



Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Ciencias



**Evaluación Físicoquímica e Inmunológica de
una quimera VP6-NSP4 de rotavirus:
Seminario de Investigación I 2017A.**

**Nombre de la Unidad de Aprendizaje:
SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN I
SEMINARIO INTERDISCIPLINARIO I
(Doctorado).**

**Autor: Dr. Jorge Mulia Rodríguez.
Coautor: M. en M. M. Cristian Peña Negrete**

Junio de 2017

GUÍA EXPLICATIVA DE USO GENERAL PARA LA UNIDAD DE APRENDIZAJE DE SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN I (SEMINARIO INTERDISCIPLINARIO I) (DOCTORADO)

	Página
I. Trayectoria Académica	4
II. Unidad de Aprendizaje	5
III: Evaluación Físicoquímica e Inmunológica de una quimera VP6-NSP4 de rotavirus.	6
IV. Objetivo General	7
V. Objetivos Específicos	8
VI. Introducción: Rotavirus en el Mundo	9
VII. Rotavirus en México	10
VIII. Rotavirus	11
IX. Eficacia de vacunas	12
X. Rotarix vs Rota Teq	13

	Página
XI. VP6	16
XII. NSP4	17
XIII. Diseño, Expresión y evaluación de quimera VP6-NSP4	19
XIV. Análisis in silico	20
XV. Técnica de ADN recombinante	21
XVI. Análisis Inmunológico	22
XVII. Análisis Inmunológico de neonatos	23
XVIII. Avances	24
XIX. Análisis Bioinformático	25
XX. 1QHD	26

GUÍA EXPLICATIVA DE USO GENERAL PARA LA UNIDAD DE APRENDIZAJE DE SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN I (SEMINARIO INTERDISCIPLINARIO I) (DOCTORADO)

	Página
XXI. Análisis de temperatura de VP6 _{min}	27
XXII. Valores Energéticos para VP6 _{min}	28
XXIII. Desviación cuadrática promedio (RMSF) de los átomos de VP6 _{min}	29
XXIV. Desviación cuadrática promedio (RMSF) de los residuos de VP6 _{min}	30
XXV. Cambio conformacional VP6 vs VP6 _{min}	31
XXVI. Contacto de residuos de VP6 a diferentes temperaturas.	32
XXVII. Grafico de Ramachandran para residuos de VP6	33
XXVIII. Cronograma de Actividades.	34
XXIX. Referencias	34

I. TRAYECTORIA ACADÉMICA

DOCTORADO EN CIENCIAS

Área	Primer periodo lectivo	Segundo periodo lectivo	Tercer periodo lectivo	Cuarto periodo lectivo	Quinto periodo lectivo	Sexto periodo lectivo
Investigación	Seminario de investigación I HT: 0 HP: 2 Créditos: 2	Seminario de investigación II HT: 0 HP: 2 Créditos: 2	Seminario de investigación III HT: 0 HP: 2 Créditos: 2	Seminario de investigación IV HT: 0 HP: 2 Créditos: 2	Seminario de investigación V HT: 0 HP: 2 Créditos: 2	Seminario de investigación VI HT: 0 HP: 2 Créditos: 2
	Actividades de investigación de Doctorado I HT: 1 HP: 4 Créditos: 6	Actividades de investigación de Doctorado II HT: 1 HP: 10 Créditos: 12	Actividades de investigación de Doctorado III HT: 1 HP: 10 Créditos: 12	Actividades de investigación de Doctorado IV HT: 1 HP: 10 Créditos: 12	Actividades de investigación de Doctorado V HT: 1 HP: 10 Créditos: 12	Actividades de investigación de Doctorado VI HT: 1 HP: 10 Créditos: 12
Complementaria	Curso en Ciencias A HT: 3 HP: 2 Créditos: 8					
		Curso en Ciencias B HT: 3 HP: 2 Créditos: 8				

4.9.1.2 Doctorado en Ciencias

Unidad de Aprendizaje: Seminario de Investigación I				
Periodo lectivo	Horas totales	Horas Teóricas	Horas Prácticas	Créditos
Primero	2	0	2	2
Unidades de Aprendizaje Antecedentes		Unidades de Aprendizaje Consecuentes		
Ninguna		Seminario de Investigación II		
Fecha de elaboración: Mayo 2014		Elaboró: Comité curricular y colaboradores		
Objetivo general: Intercambiar conocimientos básicos e interdisciplinarios en torno a los protocolos de investigación de los estudiantes y las LGAC del Plan de Estudios.				
Contenido temático: Exposiciones individuales del protocolo y avances en investigación por parte del estudiante de acuerdo a las actividades establecidas en su protocolo de tesis. Pláticas de especialistas invitados.				
Actividades de aprendizaje: Asistencia y participación en cada Coloquio semestral de doctorantes, así como en las actividades académicas relacionadas con las LGAC del posgrado.				
El titular de la UA promoverá actividades de reflexión sobre la ética en la investigación y aplicación del conocimiento para establecer el compromiso y responsabilidad de cada estudiante de incluirla en su quehacer científico.				
El titular de la UA promoverá actividades de reflexión sobre conceptos de justicia, dignidad y equidad de las personas en el ámbito científico.				
Adicionalmente el titular de los seminarios dará seguimiento a los avances de los alumnos conforme a los protocolos de tesis aprobados por la Comisión Académica.				
Procedimiento de evaluación: La calificación corresponde a una evaluación diagnóstica de la presentación por escrito y oral de acuerdo a las actividades establecidas en su protocolo de tesis, con la finalidad de conocer los conocimientos y avances previos adquiridos durante el semestre del estudiante. Se evaluará la presentación por escrito y la defensa oral, considerando los siguientes criterios con sus escalas respectivas: 1. Tema principal 50% (Antecedentes, objetivos e hipótesis, materiales y métodos, conocimiento del tema) 2. Técnicas de presentación 10% (Claridad de la exposición y secuencia de la presentación) 3. Ayudas visuales 10% 4. Reacción y discusión de la audiencia 10% 5. Desarrollo académico del estudiante a las preguntas formuladas durante sus intervenciones en el seminario. 20% 6. Cumplimiento de metas de acuerdo a su protocolo de investigación 10% 6. Presentación escrita 10%				
Bibliografía Revistas y textos especializados acorde con las LGAC del Posgrado y el protocolo de investigación de cada alumno. Artículos especializados seleccionados por el titular de la Unidad de Aprendizaje. Bases de datos.				

