



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Máster en Calidad, Seguridad y Tecnología de los Alimentos 2020-2021

Fracciones bioactivas del lactosuero: aislamiento y evaluación de la actividad antirrotavirus *in vitro*.

Bioactive fractions of bovine whey: isolation and evaluation of *in vitro* antirrotaviral activity.

Autor/es

Laura Torres Martínez

Directoras

M^a Lourdes Sánchez Paniagua

Dimitra Graikini Evangelinou

Facultad de Veterinaria

2020-2021

Índice

1. Resumen	1
2. Abstract.....	2
3. Abreviaturas	3
4. Introducción.....	4
4.1. Composición de la leche	4
4.1.1. Hidratos de carbono	4
4.1.2. Lípidos.....	5
4.1.3. Proteínas	5
4.2. El lactosuero	6
4.3. Proteínas del lactosuero	7
4.3.1. β -lactoglobulina	7
4.3.2. α -lactalbúmina	8
4.3.3. Albúmina sérica.....	8
4.3.4. Inmunoglobulinas	8
4.3.5. Lactoferrina	9
4.3.6. Lactoperoxidasa.....	10
4.3.7. Proteosa peptona.....	10
4.3.8. Glicomacropéptido	11
5. Hipótesis y objetivos	14
6. Metodología.....	14
6.1. Obtención de lactosuero.....	14
6.1.1. Tratamiento térmico del lactosuero	15
6.2. Aislamiento de fracciones proteicas	15
6.2.1. Glicomacropéptido (GMP).....	15
6.2.2. Fracción proteosa peptona.....	16
6.2.3. Componente 3 de la proteosa peptona.....	17
6.2.4. Fraccionamiento del lactosuero	18
6.3. Ensayo del ácido bicinconínico	18
6.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE).....	18
6.5. Tinción PAS (Periodic-Acid-Schiff)	19
6.6. Tinción con azul de Coomassie	20
6.7. Detección de GMP con el kit comercial Stick cGMP.....	20

6.8.	Cuantificación de ácidos siálicos con un kit comercial	20
6.9.	Hidrólisis de GMP comercial	21
6.9.3.	Hidrólisis con pepsina	21
6.9.4.	Hidrólisis con tripsina	21
6.9.5.	Hidrólisis con pepsina, tripsina y quimotripsina.....	21
6.10.	Ensayos con cultivos celulares.....	21
6.10.3.	Siembra y mantenimiento del cultivo celular	21
6.10.4.	Ensayo de citotoxicidad.....	22
6.10.5.	Ensayo de neutralización	23
6.10.6.	Ensayo de bloqueo celular.....	24
6.10.7.	Ensayo de post-unión	24
6.11.	Análisis estadístico.....	25
7.	Resultados y discusión	26
7.1.	Aislamiento de GMP	26
7.2.	Aislamiento de PP3.....	29
7.3.	Aislamiento de fracciones del lactosuero	32
7.4.	Evaluación de la actividad antirrotaviral de las fracciones proteicas	32
7.4.1.	Lacprodan CGMP-10	32
7.4.2.	Glicomacropéptido	34
7.4.3.	Fracciones de lactosuero	35
7.4.4.	Componente 3 de la proteosa peptona	36
8.	Conclusiones.....	39
9.	Bibliografía.....	40

1. Resumen

El rotavirus pertenece a la familia *Reoviridae* y causa diarreas severas y moderadas en niños menores de 5 años, produciendo muchas muertes al año en todas partes del mundo. El lactosuero obtenido durante la elaboración del queso es un subproducto de la industria alimentaria que contiene proteínas con interés nutritivo y biológico. De su separación por métodos de ultrafiltración se pueden obtener fracciones con actividad biológica. Algunas proteínas y péptidos presentes en el lactosuero bovino, como el glicomacropéptido (GMP) y el componente 3 de la proteosa peptona (PP3), exhiben actividad frente a bacterias patógenas, pero existe poca información sobre su actividad frente a virus.

El objetivo de este Trabajo de Fin de Máster ha sido el aislamiento y caracterización de proteínas y péptidos derivados del lactosuero bovino por medio de métodos cromatográficos y el fraccionamiento del lactosuero por métodos de ultrafiltración. Se ha evaluado la capacidad del GMP, sus hidrolizados, un producto comercial enriquecido en GMP, la PP3 y fracciones del lactosuero para neutralizar la infección causada por la cepa de rotavirus bovino WC3 utilizando la línea celular MA104.

