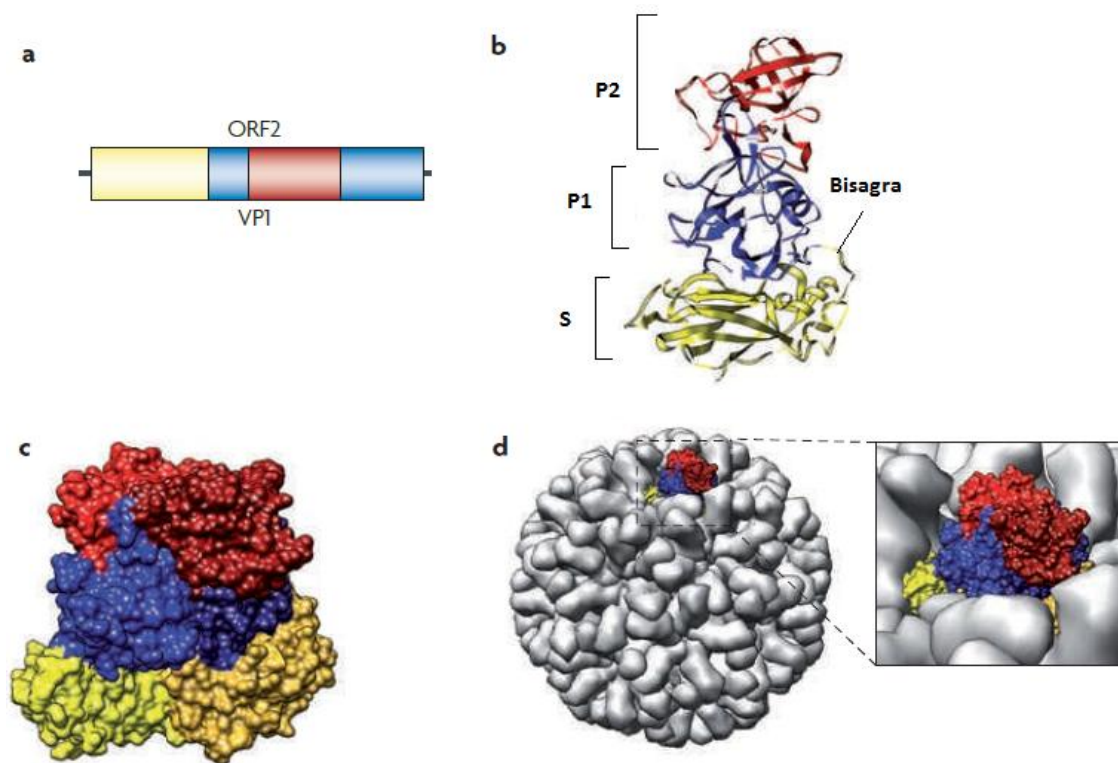


Figura 7- Estructura de Norovirus (NoV). **A-** Ubicación de los distintos dominios de VP1 dentro de su secuencia codificante, el gen de VP1 se encuentra subdividido en códigos de colores correspondientes a los distintos dominios que conformará la proteína observados en B. **B-** Modelización de un monómero de VP1 presentando los dominios S (amarillo) y P subdividido en P1 (azul) y P2 (rojo) y la región bisagra que conecta los dos dominios principales. **C-** Representación de un dímero de VP1 como los que componen la cápside viral, el código de colores se mantiene al igual que en B, uno de los monómeros se representa con colores más opacos. **D-** Estructura T=3 de la cápside viral conformada por 90 de los dímeros de VP1, se demuestra como la conformación estructural expone el dominio P2 a la superficie. Adaptado de Donaldson y cols 2010 [14].

VLPs de Norovirus, su importancia y relación con Baculovirus

Debido a la falta de un cultivo celular en el que repliquen exitosamente estos virus, las VLPs han jugado un papel fundamental en la dilucidación de la mayoría de las características de NoV. La mayoría de los trabajos donde se sintetizan dichas VLPs utilizan Baculovirus como sistema de expresión heterólogo [8, 32, 52]. Estos virus pertenecen a la Familia *Baculoviridae* que se subdivide en dos géneros “Granulosis Viruses” y “Nuclear Polyhedrosis Viruses”. A este último género pertenece *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus, la especie de Baculovirus más estudiada y de la cual se originaron los sistemas de expresión basados en Baculovirus. Presentan un genoma compuesto por ADN doble hebra circular e infectan artrópodos [38]. Debido a que presenta un ciclo de vida bifásico, hay genes bajo el control de promotores fuertes, como el gen de la Polihedrina o el gen p10, que son innecesarios para la replicación del virus en un cultivo celular. De forma que es posible reemplazar estos genes con

genes de interés para la producción de proteínas. Además, las células de insecto utilizadas para replicar Baculovirus son semi-adherentes, permitiendo el escalado de una producción de forma efectiva. Por último, ya que estas células son eucariotas, el sistema Baculoviral permite el ensamblado macro-molecular y el correcto procesamiento post-traducciona l de las proteínas de interés [38]. Cabe destacar que en dicho sistema se constató que además de las típicas VLPs de 38 nm T=3, se podían encontrar partículas más pequeñas con diámetro de aproximadamente 23 nm. Se propuso que estas partículas, que aparentemente mantenían los epítopes inmuno-dominantes y estructurales, podrían ser una conformación alternativa de 60 unidades de la cápside con un T=1 [58].

La producción de VLPs fue utilizada entre otras cosas para la investigación de relaciones antigénicas, estudios estructurales, en análisis de unión e interacción con receptores celulares, de los que se ha propuesto pueden ser los antígenos de histo-compatibilidad sanguínea [14]. Así como la posible producción de vacunas y para desarrollar kits de diagnóstico [24]. Determinar la incidencia de NoV de manera más acertada y eficiente sigue siendo un problema importante, por lo que el desarrollo de kits de detección es un tema de importancia actual. Para desarrollar kits de detección de NoV se utilizan VLPs como fuente abundante de antígeno para generar anticuerpos que luego cubren placas de ELISA (siglas en inglés de Ensayo inmuno-adsorbente ligado a enzima). De esta manera se pueden detectar antígenos virales en muestras de heces de pacientes con gastroenteritis [33]. Estos ensayos se evalúan de acuerdo a su especificidad, definida como la veracidad de la detección de muestras positivas, y la sensibilidad definida como la cantidad de muestras detectadas por el ensayo en comparación con el “gold-estándar” (en este caso RT-PCR) [46]. Estos ELISA’s parecen ser altamente específicos para el virus pero tienden a ser poco sensibles para detectar un amplio rango de NoV. La alta especificidad que presentan pueden hacer de estos ensayos una herramienta útil para diagnosticar brotes del virus, ya que en estos casos se dispone de una gran cantidad de especímenes y la detección fehaciente de solo algunas muestras puede ser suficiente para confirmar el agente etiológico [12]. Sin embargo, estos kits tienden ser genotipo-específicos para la cepa con que fueron generados y podrían subestimar la incidencia de NoV en regiones donde circulan variantes muy distintas a las utilizadas de base para el kit.

Las VLPs pueden a su vez ser utilizadas ellas mismas para cubrir las placas de ELISA y así detectar anticuerpos contra este virus en muestras de pacientes. Este tipo de ensayo se ha usado ampliamente para estudiar la sero-prevalencia de NoV en distintas poblaciones [33]. Al contrario que con los ensayos utilizando anticuerpos para detectar antígeno, estos ensayos presentan una gran reactividad cruzada entre los distintos anticuerpos presentes, y resulta difícil diferenciar que variante de NoV se está detectando y puede ser de hecho una combinación de distintas variantes con epítopes compartidos[33].

Un área interesante de estudio impulsada por VLPs es la ya mencionada producción de vacunas contra NoV. Un gran problema que se presenta en esta área es la falta de conocimiento existente en cuanto a la inmunidad obtenida contra este virus. Se ha comprobado mediante estudios de desafíos homólogos al virus que existe inmunidad a corto (6 a 14 semanas) y largo plazo (9 a 15 meses), pero inmunidad a mayor plazo (27 a 42 meses) no fue constatada [15]. Estudios en países en desarrollo han correlacionado la presencia de

anticuerpos contra NoV en suero, con la resistencia a la infección por NoV [15]. Esto sugiere que repetidas exposiciones si darían una protección contra la enfermedad. Tomando todo esto en cuenta, los principales desafíos para producir esta vacuna son: 1- la falta de conocimiento en cuanto a su inmunidad, 2 -la cantidad de genotipos distintos de NoV existentes 3- la evidencia de falta de protección cruzada entre estos distintos genotipos. 4- La necesidad de generar inmunidad en mucosas y la falta de conocimiento sobre como generarla. 5- El virus sigue siendo incultivable y 6- tampoco existe un modelo animal simple apropiado [15]. Teniendo esto en cuenta, se ha intentando generar vacunas utilizando VLPs de NoV como antígeno. Se encontró que una inmunización oral a ratones con VLPs logro inducir una respuesta inmune sistémica y de mucosas, incluso sin el agregado de adyuvantes [6]. De hecho se realizaron pruebas con voluntarios humanos de una vacuna a base de VLPs de una cepa GI.1 administrada intra-nasalmente, utilizando quitosano y monofosforil lípido A como adyuvantes. En este estudio se constató un aumento de IgA (inmunoglobulina de importancia en la inmunidad de mucosas) específica de NoV en el 70% de los individuos vacunados. Más aún, cuando se compararon el grupo que recibió la inmunización, con el grupo placebo, luego de un enfrentamiento con un NoV homólogo, se constató que tanto la frecuencia de infección como la gravedad de la gastroenteritis era menor en los individuos inmunizados [5]. Incluso un trabajo reciente podría aportar el camino para solucionar el problema de la protección cruzada. Parra y colaboradores desarrollaron una secuencia recombinante consenso de VP1 conteniendo regiones antigénicas de tres cepas distintas GII4 y observaron que si se realizaba una inmunización bivalente en conejos, utilizando VLPs de esta cepa consenso junto con VLPs de una cepa GI1 (virus de Norwalk) el espectro de protección cruzada se expandía [49]. Por último, cabe mencionar que la aplicación de las VLPs de NoV también han sido propuestas como plataforma para exponer epítopes de otros patógenos entéricos, ya que al estar adaptado de forma natural al tracto digestivo utiliza las mismas vías que estos patógenos [57].

Objetivos

Objetivos Generales

Expresar la proteína principal de cápside de Norovirus, VP1, de dos cepas autóctonas de Uruguay en un sistema de expresión basado en Baculovirus y evaluar su capacidad de producir VLPs.

Objetivos Específicos

- Amplificar y clonar el gen codificante para la proteína principal de cápside VP1 de 2 cepas autóctonas de Norovirus en el vector de transferencia pFastBac1.
- Poner a punto el crecimiento de la línea celular de insecto de *Spodoptera frugiperda* (Sf9).
- Construcción de los Baculovirus recombinantes mediante el sistema Bac-to-Bac (Invitrogen Inc.)
- Expresar la Proteína VP1 en células Sf9 mediante la infección con Baculovirus recombinantes.
- Detectar la expresión de VP1 y su capacidad de formar VLPs

Desarrollo Metodológico

1) Material biológico

Virus

- **Muestras:** Se utilizaron muestras de materia fecal de brotes ocurridos en el país, previamente evaluadas como positivas para NoV en el laboratorio de Virología. Fueron caracterizadas genéticamente como pertenecientes al genogrupo II, genotipo 4 y un recombinante del genogrupo II, genotipo 12 (NV2011_134_UY y NV2008_001_UY respectivamente).

Células Eucariotas

- **Sf9:** Estas células, junto con las Sf21, se utilizan tradicionalmente para los sistemas de expresión basados en Baculovirus y provienen del tejido ovárico de larvas del lepidóptero *Spodoptera frugiperda*. Las células Sf9 son un aislado clonal de Sf21 y son las células sobre las que se trabajará para producir los virus y las proteínas recombinantes. Presentan un buen crecimiento tanto en monocapa como en suspensión. Se mantuvieron a 28°C en medio de crecimiento Grace's Insect Medium con suero fetal bovino (SFB, GIBCO Life Technologies) al 10% y penicilina/estreptomicina/Fungizone® (ATB, Invitrogen Inc.) a concentración final de 100 Unidades/mL de penicilina, 100µg/mL estreptomicina y 0,25µg/mL Fungizone® y no tienen requerimiento de CO₂ extra [30].

Bacterias

- **NEB-5 alpha high efficiency:** Estas bacterias *E.coli* (New England Biolabs) químicamente competentes, derivadas de las células DH5α, son aptas para ser transformadas de forma eficiente para una variedad de aplicaciones. En este caso fueron transformadas con los plásmidos pFastBac1 recombinantes generados.
- **DH10Bac:** Células de *E.coli* (Invitrogen, Inc.) que contienen un bácmido y un plásmido auxiliar encargado de la síntesis de una transposasa (Tn7) y que confiere resistencia a la tetraciclina. El bácmido confiere resistencia a la kanamicina y contiene el genoma de Baculovirus con una señal de unión para el transposón bacteriano Tn7 insertado en la secuencia del gen LacZα, sin cambiar su marco de lectura. Estas bacterias se utilizan para generar los bácmidos recombinantes al ser transformadas con los vectores de transferencia recombinantes (pFastBac1) y permitiendo la transposición de las secuencias de interés desde el vector de transferencia al bácmido mediante la transposición sitio específica. Las colonias pueden ser luego seleccionadas por el método de alfa complementación debido a la ubicación del sitio de transposición [29].

Plásmidos

- **pAEUA2:** Este plásmido, presente en el laboratorio y construido por Valerie Revol-Guyot del Centro de Genética Celular y Molecular; CGMC, Lyon-Francia [60],

contiene el gen codificante para la proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein, GFP) bajo el control del promotor herpético inmediatamente temprano IE4. Fue utilizado para la construcción de un Baculovirus recombinante que exprese la GFP a modo de control y para poner a punto el sistema.

- **pFastBac1:** Este plásmido contiene un sitio de policlonado donde se insertan las secuencias de interés, flanqueado por el promotor de la Polihedrina de Baculovirus hacia el extremo 5' y una señal de poliadenilado hacia el extremo 3'. A su vez, contiene un marcador de selección correspondiente a un gen que confiere resistencia a la gentamicina. Este plásmido, es el vector de transferencia proporcionado por el sistema Bac-to-Bac (Invitrogen Inc.) para generar los bácmidos (que contienen el genoma de Baculovirus) recombinantes. Debido a esto, todo este cassette está flanqueado por secuencias para una transposición sitio específica (Tn7), necesario para la transposición hacia el bácmido. Además, fuera de esta región flanqueada por las secuencias Tn7, se encuentra otro marcador de selección, esta vez, representado por un gen que confiere resistencia a la ampicilina [29].