4.9.1.3 Doctorado en Ciencias (integrado)

Unidad de Aprendizaje: Seminario Interdisciplinario I				
Periodo lectivo	Horas totales	Horas Teóricas	Horas Prácticas	Créditos
Primero	2	0	2	2
Unidades de Aprendizaje Antecedentes		Unidades de Aprendizaje Consecuentes		
Ninguna		Seminario Interdisciplinario II		
Fecha de elaboración: Mayo 2014		Elaboró Comité curricular y colaboradores		
Objetivo general: Analizar y discutir los conocimientos básicos e interdisciplinarios en torno a los protocolos de investigación de los estudiantes y las LGAC del Plan de Estudios				
Contenido temático: Exposiciones individuales del protocolo y avances en investigación por parte de cada estudiante Pláticas de especialistas invitados				
Actividades de aprendizaje: El titular de los seminarios dará seguimiento a los avances de los alumnos conforme a los protocolos de tesis aprobados por la Comisión Académica. El titular de la UA promoverá actividades de reflexión sobre la ética en la investigación y aplicación del conocimiento para establecer el compromiso y responsabilidad de cada estudiante de incluirla en su quehacer científico. El titular de la UA promoverá actividades de reflexión sobre conceptos de justicia, dignidad y equidad de las personas en el ámbito científico. Adicionalmente el titular de los seminarios dará seguimiento a los avances de los alumnos conforme a los protocolos de tesis aprobados por la Comisión Académica.				
Procedimiento de evaluación: 70% Intervención y participación activa del estudiante sobre los avances de los protocolos de investigación por alumno. 30% Resumen sobre los avances de las propuestas de trabajo en función de su proyecto de tesis de trabajo planteado en su protocolo de investigación de posgrado.				
Bibliografía Revistas y textos especializados acorde con las LGAC del Posgrado y el protocolo de investigación de cada alumno. Artículos especializados seleccionados por el titular de la Unidad de Aprendizaje. Bases de datos.				



UAEM

Universidad Autónoma
del Estado de México

UAEM

Universidad Autónoma
del Estado de México

III. Evaluación Físicoquímica e Inmunológica de una quimera VP6-NSP4 de rotavirus.

IV. Objetivo General

- Diseñar, construir y caracterizar fisicoquímicamente la quimera VP6-NSP4 de rotavirus usando técnicas computacionales y experimentales con el propósito de analizar su respuesta inmune en ratones.

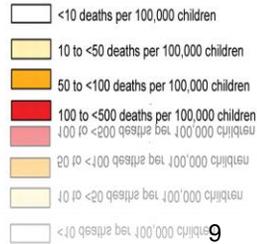
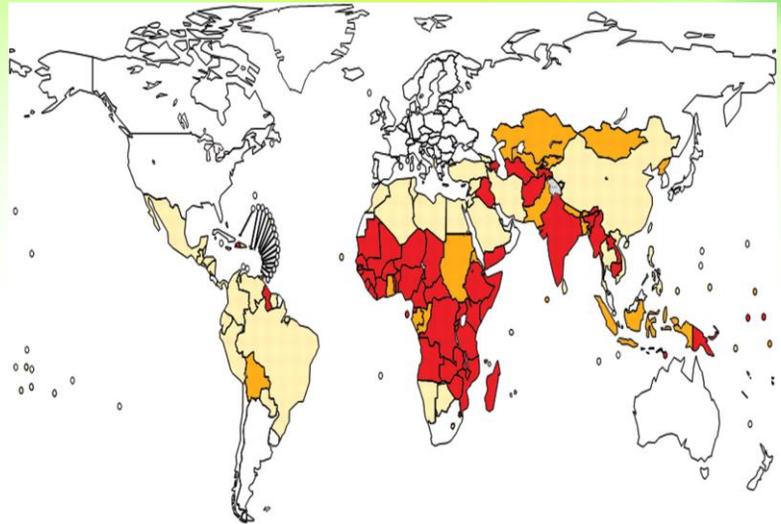
V. Objetivos Específicos

- 1.-Caracterizar dinámica y estructuralmente la quimera VP6-NSP4 mediante técnicas computacionales con el propósito de identificar la regiones proteicas de afinidad química.
- 2.-Expresar, producir y purificar la proteína quimérica de rotavirus VP6-NSP4 mediante la técnica de ADN recombinante.
- 3.- Analizar si la construcción quimérica VP6-NSP4 induce una respuesta inmune protectora contra el reto con rotavirus murino EDIM.