El GMP, la PP3, la fracción del lactosuero con un peso molecular superior a 10 kDa y la fracción con un peso molecular inferior a 3 kDa exhiben actividad neutralizante frente a los rotavirus. El grado de neutralización se incrementa cuando se aumenta la concentración de proteína. No se observa neutralización para la fracción de 3-10 kDa, ni para el producto comercial enriquecido en GMP ni para sus hidrolizados.

2. Abstract

Rotaviruses belong to the *Reoviridae* family and cause severe and moderate diarrhea in children under 5 years of age, producing many deaths annually worldwide. The whey obtained during cheese making is a by-product of the food industry containing proteins with nutritional and biological interest. From their separation by ultrafiltration methods, fractions with biological activity can be obtained. Some proteins and peptides present in bovine whey, such as glycomacropeptide (GMP) and component 3 of proteose peptone (PP3) exhibit activity against pathogenic bacteria, but there is little information on their activity against viruses.

The objective of this Master's dissertation has been the isolation and characterization of proteins and peptides derived from bovine whey by means of chromatographic methods and the fractionation of the whey by ultrafiltration methods. The ability of GMP, its hydrolysates, a commercial product enriched in GMP, PP3 and whey fractions to neutralize the infection caused by the bovine rotavirus strain WC3 have been evaluated using the MA104 cell line.

GMP, PP3, the whey fraction with a molecular weight greater than 10 kDa and that with molecular weight lower than 3 kDa exhibit neutralizing activity against rotavirus. The degree of neutralization increases when the protein concentration is increased. Neutralization is not observed for the fraction of 3-10 kDa, nor for the commercial product enriched in GMP and for its hydrolysates.

3. Abreviaturas

BCA: bicinchoninic acid (ácido bicinconínico)

BSA: bovine serum albumin (albúmina sérica bovina)

FCS: fetal calf serum (suero fetal bovino)

GMP: glicomacropéptido

Igs: inmunoglobulinas

PP3: componente 3 de la proteosa peptona

PPT: fracción proteosa peptona

LF: lactoferrina

LP: lactoperoxidasa

LPL: lipoproteinlipasa

MFGM: milk fat globule membrane (membrana del glóbulo graso de la leche)

PBS: phosphate-buffered saline (tampón fosfato salino)

SD: standard deviation (desviación estándar)

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico)

4. Introducción

4.1. Composición de la leche

La leche es un líquido blanquecino segregado por las glándulas mamarias de las hembras de los mamíferos cuyo papel principal es el aporte de nutrientes a las crías en los primeros meses de vida con la finalidad de promover su correcto desarrollo. De acuerdo con el Decreto 2848/1967, de 21 de septiembre, por el que se aprueba el texto del Código Alimentario Español, la denominación “leche” hace referencia única y exclusivamente a la leche natural de vaca. En la actualidad, la vaca (*Bos taurus*) es el animal que contribuye en mayor porcentaje a la producción de leche en el mundo. Puesto que los requerimientos nutricionales de cada especie son únicos, la composición de la leche difiere según el tipo de animal de procedencia (Fox *et al.*, 2015). El tipo de alimentación de los animales lecheros también es un factor condicionante de la composición final de la leche. El principal componente de la leche es el agua, que supone en promedio el 80% del producto, seguido de proteínas, grasas, hidratos de carbono y otros componentes a nivel traza, como minerales, vitaminas, hormonas y enzimas.