2) Extracción del ARNsc genómico

Primeramente se realizó la extracción del material genético viral a partir de muestras fecales empleando TRIzol® (Invitrogen Inc.) según el protocolo propuesto por el fabricante. Brevemente, se diluyó entre 0.1 y 0.2 g de la muestra en 1mL de buffer fosfato salino (PBS, pH 7.4), se tomó 200 µL de la suspensión y se agregó 500 µL de TRIzol®. Seguidamente se agregó 100 µL de cloroformo, se agitó vigorosamente por 15 min. A continuación se centrifugó 15 min a 14.000 rpm, 4°C y se recuperó la fase acuosa, que contenía el ARN. Luego, se precipitó el ARN agregando 250 µL de isopropanol, dejando reposar por 10 min como mínimo, a temperatura ambiente. Se centrifugó por 10 min a 14.000 rpm, 4°C y se descartó el sobrenadante. El sedimento fue lavado con EtOH al 75% y resuspendido en 30 µL de H₂Odd estéril a 56°C, luego se guardó a -80°C.

3) Amplificación del gen de VP1 mediante RT-PCR y del gen de la GFP por PCR

Luego de realizada la extracción de ARN genómico de NoV se generó el ADN copia mediante un ensayo de retrotranscripción utilizando cebadores hexaméricos randómicos. Con este molde de ADN copia se amplificó el fragmento deseado mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores específicos (**Tabla 1**). Para la GFP no fue necesaria una retrotranscripción.

3.1) Retro Transcripción

Se empleó la enzima Superscript II (Invitrogen Inc.), de acuerdo al protocolo propuesto por el proveedor. Se agregó a 8µL de la extracción de ARN para cada muestra, 2µL de una pre-mix conteniendo 240 ng de cebadores hexaméricos randómicos (Invitrogen Inc.), 0,5mM de dNTPs y H₂Odd estéril. Esta mezcla se calentó a 65°C por 5 min para luego incubarse 3 min en hielo. Luego se agregó 10 µL de la mix, para llegar a un volumen final de 20 µL, conteniendo su

respectivo Buffer Tris-HCl (50mM, pH 8,3), KCl (75mM) y $MgCl_2$ (3,0mM). Además de DTT (0.01M, Invitrogen Inc.), RNAsa Out (20 Unidades, Invitrogen Inc.), Retrotranscriptasa (200 Unidades) y H_2O dd estéril. Todas las concentraciones son expresadas como concentración final. Se incubó 10 min a 25 °C, se realizó la retrotranscripción a 42°C por 50 min y por último se inactivó la enzima a 72°C por 10 min. El ciclado se realizó en un termociclador Eppendorf (Mastercycler Personal). Para confirmar la presencia de NoV en las muestras se realizó una PCR con cebadores degenerados.

3.2) Diseño de oligonucleótidos y clonaje libre de enzimas de restricción

Los oligonucleótidos para amplificar GFP se diseñaron a partir de la secuencia del gen completo contenido en el plásmido pAEUA2., mientras que para VP1 se generó un alineamiento a partir de secuencias genómicas registradas y disponibles en la base de datos on-line GenBank. Para llevar a cabo las siguientes etapas del trabajo se recurrió a un método publicado recientemente [56], en donde se inserta un fragmento de ADN en un vector plasmídico pero sin necesidad de utilizar enzimas de restricción. De forma breve, la técnica consiste en diseñar un par de oligonucleótidos que amplifiquen el gen de interés pero que además tengan en sus extremos 5' secuencias con homología al vector, más específicamente, al sitio donde se pretende insertar el gen. De esta forma los productos de amplificación de esta primer PCR sirven como mega-cebadores en una segunda PCR donde se utiliza el vector como molde (**Figura 8**). Debido a esto, a los cebadores, tanto los de VP1 como los del gen de GFP, se les incluyó secuencias en sus extremos correspondientes a pFastBac1. Estas secuencias fueron diseñadas a partir de la secuencia de este plásmido, de forma que el gen foráneo se inserte en el sitio múltiple de clonaje, entre el sitio de corte para Eco RI y Not I (**Figura 8**). Se utilizó el mismo cebador directo para ambas cepas de NoV, mientras que dos cebadores reversos distintos fueron diseñados para lograr amplificar las distintas cepas (**Tabla 1**). Se diseñaron cebadores internos para VP1 de NoV con la finalidad de obtener la secuencia completa de dicho gen (**Tabla 1**).

3.3) PCR para obtener Mega-cebador

Se utilizó la enzima Platinum Taq DNA polimerasa (Invitrogen Inc.). Para un volumen final de 50 μ L se agregó el buffer de reacción sin $MgCl_2$ (20mM Tris-HCl, pH 8.4, 50mM KCl), $MgCl_2$ (1,5mM), el cebador directo (0,3 μ M) y reverso (0,3 μ M), mix de dNTPs (0,2 μ M), en el caso de NoV se agregó 5 μ L de muestra (obtenida en la parte 3.1) mientras que para GFP se agregaron 2.2 ng del plásmido pAEUA2. Por último, se agregó la polimerasa (1 Unidad) y se completó con H_2O dd estéril. Todas las concentraciones son expresadas como concentración final. Se realizó el ciclado en un termociclador Eppendorf (Mastercycler Personal) de la siguiente forma: se calentó a 94°C por 2 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, hibridación a 65°C por 30 segundos y polimerización a 72°C por 2 min. Los se purificaron estos mega-cebadores para su uso posterior.

Nombre	Secuencia (5'-->3')	Polaridad	Objetivo	Uso
Noro ORF2 Rfclon For	GGATCCCGGTCCGAAGCGCGCGGAATTCAA GTGAATGAAGATGGCSTCKA	Directo	VP1 de Norovirus GII4 y GII12	Amplificación y secuenciado
Noro RF/ORF2 GII4 var2	GACTGCAGGCTCTAGATTCGAAAGCGGCCGC TTATAATGCACGTCTRCGCCCCGYTCC	Reverso	VP1 de Norovirus GII4	Amplificación y secuenciado
Noro RF/ORF2 GII Recom Rev	GACTGCAGGCTCTAGATTCGAAAGCGGCCGC TTAYTGACCCCTTCTRCGCCCATCCCC	Reverso	VP1 de Norovirus GII12	Amplificación y secuenciado
GFP For Rfclon	GGATCCCGGTCCGAAGCGCGCGGAATTCAA TGGTGAGCAAGGGC	Directo	Green Fluorescent Protein	Amplificación y secuenciado
GFP Rev Rfclon	GACTGCAGGCTCTAGATTCGAAAGCGGCCGC TTACTTGTACAGCTC	Reverso	Green Fluorescent Protein	Amplificación y secuenciado
NVGII4 for534-556cd	GATAGCAATGTTGTACACACCAC	Directo	Interior de VP1 Norovirus GII4	Secuenciado
NVGII4 rev1310- 1327cd	CGCTGCATCCGGGCATAG	Reverso	Interior de VP1 Norovirus GII4	Secuenciado
NVGII12 for590-607cd	CTGTCTCTGTAGAGTGC	Directo	Interior de VP1 Norovirus GII12	Secuenciado
NVGII12 rev1037- 1057cd	CAATCACTGCATCATGGCTCC	Reverso	Interior de VP1 Norovirus GII12	Secuenciado
<u>pFastBac for</u>	TAT TCC GGA TTA TTC ATA CC	Directo	pFastBac1	Secuenciado
<u>pFastBac rev</u>	TTC AGG TTC AGG GGG AGG TG	Reverso	pFastBac1	Secuenciado
<u>pUC M13 for</u>	GTTTTCCAGTCACGAC	Directo	Bácmido	Confirmación
<u>pUC M13 rev</u>	CAGGAAACAGCTATGAC	Reverso	Bácmido	Confirmación

Tabla 1-Cebadores utilizados en este trabajo. Para los cebadores utilizados en el clonaje libre de enzimas de restricción se muestra en negrita la secuencia correspondiente al vector pFastBac1. Los cebadores comerciales se encuentran subrayados, el resto fueron diseñados en este trabajo.

4) Obtención y producción de los stocks de Baculovirus Recombinante

Para la construcción de los Baculovirus recombinantes se utilizó el sistema Bac-to-Bac Expression System (Invitrogen Inc.) [29]. Brevemente, este sistema se basa en la transposición sitio específica entre: 1) un plásmido donador pFastBac1 (o también llamada plásmido de transferencia) que contiene el gen de interés bajo la influencia del promotor fuerte de Baculovirus (en nuestro caso es el promotor del gen de la Polihedrina y 2) un bácmido propagado en *E. coli* que contiene el genoma del Baculovirus. De esta manera cuando se transforman dichas bacterias con el plásmido donador, en donde se insertó el gen foráneo, ocurre la transposición sitio específica al bácmido. Las bacterias con bácmidos recombinantes son seleccionadas por el método de alfa complementación ya que la señal de transposición en el bácmido está incluida en una zona que codifica para el péptido LacZ. Luego se transfectan las células de insecto (*Spodoptera frugiperda*: Sf-9) con el bácmido purificado y se obtiene la primera producción del Baculovirus recombinante que expresa la proteína de interés (**Figura 9**).

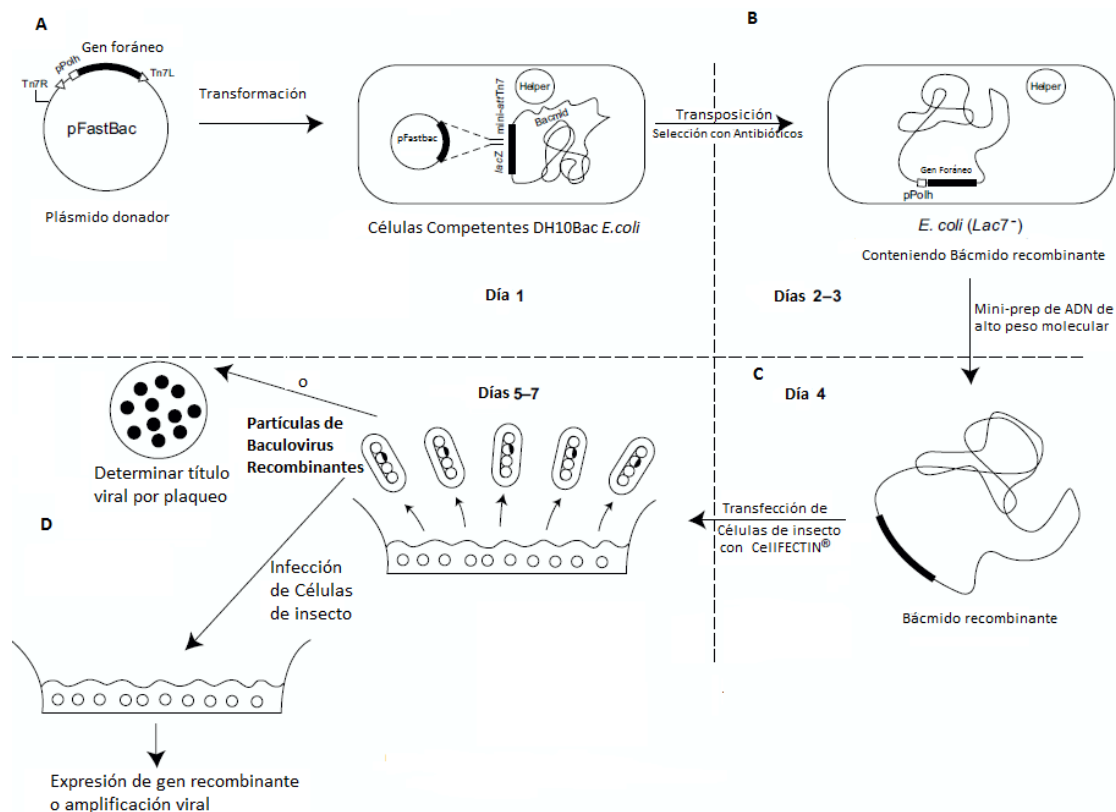


Figura 9-Representación gráfica del funcionamiento del sistema Bac-to-Bac. En la parte A se aprecia el plásmido donador pFastBac con el gen foráneo insertado, dicho plásmido se utiliza para transformar células competentes DH10Bac, estas células contienen el báculo (que a su vez contiene el genoma de Baculovirus) y un plásmido auxiliar o “helper” que codifica para la enzima responsable de la transposición sitio específica. En la parte B se ve como una vez transformadas las bacterias con el plásmido donador, ocurre la transposición sitio específica entre éste y el báculo, así el gen es insertado en el genoma del Baculovirus. En la parte C se purifica el báculo recombinante. En la parte D se utiliza el báculo purificado para transfectar células de insecto y conseguir la primera producción de partículas virales recombinantes. Estas pueden luego ser tituladas por plaqueo o utilizadas para infectar células nuevamente para amplificar el stock viral o directamente conseguir la expresión de la proteína de interés. Adaptado del manual de usuarios del sistema Bac-to-Bac (Invitrogen Inc.) [29].

4.1) Construcción de los plásmidos pFastBac1 recombinantes conteniendo los genes foráneos

A partir del producto de amplificación del gen de VP1 y GFP se procedió a insertar el mismo dentro del Sitio Múltiple de Clonaje que existe en el plásmido pFastBac1, entre los sitios de restricción para Eco RI y Not I. Dicho plásmido es el vector de transferencia apropiado para el paso siguiente de construcción del Baculovirus recombinante. Para generar los plásmidos recombinantes se prosiguió con la segunda parte de la metodología de clonaje sin enzimas de restricción, utilizando el producto de amplificación de la parte 3.3 como un mega-cebador para una PCR que requiere el plásmido pFastBac1, sin inserto, como molde. Se utilizó la enzima Phusion High fidelity polymerase (Finnzymes). El protocolo, de acuerdo a lo estipulado por el fabricante, fue: para un volumen final de 50µL se agregó el buffer de reacción phusion HF 5X utilizado al 1X, la mix de dNTPs (200µM cada uno), el mega-primer purificado correspondiente a cada construcción (200ng), el molde de ADN pFastBac1 sin inserto (40ng), la polimerasa (1,6

unidades) y se completó con H₂Odd estéril. El ciclado se realizó en un termociclador Eppendorf (Mastercycler Personal) y se realizó de la siguiente forma: se calentó a 98°C por 30 segundos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 98°C por 10 segundos, hibridación a 62°C por 30 segundos y polimerización a 72°C por 3 min, y una extensión final a 72°C por 7 min.

De acuerdo a la técnica de clonaje libre de enzimas de restricción, el producto de PCR fue digerido con la enzima Dpn I para eliminar el plásmido parental pFastBac1 sin genes foráneos insertados, usado como molde. Una vez librado del molde en la reacción, se transformó inmediatamente bacterias *E.coli* NEB 5-alpha (New England Biolabs) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Las células se descongelaron en hielo por 10 min, se agregó 1pg a 100 ng del plásmido y se mezcló suavemente. Se dejó la mezcla en hielo por 30 min. Se realizó un choque térmico poniendo el tubo en H₂O a 42°C por 30 segundos y se dejó reposar en hielo por 5 min. Se agregó 950µL de medio S.O.C. y se incubó a 37°C con una agitación de 250 rpm por 60 min. Se sembraron dos placas de agar LB-ampicilina (100µg/mL) por plásmido recombinante, una con 50µL de la transformación y otra con 150µL. Se incubaron durante la noche (ON) a 37°C. Se picaron colonias y se realizó un minicultivo en medio LB-ampicilina líquido ON con agitación a 220 rpm. Luego de 18 horas se seleccionaron los mini-cultivos que presentaron crecimiento y se realizó la extracción de los pFastBac1 recombinantes. La extracción se realizó con el QIAprep spin miniprep kit (Qiagen, CA, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se confirmó la identidad y correcta inserción de los genes de interés mediante secuenciación. Los cebadores utilizados se encuentran listados en la **Tabla 1**.