VI. Introducción Rotavirus en el mundo

- 453 mil muertes anuales (Who, 2013)

Tate et al., 2012



VII. Rotavirus en México

Tasa de mortalidad de neonatos en 2010

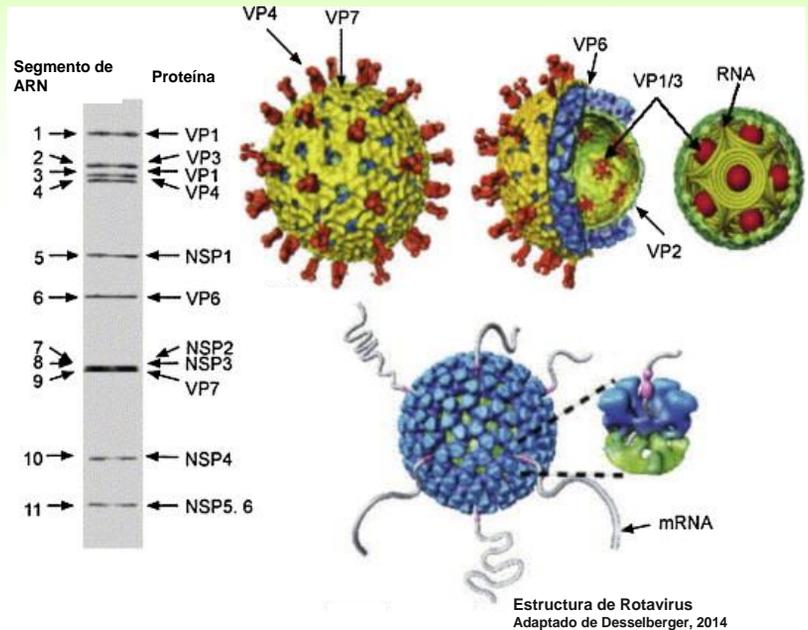
- Chiapas 284
- Oaxaca 171
- Puebla 136
- Yucatán 117
- México 114
- Tlaxcala 111
- Veracruz 106
- Sonora 105
- Chihuahua 105
- Quintana Roo 101



SiNaVE, 2012

VIII. Rotavirus

- 1973 Bishop
- Gastroenteritis severa
- 11 segmentos de ARN bicatenario



IX. Eficacia de vacunas

Rotarix

Región / país	Eficacia de la vacuna contra gastroenteritis severa causada por rotavirus
Europa	96%
Latinoamérica	85%
Sudáfrica	72%
Malawi	49%

Rotateq

Región / país	Eficacia de la vacuna contra gastroenteritis severa causada por rotavirus
Finlandia	100%
Kenia	83%
Ghana	65%
Vietnam	75%
Latinoamérica	73%
Bangladesh	43%

2010 La Food and Drug Administration (FDA) de EE. UU retiró el uso de Rotarix debido a que se hallaron en la vacuna restos de ADN de un virus denominado circovirus porcino 1 (PCV-1).

X. Rotarix vs RotaTeq

Características	Rotarix	RotaTeq
Productor	GlaxoSmithKlineBiologicals	Merck Sharp & Dohme
No. Serotipos	Monovalente	Pentavalente
Serotipos incluidos	P1A[8] G1	P7[5] G1, P7[5] G2, P7[5] G3, P7[5] G4, P7[5] G7
Formulación	Monodosis, liofilizada, reconstituir con buffer	Monodosis, líquida
Dosis	Dos	Tres
Edad de administración	2 y 4 meses	2, 4 y 6 meses
Cepa	Bovino	Humano-Bovino
Precio en México	\$1475.32 por dosis	\$1570.92 por dosis

RESEARCH PAPER



Rotavirus capsid VP6 protein acts as an adjuvant in vivo for norovirus virus-like particles in a combination vaccine

Vesna Blazevic^a, Maria Malm^a, Daisuke Arinobu^b, Suvi Lappalainen^a, and Timo Vesikari^a

^aVaccine Research Center, University of Tampere Medical School, Tampere, Finland; ^bR&D Project Office, UMN Pharma Inc., Yokohama, Kanagawa, Japan

VP6: A Candidate Rotavirus Vaccine

Richard L. Ward and Monica M. McNeal

Division of Infectious Diseases, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, Ohio

Arch Virol (2015), 160, 2075–2078
DOI 10.1007/s00705-015-2461-8



BRIEF REPORT

Protection against live rotavirus challenge in mice induced by parenteral and mucosal delivery of VP6 subunit rotavirus vaccine

Suvi Lappalainen¹ · Ana Ruth Pastor² · Maria Malm¹ · Vanessa López-Guerrero³ · Fernando Esquivel-Guadarrama³ · Laura A. Palomares² · Timo Vesikari¹ · Vesna Blazevic¹

Received: 24 February 2015 / Accepted: 20 May 2015 / Published online: 29 May 2015
© The Author(s) 2015. This article is published with open access at Springerlink.com

Pérez et al. *Virology Journal* (2015) 12:205
DOI 10.1186/s12965-015-0436-8

Virology Journal

RESEARCH

Open Access

Engineering and expression of a human rotavirus candidate vaccine in *Nicotiana benthamiana*

Francisco F. P. G. Pérez¹, David L. R. Mutepe¹, Ayesha M. Khan¹, Johann H. Ehl¹, Sandiswa Mbewana¹, Alberdina A. A. van Dijk¹, Edward P. Rybicki² and Inga I. Hitzeroth^{1*}



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com



Journal of Biotechnology 121 (2006) 272–283

Journal of
BIOTECHNOLOGY

www.elsevier.com/locate/jbiotec

Mucosal immunization with a ricin toxin B subunit–rotavirus NSP4 fusion protein stimulates a Th1 lymphocyte response

Nak-Won Choi^a, Mary K. Estes^b, William H.R. Langridge^{a,*}

^aCenter for Molecular Biology and Gene Therapy, Department of Biochemistry and Microbiology, School of Medicine, Loma Linda University, Loma Linda, CA 92350, USA

^bDepartment of Molecular Virology and Microbiology, Baylor College of Medicine, Houston, TX 77030, USA