4.1.1. Hidratos de carbono

El principal hidrato de carbono presente en la leche es la lactosa, un disacárido sintetizado en las células del epitelio mamario a partir de galactosa y glucosa, unidas por un enlace glicosídico β 1-4. La síntesis de lactosa atrae por ósmosis agua al aparato de Golgi afectando al volumen de la leche y a la concentración de caseínas. Por lo tanto, la concentración de lactosa en la leche está inversamente relacionada con la concentración de caseína (Jenness *et al.*, 1987). La lactosa sirve como fuente de energía inmediata para el neonato, actuando como una alternativa a los lípidos. La lactosa es un azúcar reductor y puede participar en la reacción de Maillard, una reacción de pardeamiento no enzimático. Aunque los compuestos generados a través de esta reacción son apreciados en otros alimentos, en el caso de la leche puede derivar en la aparición de “off-flavors” y por eso, deben ser evitados. A pesar de ser un azúcar, su poder endulzante es bajo, de manera que la leche no presenta un sabor dulce. Sin embargo, la lactosa es de interés en la elaboración de productos fermentados a nivel industrial, sirviendo como fuente de carbono para las bacterias ácido-lácticas fermentadoras que producirán ácido láctico (Fox, 2009).

Además de lactosa, se han encontrado otros monosacáridos y oligosacáridos, algunos de los cuales pueden encontrarse formando parte de las glicoproteínas, como la mucina, y de los glicolípidos, presentes en la membrana del glóbulo graso (Dewettink *et al.*, 2008).

4.1.2. Lípidos

En lo que respecta a los lípidos, comúnmente denominados grasas, se ha podido observar una amplia diferencia entre especies. Factores como la genética, la raza, la edad o el estado de lactación influyen sobre la composición de grasa en la leche. Los lípidos suponen una elevada fuente de energía; por tanto, a mayor contenido de grasa mayor densidad calórica tendrá la leche. La grasa láctea es una importante fuente de nutrientes. Los componentes lipídicos de la leche se agrupan formando glóbulos grasos, cuyo núcleo está formado por triglicéridos rodeados por una fina membrana denominada membrana del glóbulo graso de la leche (MFGM, por sus siglas en inglés). En la MFGM nos encontramos una doble membrana lipídica con proteínas que forman una red cargada electrostáticamente. En su núcleo nos encontramos una monocapa lipídica en forma de gotículas (Dewettink *et al.*, 2008).

4.1.3. Proteínas

La fracción proteica de la leche ha ganado gran interés en las últimas décadas por su potencial actividad biológica. Las proteínas más abundantes de la leche son las caseínas (80%) que encontramos agregadas formando micelas gracias a la presencia de calcio. La estabilidad de las micelas es importante tanto desde el punto de vista nutricional como tecnológico. Las caseínas comprenden un grupo de proteínas insolubles a pH ácido que pueden dividirse en distintos tipos de acuerdo con su grado de fosforilación. Así, nos encontramos con las caseínas α , β y γ , cada una de las cuales a su vez se divide en subtipos. La κ -caseína es la única que se encuentra glicosilada conteniendo galactosa, N-acetilgalactosamina y ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico). La mayoría de las proteínas que encontramos en la leche han sido caracterizadas; sin embargo, algunos de sus derivados y la actividad biológica de los mismos todavía están en estudio. Además de las caseínas y las proteínas del lactosuero, en la leche se encuentran otros dos grupos de material proteico: la proteosa peptona y el nitrógeno no proteico. Cuando se somete la leche a un tratamiento térmico y posterior acidificación, las caseínas precipitan junto a las proteínas del suero. Posteriormente, se trata el lactosuero con TCA al 12% y los compuestos nitrogenados que precipitan se consideran proteosa peptona, mientras que

aquellos que permanecen en solución se corresponden con la fracción de nitrógeno no proteico.

4.2. El lactosuero

El primer paso del proceso de elaboración del queso consiste en la coagulación de la leche, en la que las caseínas precipitarán mientras las proteínas restantes quedarán en solución junto a otros componentes. La solución resultante de esta etapa consiste en un líquido conocido como lactosuero. El lactosuero es un líquido turbio y amarillento cuyo contenido en proteínas, en el caso de la leche bovina, representa el 20% de las proteínas de la leche.

Los sistemas de filtración con membranas fueron inicialmente utilizados para la desalinización de agua en los años 50 y a partir de 1965 se comenzaron a utilizar en el procesado de alimentos. Existen cinco tipos diferentes de filtración con membrana que pueden ser utilizados individualmente o en combinación: ultrafiltración (UF), microfiltración (MF), electrodiálisis (ED), nanofiltración (NF) y ósmosis inversa (RO) (Onwulata, 2008). El método de ultrafiltración permite obtener componentes separándolos entre sí de acuerdo con su peso molecular, haciendo uso de membranas con un tamaño de corte entre 1 y 100 kDa, rango en el que se encuentran las proteínas del lactosuero. Las principales fracciones proteicas del lactosuero son β -lactoglobulina, albúmina sérica, α -lactalbúmina e inmunoglobulinas. Una vez separadas las proteínas del resto de componentes se concentran por evaporación o por sistemas de membranas. Alternativamente, se puede llevar a cabo un fraccionamiento utilizando técnicas de intercambio iónico para obtener aislados de proteínas del suero.