4.2) Construcción de los bácmidos recombinantes conteniendo los genes foráneos

A continuación se transformaron bacterias DH10Bac (Invitrogen, Inc.) con los pFastBac1 recombinantes de manera de que ocurra la transposición sitio específica entre el plásmido donador y el bácmido conteniendo el genoma de Baculovirus. Se siguieron las instrucciones del protocolo proporcionado por el fabricante. Se descongelaron las bacterias en hielo por 10 min, se agregaron 100µL de la suspensión de células en un tubo Falcon de 15 mL. A este tubo se le añadió 1 ng de plásmido donador diluido en 5µL de H₂Odd estéril y se mezcló suavemente. Se incubó la mezcla en hielo por 30 min. Se realizó un choque térmico a 42°C por 45 segundos. Se dejó reposar por 2 min en hielo, luego se agregó 900µL de medio S.O.C. y se dejó 4 horas en agitador a 37°C a 225 rpm. Se plaquearon 100µL puros y 100µL de una dilución 1/10 en medio S.O.C., en LB agar conteniendo peptona (0.01 g/mL), extracto de levadura (0.005g/mL), cloruro de sodio (0.01g/mL), agar (0.012g/mL), kanamicina (50µg/mL), gentamicina (7µg/mL) y tetraciclina (10µg/mL), Bluo-Gal (100µg/mL) e IPTG (40µg/mL) y se incubó durante 48 horas a 37°C. Una vez obtenidas las colonias con los posibles bácmidos recombinantes (colonias blancas), se realizó un segundo paso de aislamiento de las colonias por sembrado en estrías en placas con las mismas características, se dejaron 48 horas incubando. Posteriormente, se picaron nuevamente colonias blancas y se crecieron mini-cultivos en medio LB líquido conteniendo kanamicina (50µg/mL), gentamicina (7µg/mL) y tetraciclina (10µg/mL) y se llevó a cabo el protocolo de extracción de bácmidos también propuesto por el fabricante. Brevemente, Se tomaron 1,5 mL de mini-cultivo y se centrifugó a 14.000 rpm por 1 min. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 0,3 mL de solución I [15 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10mM EDTA, 100µg/mL RNAsa A]. Se le añadió 0,3 mL de solución II (0,2 M NaOH, 1%

SDS) y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Luego se le añadió 0,3mL de acetato de potasio 3M (pH 5,5) y se incubó en hielo 5-10 min. Se centrifugó por 10 min a 14.000 rpm y se transfirió el sobrenadante a otro tubo con 0,8 mL de isopropanol absoluto. Se incubó en hielo de 5-10 min y se centrifugó por 15 min a 14.000 rpm. Se removió el sobrenadante y se agregó 0,5 mL de EtOH 70% para lavar el sedimento obtenido y se volvió a centrifugar por 5 min a 14.000 rpm. Se secó el sedimento (conteniendo el material genético precipitado) a temperatura ambiente por 5-10 min, se resuspendió en 40µL de H₂Odd estéril y se guardó a -20°C. Además se detectó la presencia de inserto en los bácmidos purificados mediante una PCR con la enzima Taq platinum (Invitrogen Inc.) utilizando los oligonucleótidos “pUC M13 for” y “pUC M13 rev” (**Tabla 1**) como se indica en el manual del sistema Bac-to-Bac [29] pero adaptado a volumen final de 25µL. El ciclado se realizó en un termociclador Thermo Scientific (PCR Sprint Thermal Cycler) de la siguiente manera: 2 min a 94°C seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos y 72°C por 4 min, con un último paso a 15°C por 30 segundos.

4.3) Obtención del inóculo inicial de Baculovirus recombinantes

Una vez obtenidos los bácmidos recombinantes se procedió a construir los Baculovirus recombinantes transfectando la línea celular de *Spodoptera frugiperda* (Sf9). El protocolo de transfección se basó en el propuesto por el fabricante pero se adaptó para realizarse en una botella F25cm² y fue el siguiente: se sembraron 2,0 x 10⁶ células por botella con medio con ampicilina y estreptomycin al 0,5X (50 unidades/mL penicilina y 50 µg/mL estreptomycin). Se dejó adsorber 1 hora a 27°C y se prepararon dos soluciones, la solución A, con 12,5µL de miniprep de bácmido en 250µL de medio sin ATB y sin SFB (medio incompleto) y la solución B con 15µL de CellFECTIN® (Invitrogen Inc.) en 250µL de medio incompleto. Se combinaron ambas soluciones y se dejaron incubando 45 min a temperatura ambiente. Se lavó las células con 5mL de medio incompleto. Se agregó 2mL de medio incompleto a cada tubo conteniendo la mezcla de CellFECTIN® y ADN y se mezcló suavemente. Se aspiró el medio de lavado de las células y se agregó la mezcla de CellFECTIN® y ADN. Se incubó 5 horas a 27°C. Se retiraron las mezclas de transfección y se agregó 5mL de medio 1% SFB y antibióticos. Se cosechó el virus a las 72 horas post-infección centrifugando el contenido de la botella a 1.500 rpm por 5 min y conservando el sobrenadante.

4.4) Amplificación de los inóculos iniciales de Baculovirus recombinantes

Se amplificó la cosecha inicial de Baculovirus recombinantes mediante 3 pasajes sucesivos, los dos primeros en F75cm² y el último en F175cm² a una multiplicidad de infección (MOI) de entre 0,01 y 0,1. La MOI es la relación existente entre la cantidad de partículas virales y la cantidad de células en el cultivo a infectar. El protocolo de amplificación fue el siguiente: se sembraron 6 x 10⁶ células por F75cm² y 14x10⁶ en F175cm² en medio 10%SFB con ATB y se dejó adsorber 1 hora a 28°C. Se retiró el medio y se agregó inóculo para una MOI de 0,01 y 0.1. El control de células se dejó con medio con SFB al 1% y ATB. Se incubó 1 hora a 28°C y sin retirar el inóculo se completó hasta 12 y 30 mL respectivamente con medio 1% SFB y ATB. Se dejó 72 horas a 28°C. Se centrifugó por 5 min a 1.500 rpm y se conservó el sobrenadante.

4.5) Titulación de los Baculovirus recombinantes por plaqueo viral

Se llevó a cabo un protocolo de titulación por focos fluorescentes para el Baculovirus expresando GFP y uno por placas de lisis para los Baculovirus expresando VP1. Brevemente, se sembraron $2,5 \times 10^5$ células por pocillo (placa de 24 wells) en medio 10% SFB y ATB y se dejó adsorber 1 hora a temperatura ambiente. Se retiró el medio y se sembraron 100µL de diluciones seriadas, en medio incompleto, de la muestra viral. El control de células se dejó con medio incompleto. A todos los pocillos se les agregó 100µL de medio incompleto y se dejó incubar 1 hora a temperatura ambiente. Se retiró el inoculo y se agregó el medio semisólido (dos partes medio 2X 20%SFB y 2X ATB, una parte medio 10% SFB con ATB y una parte de Agarosa low melting point al 4% (Invitrogen, Inc). Se dejó gelificar por 20 min y, para el plaqueo por focos fluorescentes del Baculovirus expresando GFP, se incubó a 28°C por 72 horas en un ambiente húmedo y se contaron los focos fluorescentes. Mientras que para el protocolo de placas de lisis empleado para los Baculovirus expresando VP1, se incubó a 28°C de 7 a 10 días. Se retiró el medio y se agregó 0.5 mL de formaldehído al 4% en PBS para fijar las células. Se dejó incubar 30 min a temperatura ambiente. Después de la fijación, se descartó la solución de formaldehído y se eliminó la capa de agarosa utilizando una espátula. Se agregó 0.1 mL de solución stock de azul de metileno (0.8% de colorante, 48% EtOH, 0.005% de KOH y H₂O) por placa y se incubó de 15 a 30 segundos. Se enjuagó cuatro veces con agua corriente y se dejó secar las placas invertidas sobre papel absorbente. Por último se observaron las células al microscopio y se contaron las placas de lisis. Los títulos se calcularon multiplicando el número de placas de lisis o focos fluorescentes por el recíproco del volumen del inoculo en mL y por el recíproco de la dilución de la muestra original. Se expresaron los títulos en unidades formadoras de placas por ml (ufp/mL) para el plaqueo donde se contaron placas de lisis, y en unidades formadoras de focos por mL (uff/mL).

5) Expresión y purificación de proteínas recombinantes

La producción de proteínas se realizó mediante un protocolo idéntico a los pasajes iniciales en botella F75cm² detallado en la parte 4.4 pero se sembraron 12×10^6 células por botella, se utilizó una MOI de 5 y se incubó 5 días a 28°C. De acuerdo a lo estipulado por Bertolotti-Cialert y cols, se cosechó el sobrenadante y las células y se centrifugó por 15 min a 1.500 rpm. Se mantuvo el sobrenadante y se centrifugó por 30 min a 12.000 rpm (rotor JA-20). Nuevamente se conservó el sobrenadante y se volvió a centrifugar 2 horas a 40.000 rpm (Beckman, 60Ti) [8]. Se mantuvo el sedimento que se resuspendió en 500µL, siempre se mantuvo la cadena de frío.

Se estimó la concentración de proteína obtenida mediante la técnica de Bradford utilizando seroalbúmina bovina como estandar. Se utilizó medio de cultivo Grace's Insect Medium con SFB (1%) y ATB como blanco.

6) Detección de la expresión de VP1 y evaluación de la formación de VLPs

6.1) SDS-PAGE

Se analizó la purificación del punto 5 mediante gel de SDS-PAGE para detectar la expresión de la proteína foránea VP1 a partir de células Sf9 infectadas con los Baculovirus recombinantes. Se realizó la corrida electroforética en una cuba vertical (Hoefer Scientific Instruments, The Sturdiel Gel Slab SE 400), se utilizó poliacrilamida a una concentración final de 12% para el gel separador y 5% para el gel concentrador. Se calentó 15µL de cada muestra con buffer de carga 5X (10% SDS, 0.5M β-Mercaptoetanol, 50% Glicerol, TRIS-HCl pH=6.8 0.31M, 0.5% Azul de Bromofenol, H₂O a completar) utilizado 1X, en termobloque a 90°C 5 min, luego se sembraron en los pocillos correspondientes. Se aplicó una corriente constante de 100V por 3 horas. Se utilizó como marcador de peso molecular el PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas INC.) y se sembraron 5µL. Las bandas se revelaron utilizando una solución Azul de Coomassie (0.05% Azul de Coomassie, 45% EtOH, 7% Acido Acético y H₂O destilada hasta completar), brevemente, se dejó agitando suavemente ON, luego se le reemplazó la solución de tinción por solución decolorante (30% EtOH, 10% Acido Acético y H₂O destilada hasta completar) para remover el exceso de tinción y se dejó 2 horas agitando suavemente. Finalmente se conservó el gel con solución de secado (68% de alcohol etílico, 2% glicerol y H₂O destilada hasta completar) en papel celofán transparente.

6.2) Microscopía Electrónica

Se evaluó la formación de VLPs por parte de VP1 mediante el análisis por microscopía electrónica de transmisión de las purificaciones del punto 5. Se utilizó el microscopio electrónico JEOL-JEM 1010, operado a 100kV. Se utilizó tinción negativa con Acetato de Uranilo al 2% diluído en H₂O. Se incubó 15µL de la muestra en una grilla de cobre de 200 mesh con film de Formvar y carbono por 2 min, luego se retiró el exceso y se incubó también por 2 min con 15µL Acetato de Uranilo. Las fotos fueron tomadas con una cámara digital Hamamatsu C-4742-95.

7) Electroforesis en geles de agarosa y secuencias

Los resultados de la amplificación del gen VP1 y GFP se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%, utilizando el buffer de corrida Tris-Acetato-EDTA (TAE) (40mM Tris, 20mM Ácido Acético y 1mM EDTA). Los mega-cebadores seleccionados fueron purificados, utilizando el kit de purificación de ácidos nucleicos “NucleoSpin Gel and PCR Clean-up” (Macherey-Nagel, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se estimó su concentración en gel de agarosa 1% comparando intensidades de banda con los marcadores de peso molecular utilizados (GeneRuler 100pb y 1kb DNA Ladder, Fermentas). Los plásmidos pFastBac1 con genes foráneos resultado de la transformación de bacterias NEB 5-alpha y la PCR para confirmar presencia del inserto génico en los bácmidos, también se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%, utilizando el buffer TAE. Mientras que los bácmidos recombinantes purificados fueron visualizados en un gel de agarosa 0,5% corrido por 6 horas a 25V utilizando el buffer de corrida TAE. Siempre se utilizó 1µL de Goodview (SBS Genetech Co., Ltd) cada 20 mL de gel de agarosa como agente para la tinción del material genético.

Se utilizó el servicio de secuenciación automática del Institut Pasteur de Montevideo y se realizó el análisis de las secuencias utilizando el software BioEdit versión 7.0.8.0. Los cebadores utilizados para secuenciar se encuentran en la **Tabla 1**.

Resultados

1) Obtención del gen de VP1 mediante RT-PCR y GFP por PCR

Para ambas cepas de NoV se obtuvo un producto de amplificación de aproximadamente 1700 pb mientras que para la GFP la banda obtenida fue de más de 700 pb (**Figura 10**). Todas las bandas pudieron ser purificadas directamente a partir de la reacción de PCR de forma correcta ya que no se vio amplificación inespecífica en ninguno de los casos. Se estimó la concentración de las bandas luego de purificadas, respecto a la concentración de las bandas del marcador de peso molecular, en 20ng/ μ L para NoV cepa GII12, 6,7ng/ μ L para NoV cepa GII4 y 25ng/ μ L para GFP (**Figura 11**).