Received 16 April 2005; received in revised form 15 July 2005; accepted 26 July 2005

Designing, Construction and Expression of a Recombinant Fusion Protein Comprising the Hepatitis E Virus ORF2 and Rotavirus NSP4 in the Baculovirus Expression System

Manoochehr Makvandi,¹ Ali Teimoori,^{1,2} Niloofar Neisi,^{1,*} and Alireza Samarbafzadeh¹

¹Infectious and Tropical Disease Research Center, Health Research Institute, Department of Virology, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, IR Iran

²Research center for Infectious Diseases of Digestive System; Imam Khomeini hospital, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, IR Iran

*Corresponding author: Niloofar Neisi, Infectious and Tropical Disease Research Center, Health Research Institute, Department of Virology, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, IR Iran. Tel: +98-9166136984, Fax: +98-6133332036; +98-6133362411, E-mail: niloofarneisi@yahoo.com

Received 2016 June 26; Revised 2016 September 18; Accepted 2016 September 19.



International Journal of
Molecular Sciences



Review

A Brief Review of Computer-Assisted Approaches to Rational Design of Peptide Vaccines

Ashesh Nandy^{1,*} and Subhash C. Basak²

¹ Centre for Interdisciplinary Research and Education, Jodhpur Park, Kolkata 700068, India

² Natural Resources Research Institute and Department of Chemistry & Biochemistry, University of Minnesota Duluth, Duluth, MN 55811, USA; sbasak@nrri.umn.edu

* Correspondence: anandy43@yahoo.com; Tel.: +91-943-357-9452

Academic Editors: Humberto Gonzalez-Diaz, Roberto Todeschini and Alejandro Pazos Sierra

Received: 1 April 2016; Accepted: 27 April 2016; Published: 4 May 2016

XI. VP6

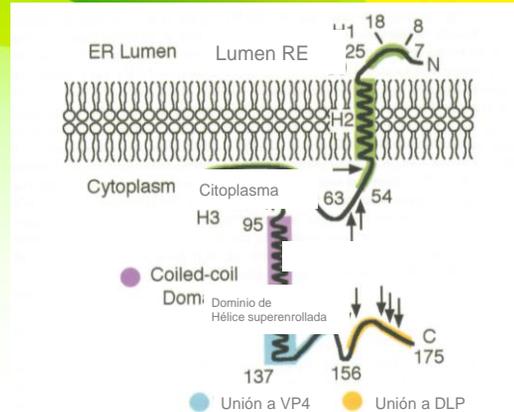
- Alta inmunogenicidad
- Candidato vacunal contra rotavirus (Ward and McNeal, 2010)
- Conservada entre serotipos
- 50% virión
- 397 aminoácidos



Estructura de VP6 de rotavirus bovino.
Mathieu et al. 2001

XII. NSP4

- Enterotoxina (Ball et al., 1996)
- Unión a canales de Ca^{2+}
- Unión con VP6 (Choi et al., 2006)
- 175 aminoácidos



- Diseñar, construir y caracterizar fisicoquímicamente la quimera VP6-NSP4 de rotavirus usando técnicas computacionales y experimentales con el propósito de analizar su respuesta inmune en ratones.

XIII. Diseño, expresión y evaluación de quimera VP6-NSP4

Análisis *in silico*

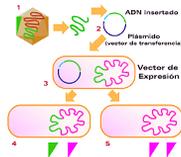
Expresión de
recombinantes
Bacterias y
plantas

Análisis *in vitro*

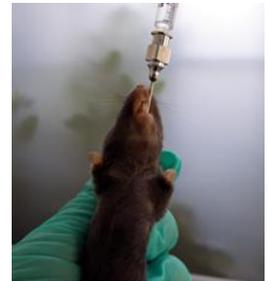
Análisis
Inmunológico



TÉCNICA DEL ADN RECOMBINANTE



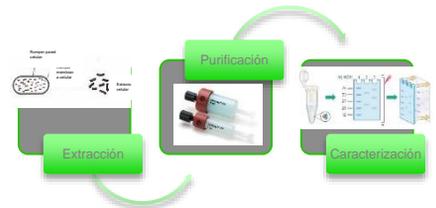
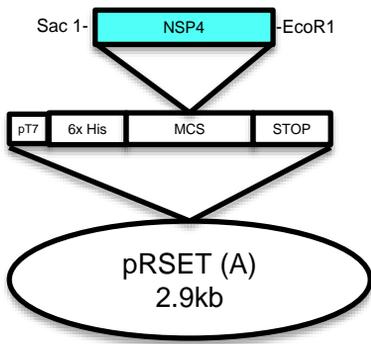
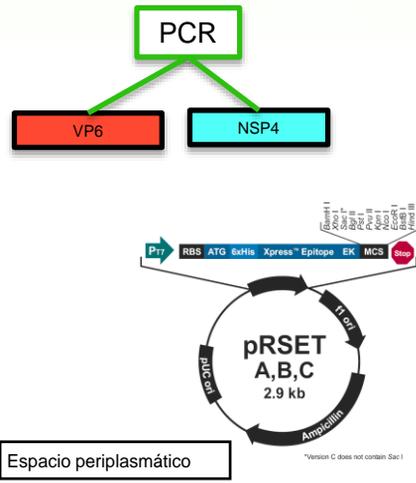
- Microcalorimetría de titulación isotérmica
- Temperatura
- pH ideal