Además de la actividad biológica que posee la propia proteína nativa, todas las proteínas contienen secuencias que cuando son liberadas por proteólisis exhiben propiedades biológicas tales como actividad antimicrobiana, efectos antagonistas reductores de la presión arterial por inhibición de la enzima ACE, efectos cito o inmunomoduladores, actividad antitrombótica, capacidad de unir minerales y actividad opiácea (Hartmann *et al.*, 2007).

Hace unos años, el lactosuero representaba un subproducto desaprovechado a nivel industrial. En la actualidad, presenta una amplia variedad de aplicaciones en distintas áreas, siendo la nutricional la de mayor relevancia, pero existe un creciente interés en la industria farmacéutica por estos derivados peptídicos y la aplicación de ingredientes

enriquecidos con proteínas del lactosuero valorados por su actividad biológica (Ramos *et al.*, 2016).

4.3. Proteínas del lactosuero

4.3.1. β -lactoglobulina

Es la proteína más abundante del lactosuero suponiendo aproximadamente el 50% de sus proteínas y pertenece a la familia de las lipocalinas (Kontopidis *et al.*, 2004). Se compone de una cadena de 162 residuos de aminoácidos y su peso molecular en la forma monomérica es de 18.3 kDa, aunque al pH normal de la leche se encuentra en forma de dímero (Hernández-Ledesma *et al.*, 2008). A pesar de su estructura globular, presenta una baja solubilidad en su forma aislada. En la leche bovina existen seis variantes genéticas (Mulvihill *et al.*, 1987), pero son los fenotipos A y B los predominantes (Hernández-Ledesma *et al.*, 2008). Se han propuesto varios roles para esta proteína como son la participación en el transporte de pequeñas sustancias, tales como ácidos grasos y retinol, y su intervención en la transferencia de inmunidad al recién nacido (Pérez y Calvo, 1995).

En la industria alimentaria, la β -lactoglobulina es utilizada por su alto valor nutricional y funcional. Su capacidad gelificante encuentra aplicación en áreas donde se requieren proteínas con capacidad de retención de agua y texturización. También es capaz de formar espumas estables incluso en presencia de azúcar, siendo una alternativa a la clara de huevo. Por otra parte, su alto contenido en aminoácidos esenciales, comparables en composición a la clara de huevo, la convierte en una proteína con un elevado valor nutricional. Todas estas propiedades se amplían si además hablamos de sus derivados peptídicos. Se han descrito péptidos derivados de la hidrólisis de la β -lactoglobulina con capacidad de inhibir la enzima convertidora de angiotensina (ACE, por sus siglas en inglés) (EC 3.4.15.1). La ACE tiene acción vasoconstrictora provocando hipertensión y su inactivación es de relevancia en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. Otro uso de estos péptidos puede ser como antioxidantes, siendo sustitutos de los aditivos sintéticos utilizados para evitar el deterioro de los alimentos debido a las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), generadas por agentes externos (Chatterton *et al.*, 2006).

4.3.2. α -lactalbúmina

La segunda proteína mayoritaria presente en el lactosuero es la α -lactalbúmina. Es una proteína globular formada por una sola cadena peptídica de 123 aminoácidos y de un peso molecular de alrededor de 14 kDa, que muestra propiedades de unión de iones, autoasociación, polimerización y buena solubilidad (Mulvihill *et al.*, 1987). Su misión biológica consiste en la regulación de la síntesis de lactosa, mientras que su importancia nutricional reside en la elevada presencia del aminoácido esencial triptófano en su composición (Markus *et al.*, 2002).