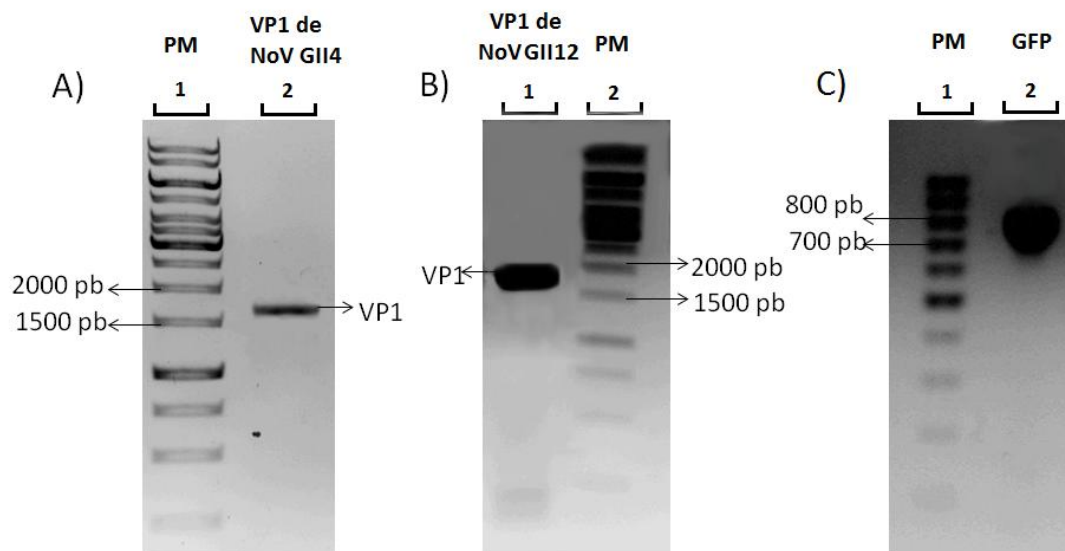


Figura 10- Visualización de los productos génicos amplificados de las distintas PCR's por electroforesis en geles de agarosa al 1%, utilizando buffer de corrida TAE, se encuentran marcados los tamaños de las bandas de peso molecular entre las cuales se encuentran los fragmentos de interés. A- Se observa la banda correspondiente al gen de la VP1 de la cepa GII4 de Norovirus (carril 2), este gen tiene un tamaño estimado de 1700 pares de bases (pb). El marcador de peso molecular (PM) utilizado fue el GeneRuler 1kb DNA ladder (Fermentas) y se corrió en el carril 1. B- En este caso se observa la banda correspondiente al gen de la VP1 de la cepa GII12 de Norovirus (carril 1) que tiene un tamaño estimado de 1700 pares de bases, el marcador de peso molecular (carril 2) utilizado también fue el Generuler 1kb DNA ladder (Fermentas). C- Por último la banda correspondiente a GFP (carril 2) cuyo tamaño estimado es de 700 pb, en este caso el marcador de peso molecular (carril 1) utilizado fue el GeneRuler 100pb DNA ladder (Fermentas).

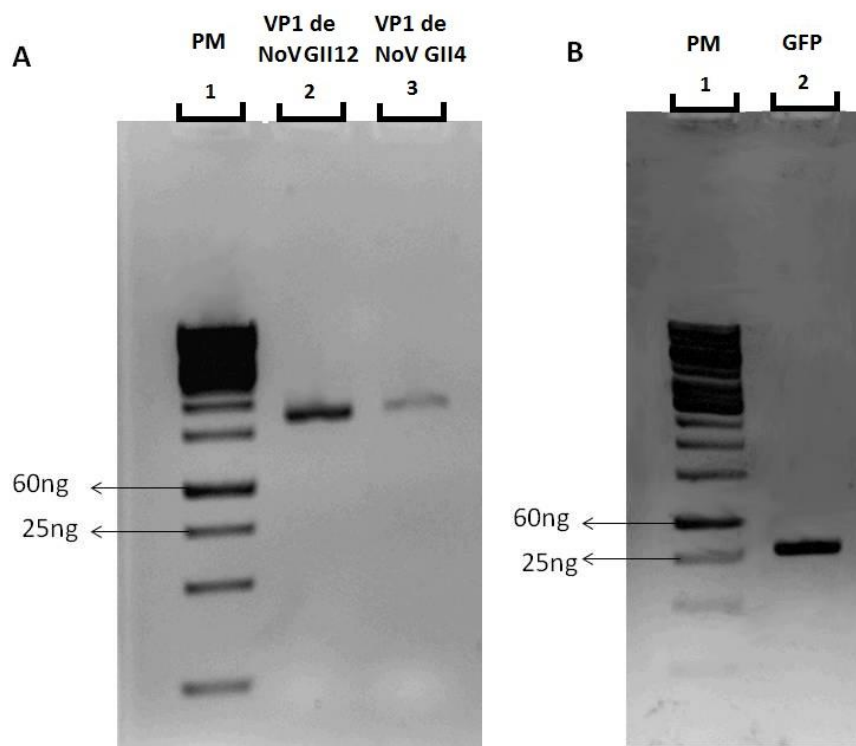


Figura 11- Visualización de las purificaciones de los distintos mega-cebadores por electroforesis en geles de agarosa al 1%, utilizando buffer de corrida TAE, se marcan con flechas la concentración de material genético a la que corresponde cada intensidad de banda de peso molecular entre las cuales se encuentran los fragmentos de interés. A- El marcador de peso molecular (PM) utilizado fue el GeneRuler 1kb DNA ladder (Fermentas) y se corrió en el carril 1, la banda correspondiente al gen de la VP1 de la cepa GII12 de Norovirus se corrió en el carril 2. La banda correspondiente al gen de la VP1 de la cepa GII4 de Norovirus se corrió en el carril 3. Se corrieron 3µl de cada una de las purificaciones B- Se corrieron 3µl de la purificación correspondiente a GFP en el carril 2, en este caso el marcador de peso molecular (carril 1) utilizado también fue el GeneRuler 1kb DNA ladder (Fermentas).

2) Obtención de los Baculovirus recombinantes

2.1) Plásmidos *pFastBac1* Recombinantes

Utilizando los productos de amplificación con las secuencias de inserción en sus extremos como mega-cebadores, se realizó la segunda ronda de PCR del clonaje libre de enzimas de restricción como se detalló anteriormente en el punto **3.3** del desarrollo metodológico. Se observaron bandas dentro del rango de peso molecular estimado, si bien el marcador de peso molecular para NoV resultó difícil de diferenciar (**Figura 12**). El tamaño estimado de los plásmidos recombinantes fue aproximadamente 6.500 pb para las cepas de NoV y 5.700 pb para GFP. Se calculó 4775 pb del plásmido sumado a aproximadamente 1700 pb del inserto para NoV mientras que para GFP el inserto se calculó de aproximadamente 700 pb. El plásmido

correspondiente a GFP migró un poco más lento de lo esperado y se ubicó levemente por encima de las 6.000 pb.

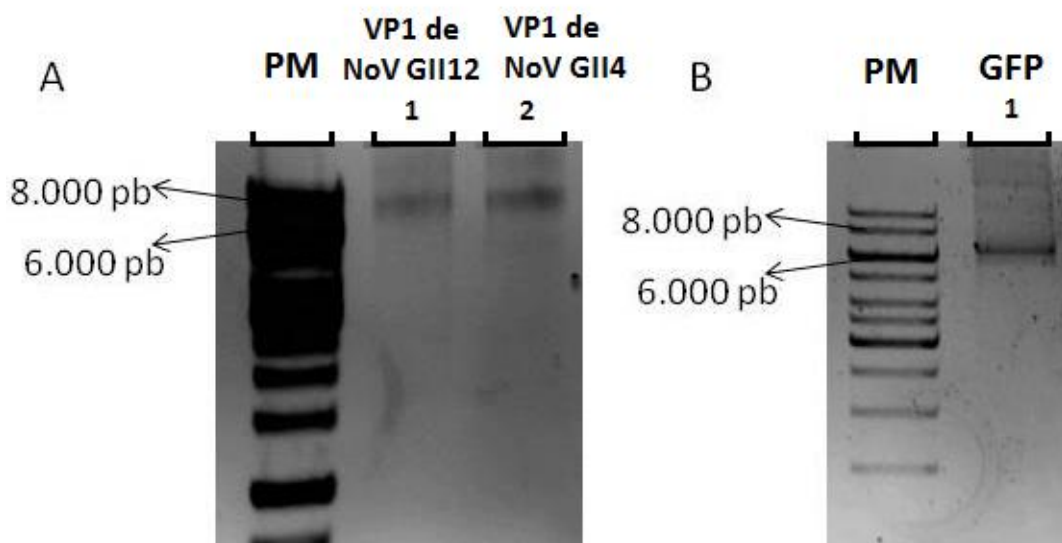


Figura 12- Visualización de la segunda ronda de PCR del clonaje libre de enzimas de restricción por electroforesis en geles de agarosa al 1%, utilizando buffer de corrida TAE, se encuentran marcados con flechas el peso molecular entre las cuales se encuentran los fragmentos de interés. A- El plásmido recombinante conteniendo el gen de VP1 de la cepa GII12 de Norovirus se corrió en el carril 1. La banda correspondiente al plásmido conteniendo el gen de la VP1 de la cepa GII4 de Norovirus se visualiza en el carril 2. B- El plásmido conteniendo el gen de la proteína fluorescente verde (GFP) se vislumbra en el carril 1. En ambos casos el marcador de peso molecular utilizado fue el GeneRuler 1kb DNA ladder (Fermentas).

Como se detalló anteriormente en el punto **4.1** del desarrollo metodológico, se transformaron bacterias competentes NEB 5-alpha (New England Biolabs) y se realizó una extracción de los plásmidos recombinantes. Se picaron 8 colonias de NoV GII12, 3 de NoV GII4 y 4 de GFP, de las 8 extracciones realizadas para la cepa GII12 de NoV se eligieron 2 que presentaban un patrón de migración más lento que el resto (**Figura 13**), sugiriendo la presencia del inserto, y se mandaron a secuenciar. Para la cepa GII4 de NoV solo se constató una extracción de migración diferencial (**Figura 13**) y también se mando a secuenciar, además se eligió otra de migración más rápida (menor peso molecular) de todas formas para el secuenciado. En cuanto a la GFP se constataron dos extracciones con una migración levemente menor que las otras (**Figura 14**) y fueron estas las elegidas para la secuenciación.

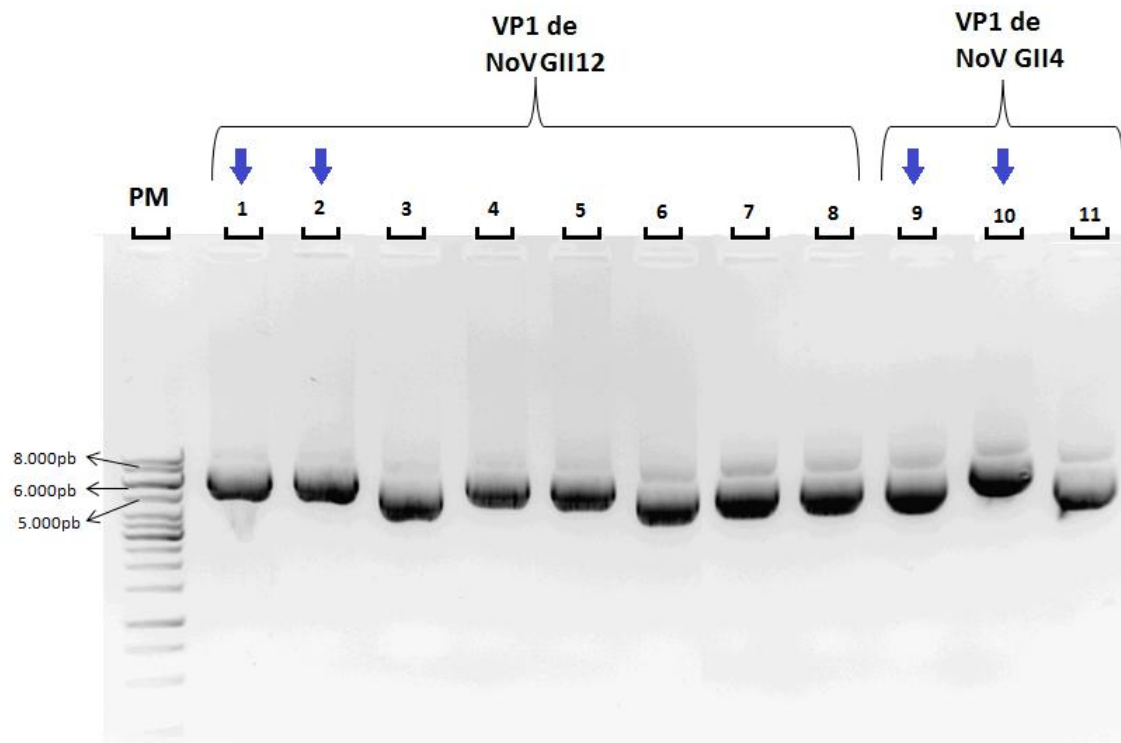


Figura 13- Electroforesis en gel de agarosa al 1% mostrando los resultados de las extracciones de los plásmidos recombinantes pFastBac1 a partir de las colonias para VP1 de las cepas GII12 y GII4 de Norovirus (NoV). Se utilizó buffer de corrida TAE, se sembraron 2 μ L de cada extracción y el marcador de peso molecular (PM) utilizado fue el GeneRuler 1kb DNA ladder (Fermentas). Se encuentran indicados el peso molecular de las bandas del marcador entre las cuales se encuentran los fragmentos de interés. Con flechas azules se muestran las extracciones que presentaron diferencia en la migración y por tanto se seleccionaron para mandar a secuenciar.

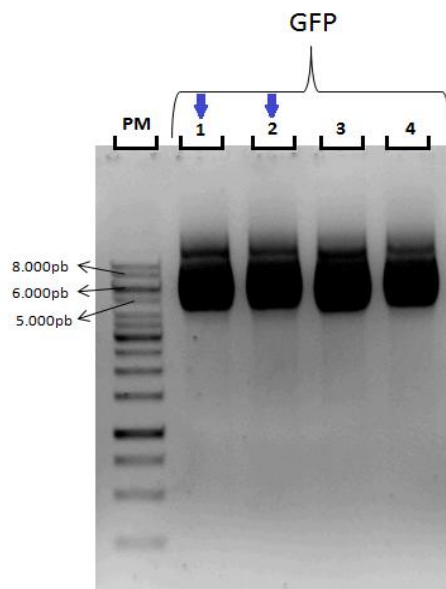


Figura 14- Electroforesis en gel de agarosa al 1% mostrando los resultados de las extracciones de los plásmidos recombinantes pFastBac1 a partir de distintas colonias para la proteína fluorescente verde (GFP). Se utilizó buffer de corrida TAE, el marcador de peso molecular (PM) utilizado fue el GeneRuler

1kb DNA ladder (Fermentas). Se marca el peso molecular de las bandas entre las cuales se encuentran los fragmentos de interés. En los carriles 1- 4 se sembraron 2µL de muestra correspondiente a colonias transformadas con plásmidos conteniendo el gen para GFP. Con flechas azules se muestran las extracciones que presentaron una mínima diferencia en la migración y por tanto se seleccionaron para mandar a secuenciar.

Una de las extracciones enviadas a secuenciar para la cepa GII12 probó contener efectivamente el gen codificante para la proteína VP1 de NoV GII12 (1608 pb, 535 aa estimados) insertado de forma correcta, mientras que la otra extracción fue descartada debido a que presentaba un codón de terminación prematuramente en la secuencia. Para GII4 también se logró confirmar la presencia del gen de VP1 intacto correspondiente a dicha cepa (1623 pb, 540 aa estimados) en la extracción de migración retardada, mientras que en la extracción cuya migración fue mayor no se detectó inserto. Por último, ambas extracciones secuenciadas de GFP resultaron contener el inserto esperado (720 pb, 239 aa estimados), se eligió una de las dos indistintamente para el próximo paso.