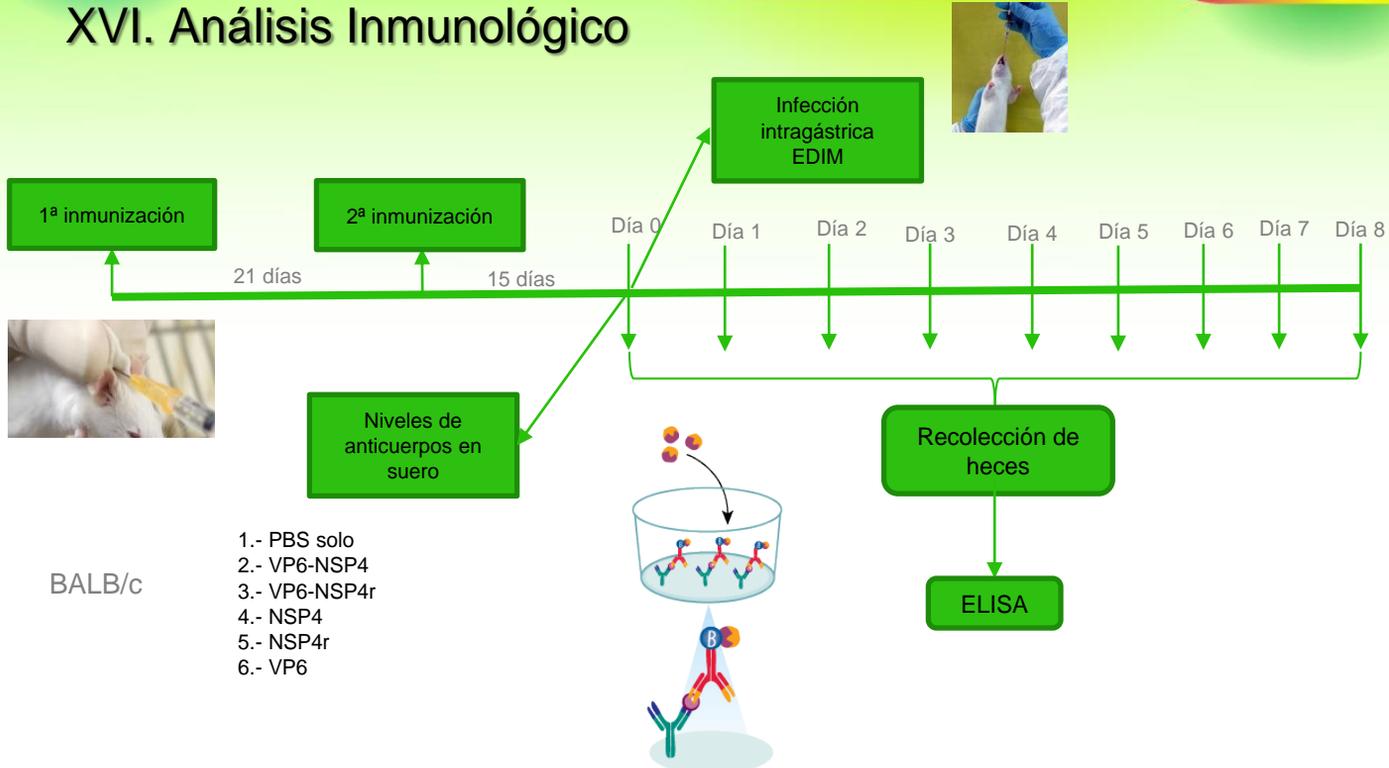
XIV. Análisis in *silico*

- Simulación individual en vacío
- Simulación molecular
- Herramientas bioinformaticas: GROMACS, Pymol, Grace