Confirmadas tanto la identidad como la integridad y correcta inserción de los genes de interés mediante secuenciación, los plásmidos recombinantes de las tres construcciones, fueron nombrados pFastBacVP1GII4, pFastBacVP1GII12 y pFastBacGFP de acuerdo a los genes que contienen, VP1 de la cepa GII4, VP1 de la cepa GII12 y GFP respectivamente

2.2) Báculos Recombinantes

Se utilizaron los plásmidos recombinantes para transformar bacterias DH10Bac® para que ocurra la transposición sitio específica entre estos y el báculo propagado en las bacterias. Luego de realizar la transformación se seleccionaron colonias blancas y una colonia azul (a forma de control) para sembrar en estrías. Se picaron 7 colonias correspondientes a VP1 de NoV GII4, 8 colonias correspondientes a VP1 de NoV GII12 y 6 colonias para el de la GFP para realizar mini-cultivos. Hubo crecimiento en todos los mini-cultivos, por lo que se realizó una extracción de ADN de alto peso molecular de acuerdo a lo estipulado por el fabricante [29]. Todos menos uno de los báculos extraídos para NoV presentaron la banda esperada de 4.000 pb (2.300 del báculo y 1.700 del inserto) en la PCR de confirmación, además una colonia de control (azul en el plaqueo) que contenía el báculo pero sin inserto fue incluida en la reacción y arrojó un resultado negativo para transposición (banda de aproximadamente 300pb) como era de esperarse (**Figura 15**). La extracción cuyo resultado fue negativo para el báculo no fue tomada en cuenta para los siguientes experimentos. Para elegir un báculo específico se corrió un gel 0.5% por 6 horas a 25V, El peso molecular aproximado de los báculos debería ser un poco mayor a 23.000 pb, se eligió una extracción para cada constructo que presentaba una banda distinguible a dicha altura para proseguir con la transfección (**Figura 16**). Además se tomó en cuenta, para los báculos conteniendo insertos de las cepas de NoV, que haya presentado una buena banda en la PCR de confirmación (**Figura 15**). Estos báculos fueron llamados BacVP1GII4, BacVP1GII12 y BacGFP de acuerdo a los genes foráneos contenidos en cada uno, VP1 de NoV GII4, VP1 de NoV GII12 y GFP respectivamente.

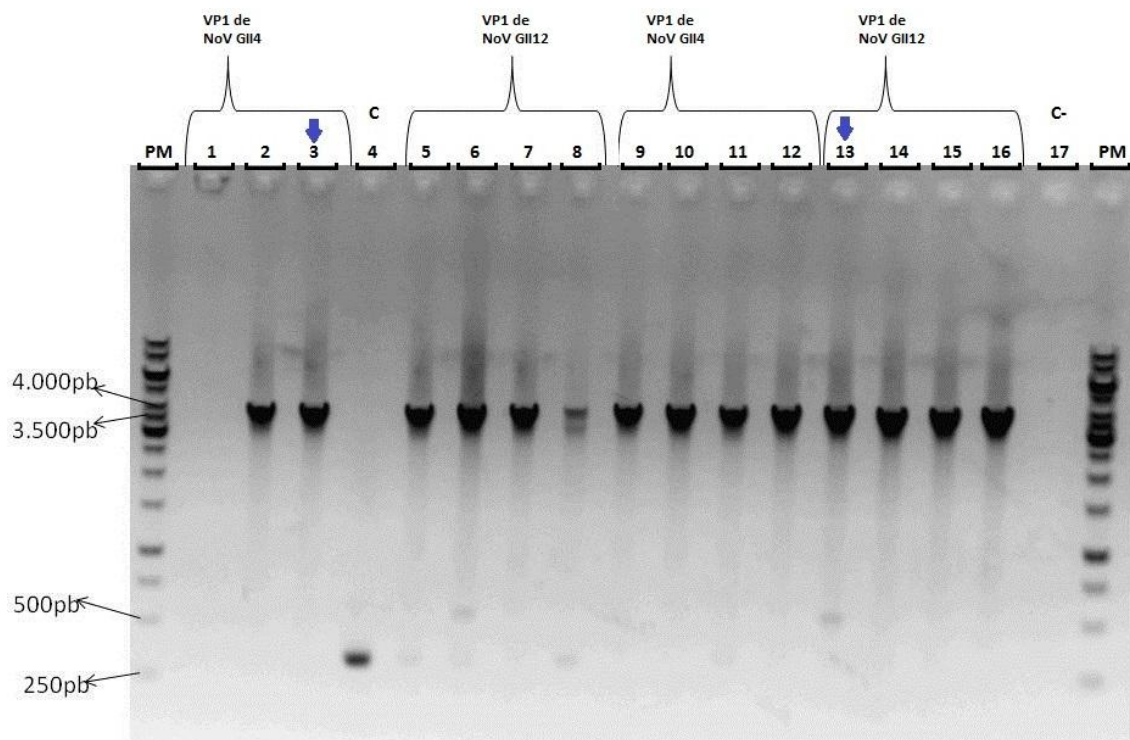


Figura 15- Electroforesis en gel de agarosa al 1% mostrando los resultados de la PCR para confirmar presencia de b crido con inserto en las minipreps de distintas colonias para las dos cepas de Norovirus (GII4 y GII12). Se utilizó buffer de corrida TAE, el marcador de peso molecular (PM) utilizado fue el GeneRuler 1kb DNA ladder (Fermentas). Se encuentran marcados con flechas el peso molecular entre las cuales se encuentran los fragmentos de interés. En el carril 4 se corrió la muestra correspondiente a la colonia control (C), azul en el plaqueo, en esta colonia no se dio la transposición sitio específica y posee el b crido sin inserto. En el carril 17 se corrió el control negativo (C-) de la PCR. Se muestran con flechas azules los resultados de los b cridos en las muestras que más adelante fueron seleccionados para transfectar células, basado en este resultado y el análisis de la extracción.

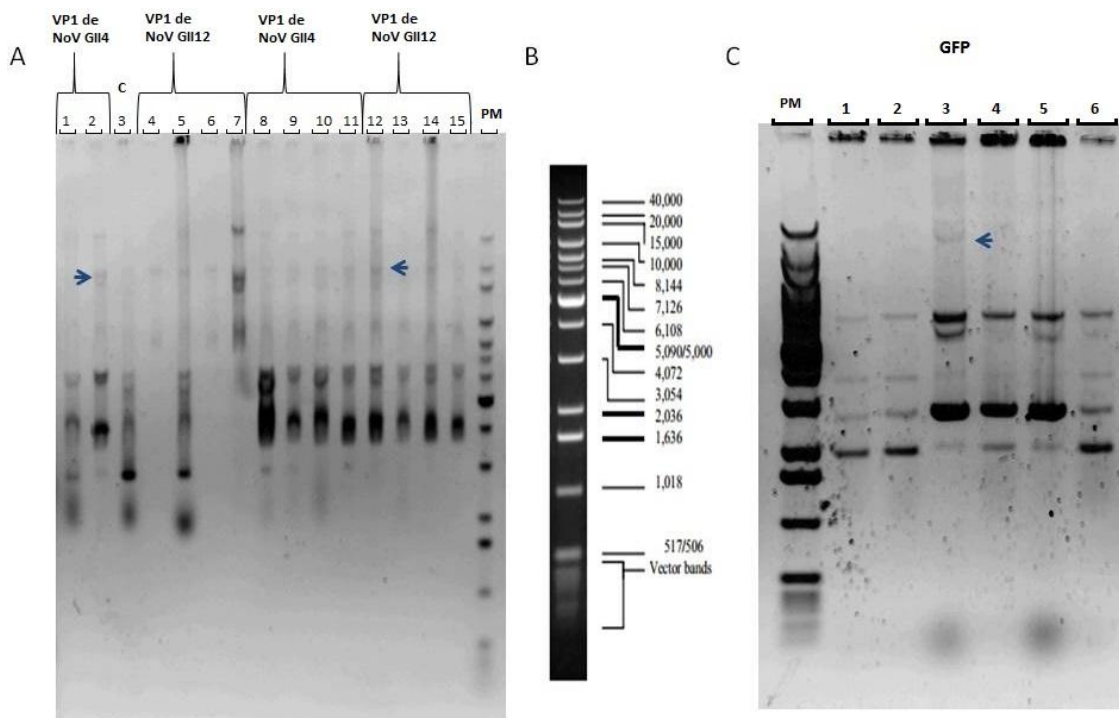


Figura 16- Electroforesis en gel de agarosa al 0,5% mostrando las extracciones de bácmidos de distintas colonias para las dos cepas de Norovirus (GII4 y GII12) y para la Proteína Fluorescente Verde (GFP). Se utilizó buffer de corrida TAE, el marcador de peso molecular (PM) utilizado fue el GeneRuler 1kb DNA Extension ladder (Invitrogen Inc). A- Extracciones de colonias con bácmidos transformadas con plásmidos conteniendo el gen para VP1 de Norovirus cepa GII4 y GII12. En el carril 3 se corrió la muestra correspondiente a la colonia control (C), azul en el plaqueo, en esta colonia no se dio la transposición sitio específica y posee el bácmido sin inserto. En el carril 16 se corrió el control negativo (C-) de la PCR. B- Esquema de del marcador de PM utilizado. C- Diferentes extracciones de colonias con bácmidos transformadas con plásmidos conteniendo el gen para GFP. El tamaño estimado de cada bácmido es levemente mayor a 23.000 pb. Se muestran con flechas azules las bandas que corresponderían a los bácmidos cuyas extracciones fueron seleccionados para la transfección de las células Sf9.

2.3) Obtención de stocks de *Baculovirus Recombinante*

Se utilizaron BacVP1GII4, BacVP1GII12 y BacGFP para transfectar células Sf9 y conseguir producir un primer inoculo. Los Baculovirus recombinantes fueron llamados BaculoVP1GII4, BaculoVP1GII12 y BaculoGFP de acuerdo a los genes foráneos contenidos en el genoma de cada uno, VP1 de la cepa GII4 de NoV, VP1 de la cepa GII12 de NoV y GFP respectivamente. No se logró poner a punto la titulación por placas de lisis para BaculoVP1GII4 y BaculoVP1GII12, esto se debió a que fue imposible obtener una monocapa confluyente de células para contar placas de lisis de forma confiable. Probablemente la característica de crecimiento semi-adherente de las células Sf9, además de la sensibilidad a los cambios de condiciones dados en el protocolo de plaqueo fueron las causantes de la dificultad para lograr este objetivo. Debido a esto, se estimó el título de estos stocks utilizando como referencia el obtenido para BaculoGFP mediante conteo de focos fluorescentes y asumiendo que todas las producciones tuvieron una eficiencia similar. (**Figura 17**). Utilizando este método se resolvió que el primer

inoculo contenía $4,5 \times 10^4$ unidades formadoras de focos uff/mL. Se amplificó este inoculo inicial tres veces, obteniéndose títulos en los tres pasajes sucesivos de $5,0 \times 10^6$ uff/mL, $2,0 \times 10^6$ uff/mL y $2,0 \times 10^6$ uff/mL respectivamente.

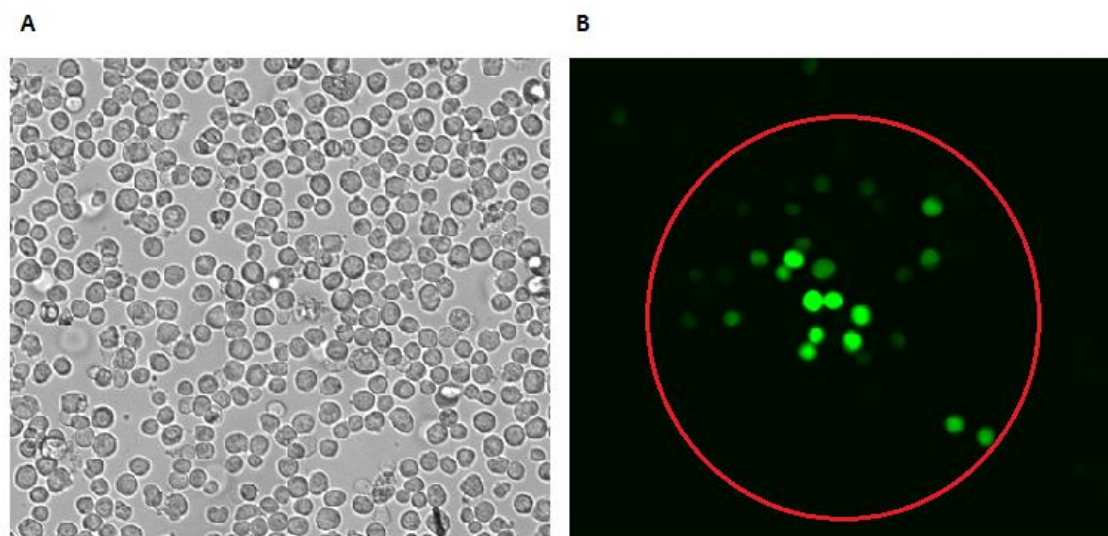


Figura 17- Imágenes del protocolo de plaqueo por focos fluorescentes de la Proteína Verde Fluorescente (GFP) utilizando células de *Spodoptera frugiperda* (Sf9) en medio sémi-sólido. A- Observación con microscopio óptico. B- Observación con microscopio de fluorescencia. De esta manera se detecta la presencia de fluorescencia verde emitida por la GFP expresada debido a la infección por el Baculovirus recombinante BaculoGFP. Marcado con un círculo rojo se encuentra un foco de fluorescencia.

2.4) Producción y purificación de proteínas recombinantes

El volumen y título viral del último pasaje fue suficiente para realizar la producción de proteínas a una MOI de 5. Se procedió a purificar las posibles VLPs mediante sucesivos pasos de centrifugado como se detalla en el punto 5 del desarrollo metodológico. Durante el último paso de de la purificación se observó que el sobrenadante de la producción correspondiente a la GFP evidenciaba cierta fluorescencia verde, indicando que parte de la proteína podría no haber sedimentado. Lo cual puede ser esperable dado que el protocolo empleado fue optimizado para la purificación de VLPs de NoV [8]. La concentración de proteína estimada mediante la técnica de Bradford estuvo cerca del límite inferior de detección y fue de $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ para las tres muestras.

3) Expresión de VP1 y evaluación de la formación de VLPs

3.1) SDS-PAGE

Para evaluar la presencia de las proteínas de interés en la purificación del punto 2.4, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida. En éste, se corrió el sedimento resuspendido (donde se deberían encontrar las VLPs) del último paso de purificación. En el carril correspondiente a BaculoVP1GII4 se perdió muestra a la hora del sembrado. En los carriles correspondientes a los sedimentos resuspendidos de BaculoVP1GII4 y BaculoVP1GII12 se logro detectar una banda de tamaño apropiado, aproximadamente 60.000 Daltons (Da), que tenía

una intensidad mayor solo en estos carriles y no el resto (**Figura 18**). Para BaculoGFP no se vio una banda de aproximadamente 27.000 Da, tamaño esperado para la proteína.