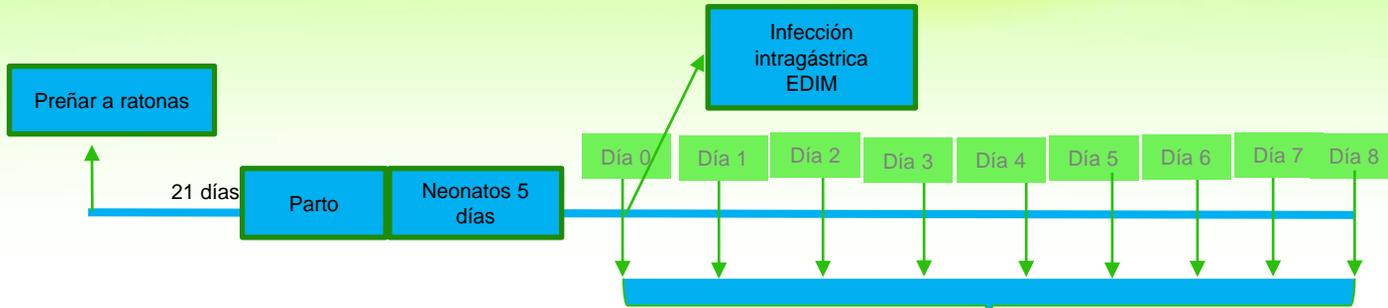
XV. Técnica de ADN recombinante



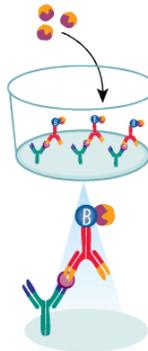
XVI. Análisis Inmunológico



XVII. Análisis Inmunológico de neonatos



- 1.- PBS solo
- 2.- VP6-NSP4
- 3.- VP6-NSP4r
- 4.- NSP4
- 5.- NSP4r
- 6.- VP6



Recolección de heces

ELISA



XVIII. Avances

XIX. Análisis Bioinformático

VP6 de rotavirus murino

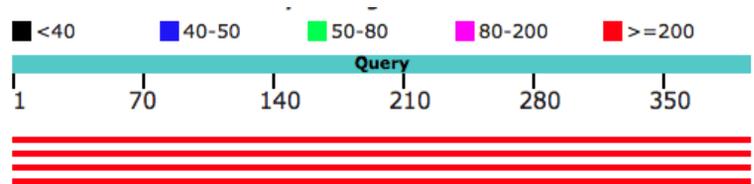
- GenBank: AHN05769.1
- 397 aa

• Secuencia de aminoácidos en formato FASTA:

```

MDVLYSISRCLKDARDKIVEGTLYSNVSDLIQQFNQMLVTMNGN
EFQTGGINLPFRNWNFDGFLGLGTTLLNLDANYVESARTTIDYFVD
FIDNVCMDEMVRRESQRNGIAPQSDALRKLKSGVKFRRINFNNSSE
YIENWNLQNRQRGTGFTFHKPNIFPYASFTLNRSQPQHDNLM
GTMWLNAGSEIQVAGFDYSCAINAPANIQQFEHIVQLRRVLTAT
ITLLPDAERFSFPRVINSADGATTWYFNVPVILRPNNVEVEFLNG
QIINTYQARFGTIVARNFDITRLSFQLMRPPNMTPAVAALFPNAQ
PFEHHATVGLTLRDSAICESVLADASETMLANVTSVRQEYAIPIV
GPVFPPGMNWTDLITNYSRPNLQRFVFTVASIRSMVLK
    
```

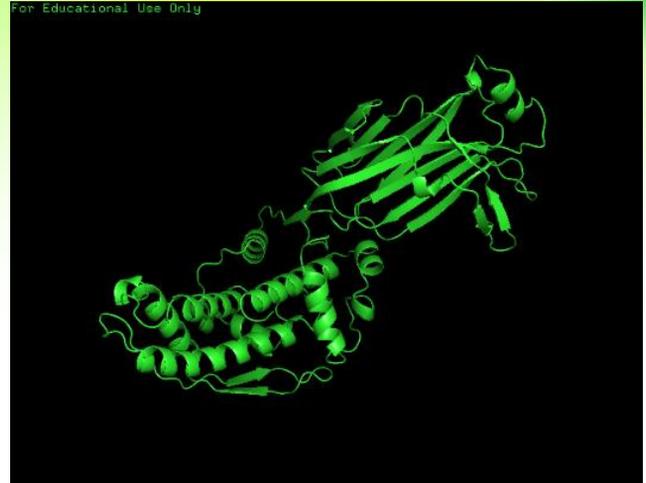
CBLAST



Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Chain C, Atomic Model Of An Infectious Rotavirus Particle	777	777	100%	0.0	96%	3N09_C
<input type="checkbox"/> Chain C, Crystal Structure Of The Rotavirus Double Layered Particle	776	776	100%	0.0	96%	3KZ4_C
<input type="checkbox"/> Chain C, Vp7, Reconstituted Rotavirus Dlp	771	771	100%	0.0	95%	3GZU_C
<input type="checkbox"/> Chain A, Crystal Structure Of Vp6, The Major Capsid Protein Of Group A Rotavirus	771	771	100%	0.0	95%	1QHD_A

XX. 1QHD

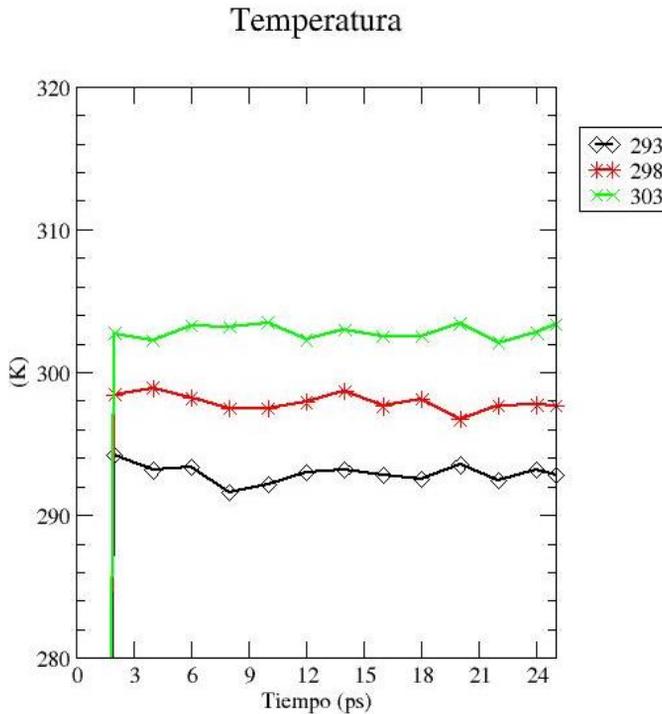
- Rotavirus bovino
- Método experimental:
Cristalografía de rayos X
- 398 residuos



Suite: Gromacs

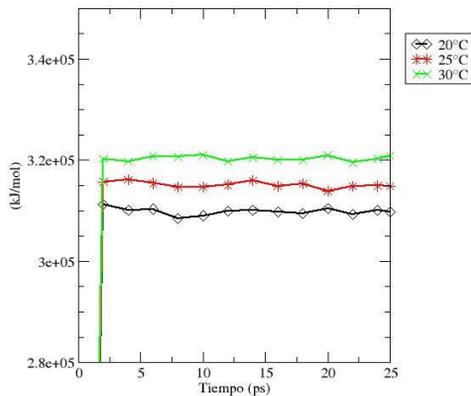
- Minimizó energía
- Condiciones de frontera periódica
- Ensamble Estadístico: CANONICO NVT (partículas, volumen, temperatura)