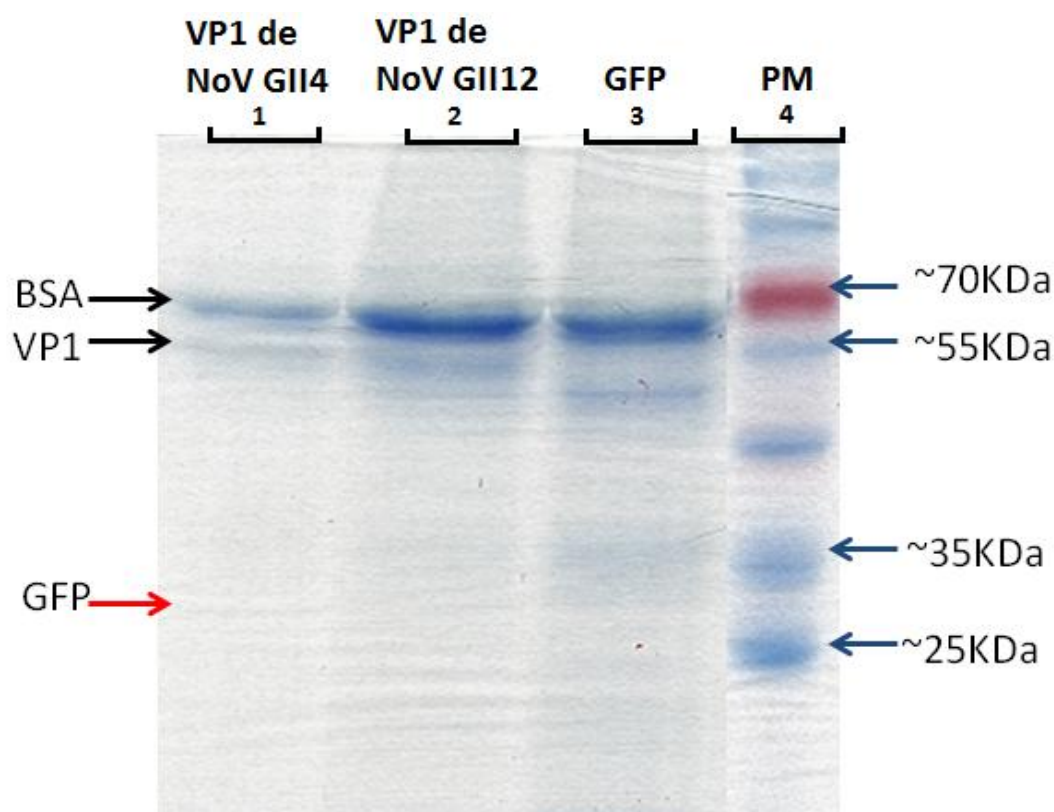


Figura 18- Electroforesis en gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12% revelado con azul de Coomassie utilizado para detectar la expresión de las diferentes proteínas de interés en los sedimentos resuspendidos del último paso de centrifugación en la purificación de la parte 5 de la metodología. Carril 1: VP1 de Norovirus (NoV) GII4. Carril 2: VP1 de la cepa GII12 de NoV. Carril 3: Proteína Verde Fluorescente (GFP). Carril 4: Marcador de peso molecular PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas INC.). Las flechas negras indican las bandas correspondientes a la Seroalbúmina Bovina (BSA) y a VP1, las flechas azules indican los pesos moleculares de interés, mientras que la flecha roja indica donde se debería visualizar la banda correspondiente a la GFP.

3.2) Microscopía Electrónica

Una vez establecida la presencia de las proteínas VP1 de ambas cepas de NoV, se procedió a verificar la capacidad de auto-ensamblar en VLPs. Esto se llevó a cabo observando imágenes de microscopía electrónica de transmisión. En las imágenes se lograron visualizar estructuras de apariencia icosaédrica repetitivas con la típica conformación de VLPs tanto para la cepa GII4 como para la GII12. Las VLPs presentaron diámetros estimados de entre 27 y 48nm (**Figura 19** y **Figura 21**). Además, se pudo percibir en la superficie de dichas partículas las protuberancias con forma de copa que le dieron el nombre *Caliciviridae* a la familia a la que pertenecen estos virus (**Figura 20** y **Figura 22**).

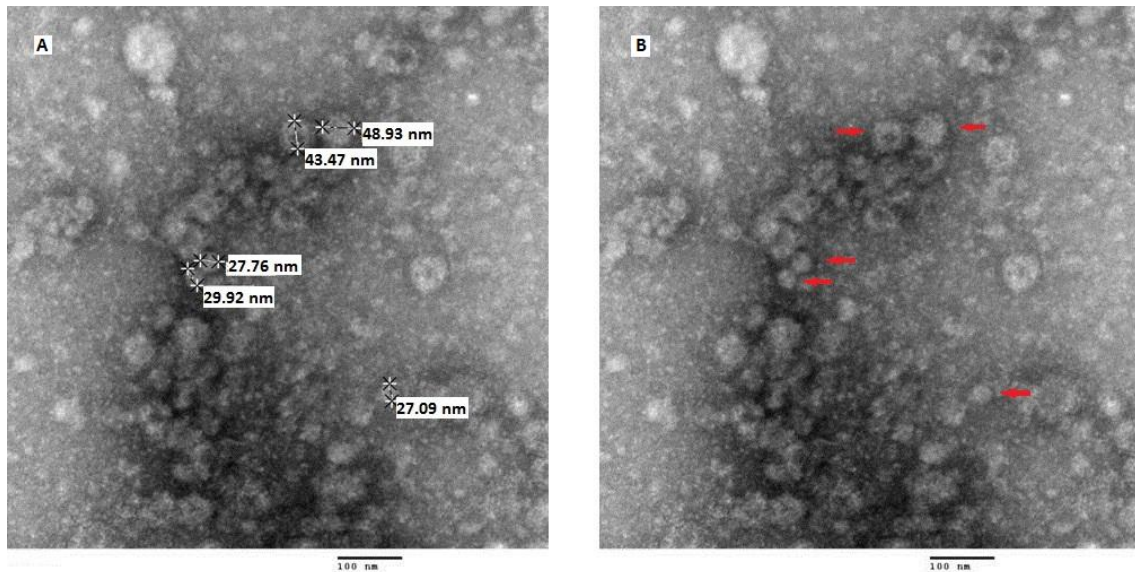


Figura 19- Imágenes de Microscopía electrónica de transmisión con tinción negativa utilizando Acetato de Urano al 2% para la cepa GII4 de Norovirus (NoV). A- Medición en nanómetros (nm) de las distintas partículas observadas en la purificación de la producción de VLPs en la línea celular Sf9. B- Misma imagen que en la parte A sin las mediciones, se observan las estructuras con la misma conformación repetidas en el espacio de visión, se muestra con flechas rojas las posibles VLPs que fueron medidas en la parte A.

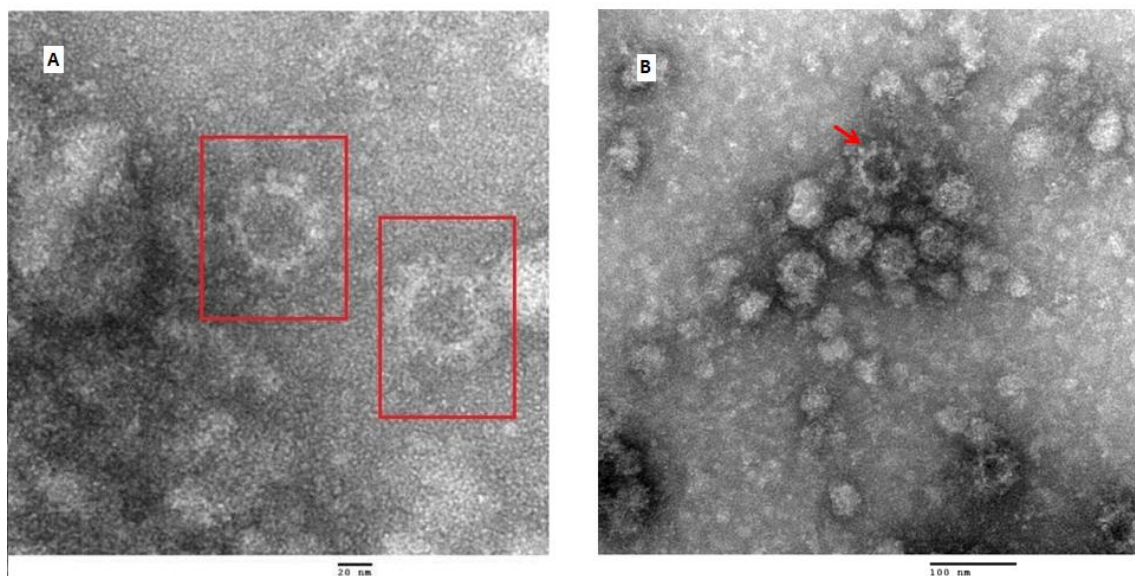


Figura 20- Imágenes de Microscopía electrónica de transmisión con tinción negativa utilizando Acetato de Urano al 2% para la cepa GII4 de Norovirus (NoV). A- Evidencia de la simetría de las partículas, con recuadros rojos se señalan las posibles VLPs con estructura icosaédrica. B- En esta imagen se hace énfasis en una estructura específica de NoV, señaladas con una flecha roja se observan las estructuras con forma de copa, o cáliz.

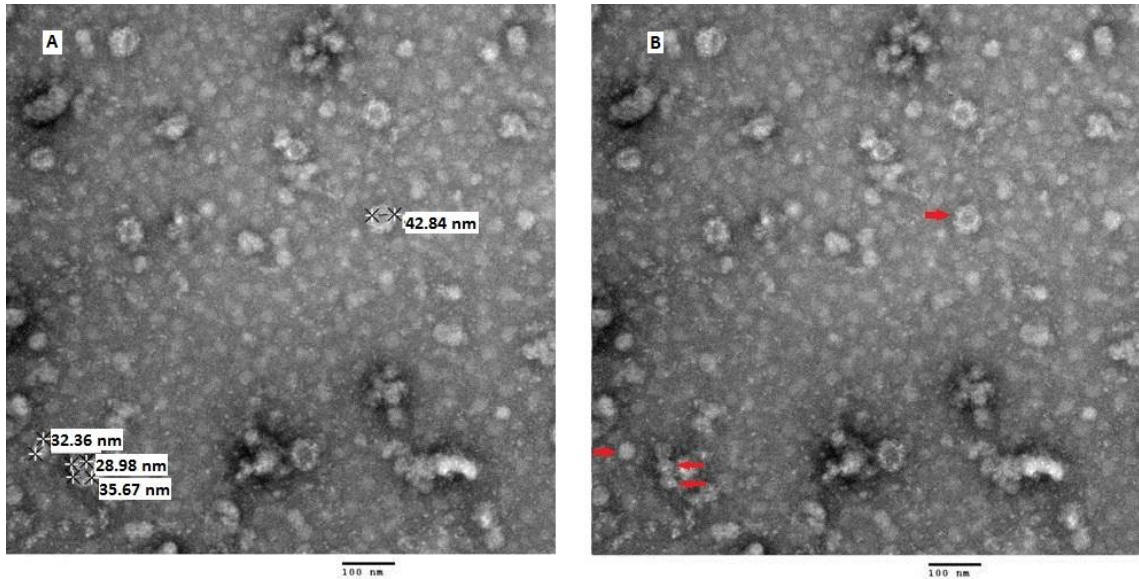


Figura 21- Imágenes de Microscopía electrónica de transmisión con tinción negativa utilizando Acetato de Uranilo al 2% para la cepa GII12 de Norovirus (NoV). A- Medición en nanómetros (nm) de las distintas partículas observadas en la purificación de la producción de VLPs en la línea celular Sf9. B- Misma imagen que en la parte A sin las mediciones, se observan las estructuras con la misma conformación repetidas en el espacio de visión, se muestra con flechas rojas las posibles VLPs que fueron medidas en la parte A.

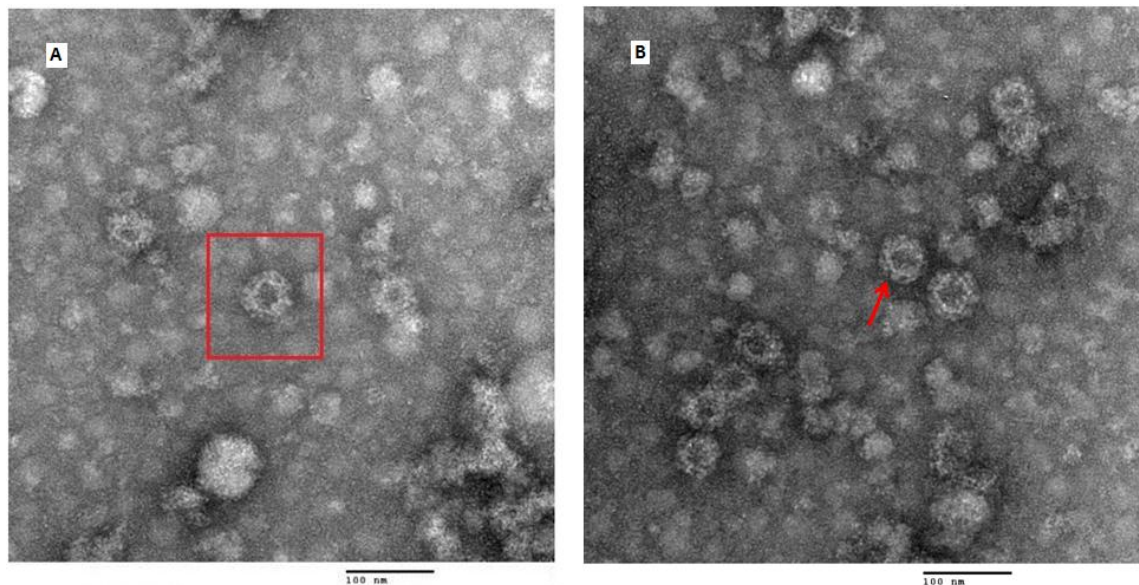


Figura 22- Imágenes de Microscopía electrónica de transmisión con tinción negativa utilizando Acetato de Uranilo al 2% para la cepa GII12 de Norovirus (NoV). A- Evidencia de la simetría de las partículas, con recuadros rojos se señalan las posibles VLPs con estructura icosaédrica. B- En esta imagen se hace énfasis en una estructura específica de NoV, las estructuras con forma de copa, o cáliz indicadas con la flecha roja.

Discusión

Los resultados parecerían indicar que en efecto las proteínas de la cápside de Norovirus tanto de la cepa GII4 como la GII12 expresadas por los Baculovirus recombinantes fueron capaces de auto-ensamblarse en VLPs en células Sf9. Éstas son las primeras VLPs de NoV expresadas en Uruguay y son además las primeras en ser generadas a partir de cepas autóctonas de nuestro país.