XXI. Análisis de temperatura de VP6_{min}

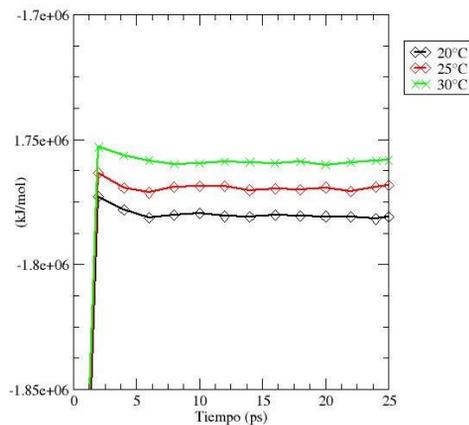


XXII. Valores Energéticos para VP6_{min}

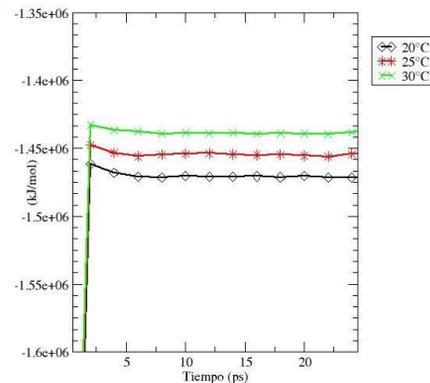
Energía Cinética de VP6



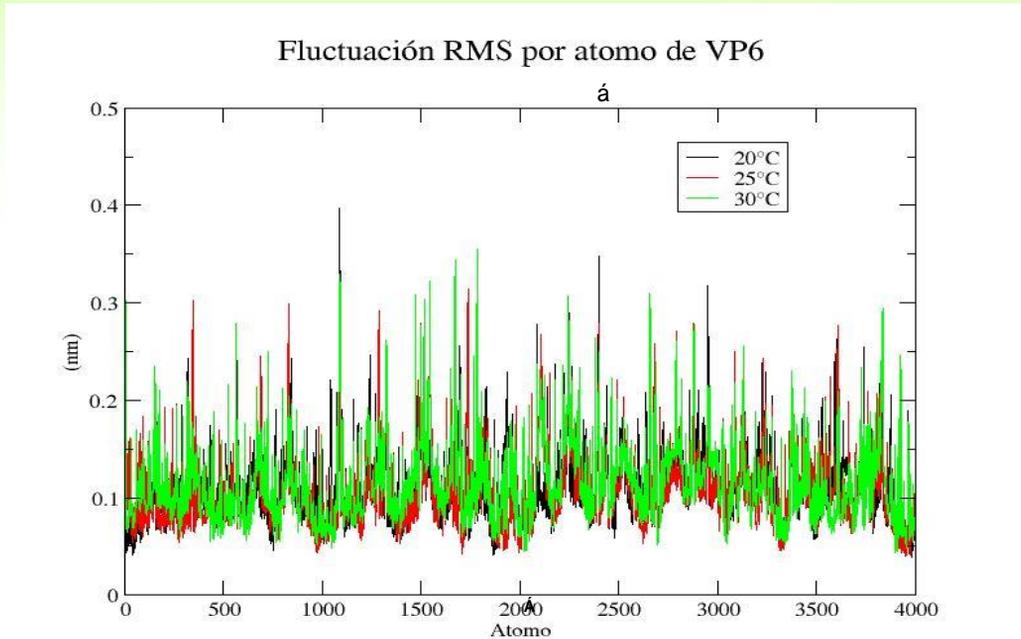
Energía potencial de VP6



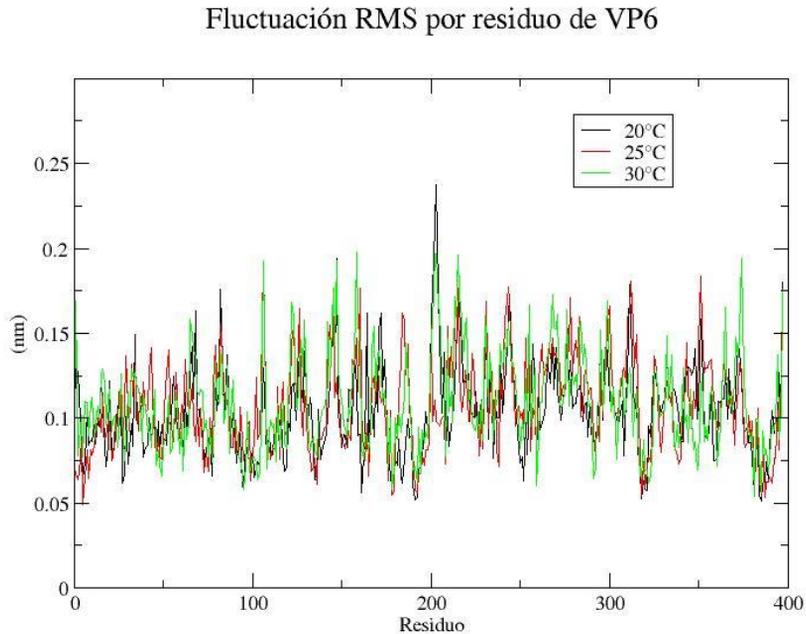
Energía Total de VP6



XXIII. Desviación cuadrática promedio(RMSF) de los átomos de VP6_{min}

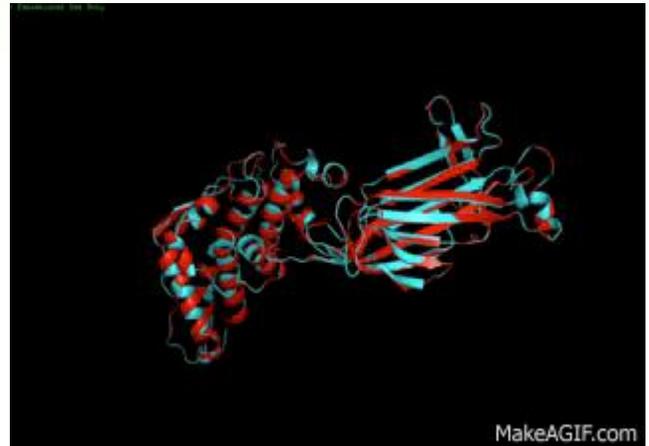
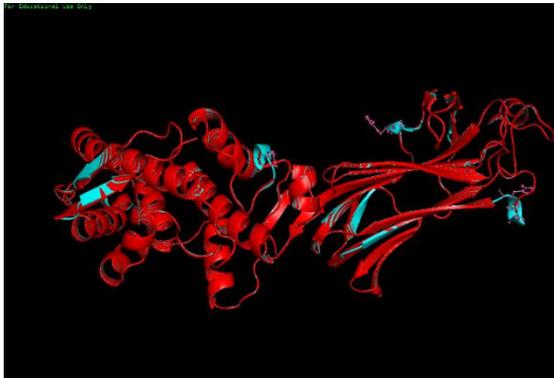


XXIV. Desviación cuadrática promedio (RMSE) de los residuos de VP6_{min}



202, 203

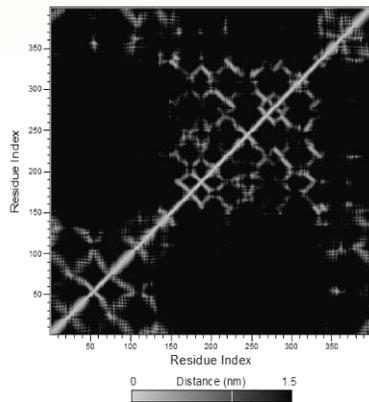
XXV. Cambio conformacional VP6 vs VP6_{min}



XXVI. Contacto de residuos de VP6 a diferentes temperaturas

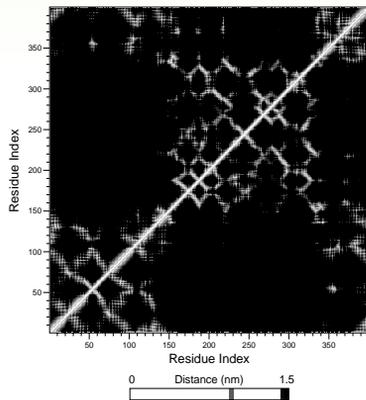
Contacto de residuos de VP6 a 20C