La cápside de NoV está compuesta por 90 dímeros de la proteína VP1, por lo cual para poder producir un virus recombinante que exprese dicha proteína fue necesario amplificar el gen correspondiente a VP1. Este paso fue de vital importancia, ya que se trata de un gen extenso, compuesto de aproximadamente 1700 pb. Cabe destacar que el diseño de los oligonucleótidos fue correcto, ya que se logró amplificar el gen que codifica para VP1 de ambas cepas de NoV (GII4 y GII12) en un solo paso. No fue necesario amplificar el gen por segmentos, ni realizar una PCR anidada. Además, no solo se obtuvo un amplicón conteniendo la secuencia del gen, sino que también se le incluyó en los extremos secuencias complementarias al plásmido pFastBac1 necesarias para el siguiente paso de construcción del vector viral. Debido a la naturaleza conservada que presentó el extremo 5' del gen VP1 en los alineamientos generados, se pudo diseñar un solo oligonucleótido directo para amplificar ambas cepas. Sin embargo, se constató una mayor divergencia hacia el extremo 3' por lo que no se pudo diseñar un solo cebador reverso que fuera capaz de hibridar correctamente con ambas cepas, generando la necesidad de contar con un cebador reverso específico para cada cepa tratada en este trabajo. Es posible que debido a la variabilidad diferencial presentada a lo largo del gen codificante para VP1, el cebador directo diseñado para este trabajo sea capaz de ser utilizado para amplificar más cepas distintas de NoV, mientras que para cada cepa sería necesario diseñar un cebador reverso específico.

Se pudo adaptar exitosamente el clonaje libre de enzimas de restricción al proceso de construcción de un Baculovirus recombinante utilizando el vector de transferencia (pFastBac1) como molde en la segunda PCR del método. Además, el método probó ser muy fácil y rápido de utilizar, permitiendo amplificar el gen de interés e insertarlo en un plásmido en un día. Gracias a esta técnica también se pudo prescindir de las consideraciones pertinentes a la utilización de enzimas de restricción, como por ejemplo la elección de enzimas cuyas secuencias sean compatibles con el diseño de cebadores y que al mismo tiempo sean capaces de funcionar correctamente utilizando el mismo buffer de reacción. En cuanto a la fidelidad del proceso, se pudo constatar que secuenciando solo dos clones para cada construcción fue posible obtener por lo menos un clon por cada constructo que contuviera la secuencia deseada sin mutaciones. Sin embargo, se remarca la necesidad de realizar este paso de control por secuenciación. Esto se desprende del hecho que, si bien para los clones de los plásmidos conteniendo el gen codificante para GFP, ambas secuencias resultaron correctas e idénticas, este no fue siempre el caso. Para uno de los clones del plásmido pFastBac1 conteniendo el gen codificante para VP1 de la cepa de NoV GII12 se constató que presentaba un codón de terminación de la traducción prematuramente. Cabe destacar que en esta instancia se utilizó

una enzima especialmente considerada debido a su alto grado de fidelidad (Phusion High Fidelity Polymerase, Finnzymes). Una prueba de la fidelidad de dicha enzima es el hecho de que para las extracciones de pFastBac1 recombinantes cuyo gen de interés era VP1 de GII4 se identificó que uno de los dos clones no presentaba inserto, dejando un solo clon, que resultó poseer el inserto sin mutaciones.

Tomando estas precauciones y siguiendo el protocolo establecido del sistema Bac-to-Bac (Invitrogen Inc.) se progresó adecuadamente en la construcción de los vectores virales de expresión, gracias a que el sistema resultó muy accesible y efectivo para poner en funcionamiento. Basados en la titulación de BaculoGFP por focos fluorescentes, se lograron obtener producciones virales del entorno de 10^6 uff/mL, además los focos fueron de utilidad para comprobar la efectividad del sistema Bac-to-Bac, incluso previamente a evaluar la expresión de VP1, al corroborar que la proteína GFP se expresó correctamente. Sin embargo, es posible que las producciones virales de los Baculovirus expresando VP1 se hayan visto comprometidas debido a que en la producción de virus es recomendable trabajar con un MOI de 0.1 a 0.01 para evitar la formación de partículas virales defectivas interferentes. Esto es importante ya que al método de titulación estimada empleado, al no ser posible poner a punto la titulación por placas de lisis, podría haber subestimado los títulos de los Baculovirus recombinantes que no expresaban GFP. Considerando esto último en base a las estimaciones, se trató de trabajar a una MOI de 0,01 para la producción de los stocks virales.

A pesar de las muchas ventajas que presentó el sistema, fue problemático poner a punto el crecimiento y mantenimiento de la línea celular Sf9, vital para el funcionamiento de dicho sistema. Se constató que las células son muy sensibles a los cambios de condiciones. Además, se trabajó sin el equipamiento apropiado, ya que no se contaba con un agitador magnético apropiado ni con frascos para crecimiento en suspensión, teniendo que adaptar el crecimiento de la línea a distintos sustratos sub-óptimos. A pesar de esto, se logró poner a punto el crecimiento de la línea tanto en monocapa como también en suspensión, pudiéndose utilizar células provenientes de ambas condiciones de crecimiento para los experimentos.

Habiendo logrado producir la suficiente cantidad de Baculovirus recombinantes se realizó la producción de proteínas recombinantes, luego se evaluó la expresión de VP1 mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) que indicó la presencia de esta proteína en el sobrenadante de las células infectadas con los Baculovirus recombinantes de interés (BaculoVP1GII4 y BaculoVP1GII12). Estos resultados positivos pueden ser confirmados realizando un Wester-blot utilizando anticuerpos contra NoV. De esta forma se podría asegurar que las bandas observadas con el peso molecular apropiado son en efecto VP1 de NoV. Además, se constató la presencia de partículas con características típicas de VLPs con estructuras específicas de los Calicivirus y de tamaño adecuado, incluso se observaron partículas de tamaño más pequeño previamente descritas para la síntesis de VP1 de NoV en sistemas basados en Baculovirus [58]. Si bien se obtuvieron resultados muy positivos, se debe considerar que se realizó una producción a pequeña escala con un protocolo de purificación cuyo objetivo final fue el de la concentración de las VLPs más que su purificación. Debido a esto se podría pensar que una producción mayor (con una mayor cantidad de células) seguida de un protocolo de purificación más extenso. Este puede incluir una centrifugación en

gradiente de densidad con Cloruro de Cesio o sacarosa por ejemplo, pudiendo mejorar el rendimiento del sistema considerablemente. Se ha reportado que la purificación utilizando un gradiente de densidad de sacarosa seguido de ultrafiltración resultaría en VLPs en mejores condiciones estructurales con una capacidad de unión a antígenos de histo-compatibilidad sanguínea excelente [28], lo que sugeriría que esta técnica sería la mejor opción a poner a prueba.

Perspectivas

A corto plazo

Sería importante optimizar las condiciones de purificación de las proteínas recombinantes y sobre todo si se trata de VLPs. Esto se debe a que al momento de visualizar estas estructuras por microscopía electrónica, mientras mayor sea la cantidad de impurezas el campo de visión, mayor será la dificultad de identificar las VLPs. Una forma posible de lograr una pureza mayor de las proteínas recombinantes sería realizar una centrifugación en un colchón de sacarosa o en un gradiente de densidad con Sacarosa o Cloruro de Cesio. Además se debería evaluar la capacidad de estas VLPs de unirse a su receptor celular propuesto, los antígenos de histocompatibilidad sanguínea y la estabilidad que estas presentan ante cambios en condiciones como temperatura, pH y concentración de cloro.

Se deben mejorar además, las condiciones de producción de virus y proteínas recombinantes. Para lograr esto, sería imperativo poner a punto un método de titulación apto para las construcciones que expresan VP1 (BaculoVP1GII4 y BaculoVP1GII12), ya que las producciones realizadas en este trabajo se valieron de estimaciones de títulos obtenidas a partir de los títulos por focos fluorescentes de la construcción que expresa GFP utilizada como control (BaculoGFP). Parte de esta proyección ya está en curso, utilizándose células Sf9 establemente transformadas con un plásmido conteniendo el codificante para la GFP bajo el control del promotor fuerte de la Polihedrina. De esta manera las células de insecto solo generarán fluorescencia en el evento de ser infectadas con un Baculovirus y se podría de esta manera titular stocks Baculovirus recombinantes sin la necesidad de que estos expresen GFP.

A largo plazo

La producción de VLPs abren las puertas para múltiples aplicaciones en el campo biotecnológico. En una primera aproximación, una vez que se logre un alto grado de pureza de estas estructuras sería posible utilizarlas como candidatas para la generación de una vacuna oral específica contra las cepas circulantes en el Uruguay actualmente. Siguiendo en el campo de las vacunas, las VLPs podrían ser utilizadas como un presentador de antígenos de otros patógenos. Este tipo de aplicación requeriría de la adición de epítopes de interés a la secuencia original de NoV. De hecho, se ha identificado una región de la proteína VP1 que no es necesaria para la formación de las VLPs y se ha propuesto como una posible región de inserción de secuencias heterólogas para este mismo tipo de aproximaciones ubicada en el dominio P2 [8]. Esta región podría además, ser aprovechada para incluir la secuencia correspondiente a la GFP. De esta manera, si las VLPs mantienen sus condiciones físico-químicas similares a las partículas infectivas de NoV, este tipo de híbridos podría ser utilizado como un bio-marcador para evaluar la capacidad de sistemas de purificación de agua de eliminar viriones de NoV. Por último, estas estructuras podrían ser utilizadas para generar kit's de detección de anticuerpos o de antígeno basados en la técnica de ELISA. De esta forma, se podría comparar la efectividad de estos kit's generados a partir de cepas autóctonas del Uruguay con respecto a los kit's comerciales, tomando un panel de muestras previamente confirmadas como positivas o negativas mediante RT-PCR e intentar diagnosticar la presencia

de NoV utilizando kit's comerciales y los generados a partir de las VLPs de cepas autóctonas. Sería importante mejorar la sensibilidad de estos kit's para poder utilizarlos en el diagnóstico de casos individuales.

Bibliografía

1. Adler, J. and R. Zickl, *Winter vomiting disease*. The Journal of Infectious Diseases, 1969. **119**(6): p. 668-673.
2. Alberti, A., *Detección molecular y variabilidad genética de Norovirus en pacientes y en aguas residuales del Uruguay* (Tesis de Maestría sin publicar), 2012. Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay
3. Ando, T., J.S. Noel, and R.L. Fankhauser, *Genetic Classification of "Norwalk-like Viruses"*. The Journal of Infectious Diseases, 2000. **181**(2): p. 336-348.
4. Aragão, G.C., D. de Souza Oliveira, M. Cordeiro dos Santos, J. D'Arc Pereira Mascarenhas, C. Silva de Oliveira, A. da Costa Linhares, and Y. Benchimol Gabbay, *Molecular characterization of norovirus, sapovirus and astrovirus in children with acute gastroenteritis from Belém, Pará, Brazil*. Revista Pan-Amazônica de Saúde, 2010. **1**(1): p. 149-158.
5. Atmar, R.L., D.I. Bernstein, C.D. Harro, M.S. Al-Ibrahim, W.H. Chen, J. Ferreira, M.K. Estes, D.Y. Graham, A.R. Opekun, C. Richardson, and P.M. Mendelman, *Norovirus Vaccine against Experimental Human Norwalk Virus Illness*. The new england journal of medicine, 2011. **365**(23): p. 2178-87.
6. Ball, J.M., M.E. Hardy, R.L. Atmar, M.E. Conner, and M.K. Estes, *Oral Immunization with Recombinant Norwalk Virus-Like Particles Induces a Systemic and Mucosal Immune Response in Mice*. Journal of Virology, 1997. **72**(2): p. 1345-1353.
7. Bertolotti-Ciarlet, A., S.E. Crawford, A.M. Hutson, and M.K. Estes, *The 3' End of Norwalk Virus mRNA Contains Determinants That Regulate the Expression and Stability of the Viral Capsid Protein VP1: a Novel Function for the VP2 Protein*. Journal of Virology, 2003. **77**(21): p. 11603-11615.
8. Bertolotti-Ciarlet, A., L.J. White, R. Chen, B.V.V. Prasad, and M.K. Estes, *Structural Requirements for the Assembly of Norwalk Virus-Like Particles*. Journal of virology, 2002. **76**(8): p. 4044-4055.
9. Blanco Fernández, M.D., C. Torres, L.C. Martínez, M.O. Giordano, G. Masachessi, P.A. Barril, M.B. Isa, R.H. Campos, S.V. Nates, and V.A. Mbayed, *Genetic and evolutionary characterization of norovirus from sewage and surface waters in Córdoba City, Argentina*. Infection, Genetics and Evolution, 2011. **11**(7): p. 1631-1637.
10. Blanton, L., S. Adams, R. Beard, G. Wei, S. Bulens, M. Widdowson, R. Glass, and S. Monroe, *Molecular and epidemiologic trends of caliciviruses associated with outbreaks of acute gastroenteritis in the United States, 2000-2004*. The Journal of Infectious Diseases, 2006. **193**(3): p. 413-421.
11. Bok, K. and K.Y. Green, *Norovirus Gastroenteritis in Immunocompromised Patients*. The New England Journal of Medicine, 2012. **367**(22): p. 2126-2132.
12. de Bruin, E., E. Duizer, H. Vennema, and M.P.G. Koopmans, *Diagnosis of Norovirus outbreaks by commercial ELISA or RT-PCR*. Journal of Virological Methods, 2006. **137**(2): p. 259-264.
13. Díaz, T.J., G.V. Solari, C.O. Cáceres, A.J. Mena, P.S. Baeza, U.X. Muñoz, G.M. O'Ryan, A.H. Galeno, B.A. Maldonado, and M.N. Mamani, *Outbreaks of acute gastroenteritis in Antofagasta Region: Chile 2010*. Revista chilena de infectología: órgano oficial de la Sociedad Chilena de Infectología, 2012. **29**(1): p. 19-25.
14. Donaldson, E.F., L.C. Lindesmith, A.D. LoBue, and R.S. Baric, *Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system*. Nature Reviews Microbiology, 2010. **8**(3): p. 231-241.