Mean smallest distance



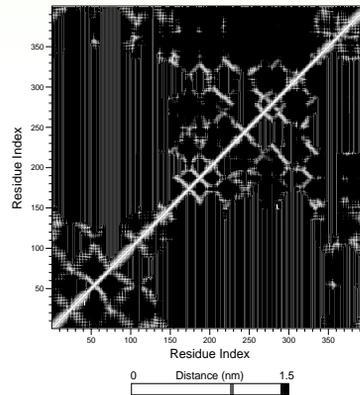
Contacto de residuos de VP6 a 25C

Mean smallest distance

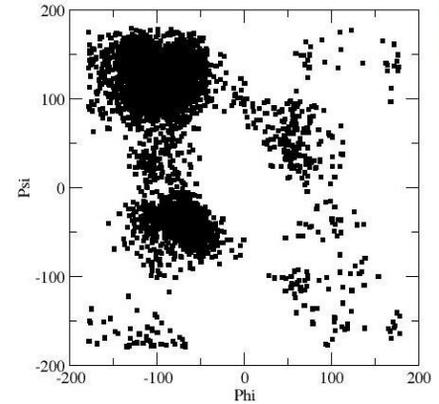
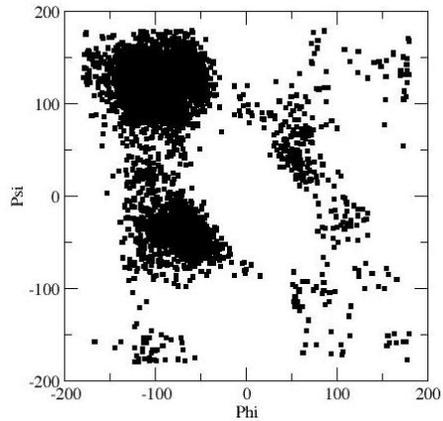
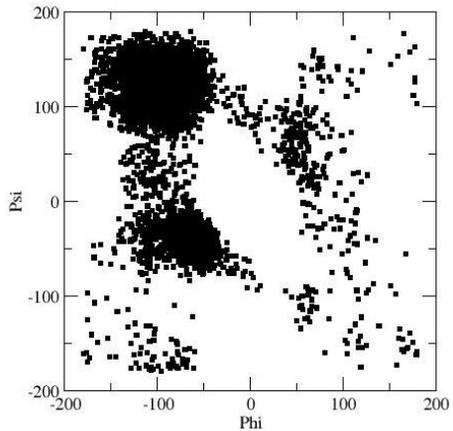


Contacto de residuos de VP6 a 30C

Mean smallest distance



XXVII. Grafico de Ramachandran para residuos de VP6



XXIX. Referencias

1. Vesna Blazevic, et al. *Human Vaccines & Immunotherapeutic*, Vol. 12, No. 3, 740-748 (2016)
2. Richard L. Ward & Monica M. McNeal, *Arch Virol*, 160, 2075-2078 (2015)
3. Francisco F. P. G. Pera. et al. *Virology Journal* 12, 205 (2015).
4. Nak-Won Choi, Mary K. Estes, William H.R. Langridge, *Journal of Biotechnology*, 121, 272-283 (2006)
5. Ashesh Nandy & Subhash C. Basak, *International Journal of Molecular Sciences*. (2016)