15. Estes, M.K., J.M. Ball, G.R. A., A.R. Opekun, M.A. Gilger, S.S. Pacheco, and D.Y. Graham, *Norwalk Virus Vaccines: Challenges and Progress*. The Journal of Infectious Diseases, 2000. **181**(2): p. S367–73.
16. Farkas, T., K. Sestak, C. Wei, and X. Jiang, *Characterization of a Rhesus Monkey Calicivirus Representing a New Genus of Caliciviridae*. Journal of Virology, 2008. **82**(11): p. 5408–5416.
17. Ferreira, M.S.R., M. Victoria, F.A. Carvalho-Costa, C.B. Vieira, M.P.T.P. Xavier, J.M. Fioretti, J. Andrade, E.M. Volotão, M. Rocha, J.P.G. Leite, and M.P. Miagostovich, *Surveillance of norovirus infections in the state of Rio De Janeiro, Brazil 2005–2008*. Journal of Medical Virology, 2010. **82**(8): p. 1442–1448.
18. Galeano, M.E., M. Martinez, A.A. Amarilla, G. Russomando, M. Pereira Miagostovich, G.I. Parra, and J.P. Leite, *Molecular epidemiology of norovirus strains in Paraguayan children during 2004–2005: Description of a possible new GII.4 cluster*. Journal of Clinical Virology, 2013.
19. Glass, R.I., J. Noel, T. Ando, R. Fankhauser, G. Belliot, A. Mounts, U.D. Parashar, B.J. S., and S.S. Monroe, *The Epidemiology of Enteric Caliciviruses from Humans: A Reassessment Using New Diagnostics*. The Journal of Infectious Diseases, 2000. **181**(2): p. S254–S261.
20. Gomes, K.A., J.A. Stupka, A. Diana, and G.I. Parra, *Caracterización molecular de calicivirus aislados de brotes de gastroenteritis ocurridos en la Argentina durante los años 2005 y 2006*. Revista Argentina de Microbiología, 2008. **40**(4): p. 222–228.
21. Gomes, K.A., J.A. Stupka, J. Gómez, and G.I. Parra, *Molecular characterization of calicivirus strains detected in outbreaks of gastroenteritis in Argentina*. Journal of Medical Virology, 2007. **79**(11): p. 1703–1709.
22. Goodgame, R., *Norovirus gastroenteritis*. Current Infectious Disease Reports, 2007. **9**(2): p. 102–109.
23. Gordon, I., H.S. Ingraham, and R.F. Korn, *Transmission of epidemic gastroenteritis to human volunteers by oral administration of fecal filtrates*. The Journal of Experimental Medicine, 1947. **86**(5): p. 409–422.
24. Green, K., *Caliciviridae: the noroviruses*, in *Fields virology, 5th ed*, D. Knipe and P. Howley, Editors. 2007, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia. p. 949–78.
25. Green, K., T. Ando, M. Balayan, T. Berke, I. Clarke, M. Estes, D. Matson, S. Nakata, J. Neill, M. Studdert, and H. Thiel, *Taxonomy of the caliciviruses*. The Journal of Infectious Diseases, 2000. **181**(2): p. 322–330.
26. Hardy, M.E., *Norovirus protein structure and function*. FEMS Microbiology Letters, 2005. **253**(1): p. 1–8.
27. Harris, J.P., W.J. Edmunds, R. Pebody, D.W. Brown, and B.A. Lopman, *Deaths from Norovirus among the Elderly, England and Wales*. Emerging Infectious Diseases, 2008. **14**(10): p. 1546–1552.
28. Huhti, L., V. Blazevic, K. Nurminen, T. Koho, V.P. Hytonen, and T. Vesikari, *A comparison of methods for purification and concentration of norovirus GII-4 capsid virus-like particles*. Archives of Virology, 2010. **155**(11): p. 1855–1858.
29. Invitrogen. *Bac-to-Bac Baculovirus Expression System: An efficient site-specific transposition system to generate baculovirus for high-level expression of recombinant proteins*. 2013 [cited 2013 August, 13]; Available from: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/bactobac_man.pdf.
30. Invitrogen. *Growth and Maintenance of Insect Cell Lines*. 2013 [cited 2013 August, 13]; Available from: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/insect_man.pdf.
31. Invitrogen. *Home Page*. 2013 [cited 2013 August, 13]; Available from: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home.html>.

32. Jiang, X., M. Wang, D.Y. Graham, and M.K. Estes, *Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein*. Journal of Virology, 1992. **66**(11): p. 6527-6532.
33. Jiang, X., N. Wilton, W.M. Zhong, T. Farkas, P.W. Huang, E. Barrett, M. Guerrero, G. Ruiz-Palacios, K.Y. Green, J. Green, A.D. Hale, M.K. Estes, L.K. Pickering, and D. Matson, *Diagnosis of Human Caliciviruses by Use of Enzyme Immunoassays*. The Journal of Infectious Diseases, 2000. **181**(2): p. S349-59.
34. Jordan Jr., W.S., I. Gordon, and W.R. Dorrance, *A study of illness in a group of cleveland families. VII. Transmission of acute nonbacterial gastroenteritis to volunteers: evidence for two different etiological agents*. The Journal of Experimental Medicine, 1953. **98**(5): p. 461-475.
35. Kageyama, T., M. Shinohara, K. Uchida, S. Fukushi, F.B. Hoshino, S. Kojima, R. Takai, T. Oka, N. Takeda, and K. Katayama, *Coexistence of Multiple Genotypes, Including Newly Identified Genotypes, in Outbreaks of Gastroenteritis Due to Norovirus in Japan*. Journal of Clinical Microbiology, 2004. **42**(7): p. 2988-2995.
36. Kapikian, A.Z., *The Discovery of the 27-nm Norwalk Virus: An Historic Perspective*. The Journal of Infectious Diseases, 2000. **181**(2): p. S295-302.
37. Kapikian, A.Z., R.G. Wyatt, R. Dolin, T.S. Thornhill, A.R. Kalica, and R.M. Chanock, *Visualization by Immune Electron Microscopy of a 27-nm Particle Associated with Acute Infectious Nonbacterial Gastroenteritis* Journal of Virology, 1972. **10**(5): p. 1075-1081.
38. Kelly, B.J., L.A. King, and R.D. Possee, *Introduction to baculovirus molecular biology*, in *Baculovirus and Insect Cell Expression Protocols*, D.W. Murhammer, Editor 2007, Humana Press Inc.: Totowa, NJ. p. 25-53.
39. Kojima, S., H. Fukumi, H. Kusama, S. Yamamoto, S. Suzuki, T. Uchida, and S. Sunakawa, *Studies on the causative agent of the infectious diarrhea. Records of the experiments on human volunteers*. Jap. Med. J., 1948. **1**: p. 467-476.
40. Koopmans, M., J. Vinje, M. de Wit, I. Leenen, W. van der Poel, and Y. van Duynhoven, *Molecular Epidemiology of Human Enteric Caliciviruses in The Netherlands*. The Journal of Infectious Diseases, 2000. **181**(2): p. S262-269.
41. Lambden, P.R., E.O. Caul, C.R. Ashley, and I.N. Clarke, *Sequence and Genome Organization of a Human Small Round-Structure Norwalk-Like Virus*. Science, 1993. **259**: p. 516-519.
42. Laurent, S., J.F. Vautherot, M.F. Madelaine, G. Le Gall, and D. Rasschaert, *Recombinant rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein expressed in baculovirus self-assembles into viruslike particles and induces protection*. Journal of Virology, 1994. **68**(10): p. 6794-6798.
43. Lopman, B., H. Vennema, E. Kohli, P. Pothier, A. Sanchez, A. Negredo, J. Buesa, E. Schreier, M. Reacher, D. Brown, J. Gray, M. Iturriza, C. Gallimore, B. Bottiger, K.-O. Hedlund, M. Torvén, C.-H. von Bonsdorff, L. Maunula, M. Poljsak-Prijatelj, J. Zimsek, G. Reuter, G. Szücs, B. Melegh, L. Svennson, Y. van Duynhoven, and M. Koopmans, *Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant*. The Lancet, 2004. **363**(9410): p. 682 - 688.
44. Matthews, J.E., B.W. Dickey, R.D. Miller, J.R. Felzer, B.P. Dawson, A.S. Lee, J.J. Rocks, J. Kiel, J.S. Montes, C.L. Moe, J.N.S. Eisenberg, and J.S. Leon, *The epidemiology of published norovirus outbreaks: a systematic review of risk factors associated with attack rate and genogroup*. Epidemiology and Infection, 2012. **140**(7): p. 1161-1172.
45. Mesquita, J.R., L. Barclay, M. São José Nascimento, and J. Vinjé, *Novel Norovirus in Dogs with Diarrhea*. Emerging Infectious Diseases, 2010. **16**(6): p. 980-982.

46. Morillo, S.G., A. Luchs, A. Cilli, C.D. Ribeiro, S. Julien Calux, R. de Cássia Compagnoli Carmona, and M. do Carmo Sampaio Tavares Timenetsky, *Norovirus 3rd Generation kit: An improvement for rapid diagnosis of sporadic gastroenteritis cases and valuable for outbreak detection*. Journal of Virological Methods, 2010. **173**(1): p. 13-16.
47. Mounts, A., T. Ando, M. Koopmans, J. Bresee, J. Noel, and R. Glass, *Cold weather seasonality of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses*. The Journal of Infectious Diseases, 2000. **181**(2): p. S284- 287.
48. Noel, J.S., R.L. Fankhauser, T. Ando, S.S. Monroe, and R.I. Glass, *Identification of a Distinct Common Strain of "Norwalk-like Viruses" Having a Global Distribution*. The Journal of Infectious Diseases, 1999. **179**(6): p. 1334-1344.
49. Parra, G.I., K. Bok, R. Taylor, J.R. Haynes, S.V. Sosnovtseva, C. Richardson, and K.Y. Greena, *Immunogenicity and specificity of norovirus Consensus GII.4 virus-like particles in monovalent and bivalent vaccine formulations*. Vaccine, 2012. **30**(24): p. 3580-3586.
50. Patel, M.M., M.-A. Widdowson, R.I. Glass, K. Akazawa, J. Vinjé, and U.D. Parashar, *Systematic Literature Review of Role of Noroviruses in Sporadic Gastroenteritis*. Emerging Infectious Diseases, 2008. **14**(8): p. 1224–1231.
51. Prasad, B.V.V., M.E. Hardy, T. Dokland, J. Bella, M.G. Rossmann, and M.K. Estes, *X-ray Crystallographic Structure of the Norwalk Virus Capsid*. Science, 1999. **286**(5438): p. 287-290.
52. Prasad, B.V.V., M.E. Hardy, X. Jiang, and M.K. Estes, *Structure of Norwalk virus*. Archives of Virology, 1996. **12**: p. 237-242.
53. Scallan, E., R.M. Hoekstra, F.J. Angulo, R.V. Tauxe, M.-A. Widdowson, S.L. Roy, J.L. Jones, and P.M. Griffin, *Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens*. Emerging Infectious Diseases, 2011. **17**(1): p. 7-15.
54. Sharp, T., S. Guix, K. Katayama, S. Crawford, and M. Estes, *Inhibition of Cellular Protein Secretion by Norwalk Virus Nonstructural Protein p22 Requires a Mimic of an Endoplasmic Reticulum Export Signal*. PLoS ONE, 2010. **5**(10): p. e13130.
55. Sharp, T.M., S.E. Crawford, N.J. Ajami, F.H. Neill, R.L. Atmar, K. Katayama, B. Utama, and M.K. Estes, *Secretory pathway antagonism by calicivirus homologues of Norwalk virus nonstructural protein p22 is restricted to noroviruses*. Virology Journal, 2012. **9**(181).
56. Unger, T., Y. Jacobovitch, A. Dantes, R. Bernheim, and Y. Peleg, *Applications of the Restriction Free (RF) cloning procedure for molecular manipulations and protein expression*. Journal of Structural Biology, 2010. **172**(1): p. 34-44.
57. Vacher, G.I., M.D. Kaeser, C. Moser, R. Gurny, and G. Borchard, *Recent Advances in Mucosal Immunization Using Virus-like Particles*. Molecular Pharmaceutics, 2013. **10**(5): p. 1596-1609
58. White, L.J., M.E. Hardy, and M.K. Estes, *Biochemical characterization of a smaller form of recombinant Norwalk virus capsids assembled in insect cells*. Journal of Virology, 1997. **71**(10): p. 8066-8072.
59. Widdowson, M.-A., E.H. Cramer, L. Hadley, J.S. Bresee, R.S. Beard, S.N. Bulens, M. Charles, W. Chege, E. Isakbaeva, J.G. Wright, E. Mintz, D. Forney, J. Massey, R.I. Glass, and S.S. Monroe, *Outbreaks of Acute Gastroenteritis on Cruise Ships and on Land: Identification of a Predominant Circulating Strain of Norovirus—United States, 2002*. the Journal of Infectious Diseases, 2004. **190**(1): p. 27-36.
60. Zupa, C., V. Revol-Guyot, and A. Epstein, *Improved packaging system for generation of high-level noncytotoxic HSV-1 amplicon vectors using Cre-loxP site-specific recombination to delete the packaging signals of defective helper genomes*. Human Gene Therapy, 2003. **14**(11): p. 1049-1063.

61. Zheng, D.-P., T. Ando, R.L. Fankhauser, R.S. Beard, R.I. Glass, and S.S. Monroe, *Norovirus classification and proposed strain nomenclature*. Virology, 2006. **346**(2): p. 312-323.

Agradecimientos

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación por haberme otorgado una beca de iniciación.

A la MSc. Lorena Tomé y al Dr. Juan Arbiza integrantes del tribunal por las rápidas correcciones con tan poco tiempo de aviso.

Al Dr. Juan Arbiza, además, por abrirme las puertas del laboratorio de Virología y permitir mi recibimiento trabajando en un tema que me apasiona.

A la MSc. Gabriela Casanova por su dedicación y gran aporte para conseguir imágenes de microscopía electrónica realmente excelentes.

A la Dra. Andrea Villarino y su equipo que fueron tan amables de permitirme utilizar su laboratorio y su conocimiento para la parte proteómica de esta tesis.

A la Lic. Luciana Gillman en particular por su contribución al realizar electroforesis en geles de poliacrilamida y la técnica de Bradford, pero también por bancarse alguna pregunta que otra!

Al MSc. Alvaro Alberti por su asistencia con las muestras sobre las cuales se basó todo el trabajo.

Al gran grupo humano del laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias cuyos integrantes me ayudaron y enseñaron en todo momento y hacen en el día a día un gusto ir a trabajar. Chanchito, Nati R, Nati H, Nati O, Vir, Santi, Sandra, Adriana, Ana y en especial a la Gaby por esas maratónicas mateadas para hacer catarsis.

No alcanzan palabras para agradecer a la Dra. Mabel Berois y la MSc. Andrea Blanc quienes fueron las guías en mi formación como científico. No solo proporcionaron conocimiento y estuvieron siempre presentes con excelente disposición para evacuar mis dudas, sino que también fueron ellas quienes en primer lugar despertaron mi interés en la virología que ahora es una parte tan grande de mi vida.

A la gentuza de la facultad, en particular Santiago, Vivi, Mariel y Aldana. Por horas de estudio y más horas de distensión (esa nube no se está moviendo) sin las cuales esta carrera no hubiera sido lo mismo.

A la gurizada de Colonia, amigos que estuvieron antes de empezar este camino que tanto esfuerzo conlleva y que por suerte se mantienen hasta el día de hoy. En particular los ukeleles Leti y Fer y los gurises que más que estar desde antes, están desde siempre con nada menos que 20 años de aguante incondicional, los hermanos que tuve la suerte de elegir, el Tuca y el Toti.

Por último, quiero agradecer a mi familia, la base sobre la que se construyen el resto de las cosas. Por haberme permitido alcanzar mis éxitos y por levantarme después de mis fracasos. Por apoyarme desde siempre, a mis padres, a mi hermano y mi abuela, los quiero como no tienen idea, muchas gracias!