Tanto la β -lactoglobulina como la α -lactalbúmina son proteínas resistentes a la acción de enzimas endógenas de la leche como la plasmina (EC 3.4.21.7) (Madureira *et al.*, 2010). La capacidad de la α -lactalbúmina de interactuar con los lípidos incrementa sus propiedades emulsificantes y es esencial para entender su mecanismo de acción como posible proteína anti-tumoral (Chockry y Pérez, 2011). Cuenta con una elevada proporción de aminoácidos esenciales y es capaz de ligar cationes divalentes como el calcio y el zinc, capacidad que podría facilitar la absorción de minerales esenciales. Estas propiedades la han convertido en un nuevo ingrediente de fórmulas infantiles (Lien, 2003).

4.3.3. Albúmina sérica

La albúmina del suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) es una proteína globular con tres dominios diferenciados que consisten en dos hélices grandes y una hélice más pequeña (Mulvihill *et al.*, 1987). Desempeña un papel importante en el mantenimiento de la presión osmótica, el pH de la sangre y el balance nutricional. Algunas sustancias tales como ácidos grasos, aminoácidos, metales, esteroides y drogas dependen, para su transporte, de su interacción con esta proteína (Huang *et al.*, 2004). La detección de esta proteína ha ganado interés por ser un indicador de la salud de la vaca, así como de la calidad de la leche y la carne procedente de la misma (Jahanban-Esfahlan *et al.*, 2019). A diferencia de la β -lactoglobulina y la α -lactalbúmina, que son de síntesis mamaria, la BSA se transfiere de la sangre a la leche (Vincent *et al.*, 2016).

4.3.4. Inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas abarcan una compleja mezcla de glicoproteínas presentes en la leche madura a una baja concentración, que poseen actividad de anticuerpo. En el calostro se encuentran en mayor cantidad. En la leche bovina se distinguen cuatro tipos

de inmunoglobulinas: IgM, IgA, IgE y IgG. Su estructura está compuesta por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras de polipéptidos (Mulvihill *et al.*, 1987). Su función principal es proteger la mucosa intestinal de microorganismos patógenos y a través del calostro conferir inmunidad pasiva al neonato rumiante hasta que su propio sistema inmune esté desarrollado. El enriquecimiento de fórmulas infantiles con inmunoglobulinas podría ayudar a reducir las infecciones virales y microbianas, y proporcionar al consumidor una protección extra ayudando al propio sistema inmune (Gapper *et al.*, 2007). La proporción de las diferentes clases de inmunoglobulinas es diferente según las especies animales. El origen es principalmente sanguíneo en el caso de las IgG, y de síntesis mamaria para las IgM e IgA (Hurley y Teil, 2011).

4.3.5. Lactoferrina

La lactoferrina es una glicoproteína de aproximadamente 80 kDa que comprende 703 aminoácidos y está presente de forma natural en la leche y también en otras secreciones de mucosas externas (Sánchez *et al.*, 1992). Es capaz de unir iones hierro y pertenece a la familia de las transferrinas. Diversos estudios han demostrado la actividad antimicrobiana, anticancerígena, antioxidante, antiinflamatoria e inmunoreguladora de esta proteína y de sus derivados (Farnaud y Evans, 2003). La mayoría de microorganismos patógenos dependen de la presencia de hierro para su crecimiento. La lactoferrina, con su capacidad para ligar estos iones, provoca la carencia de hierro biodisponible en el medio, de manera que no puede ser utilizado por estos microorganismos, inhibiendo así su crecimiento (Conesa *et al.*, 2009). Por la misma razón, se potencia el crecimiento de aquellos microorganismos que necesitan baja disponibilidad de hierro como las bacterias ácido-lácticas, generalmente consideradas como beneficiosas para el huésped (Ward y Conneely, 2004). Cuando la lactoferrina atraviesa la mucosa intestinal reacciona con macrófagos, monocitos y células dendríticas que, como consecuencia, provocan la producción de citoquinas. Las citoquinas fomentan la proliferación de células inmunes y este aumento de actividad tiene potencial para eliminar células malignas y causar su muerte (Gibbons *et al.*, 2011). Existen diferentes mecanismos de acción propuestos para explicar su actividad anticancerígena que pueden ser agrupados en: efectos extracelulares, efectos intracelulares e inmunoestimulación; sin embargo, la mayoría solo han sido demostrados en estudios *in vitro* (Zhang *et al.*, 2014). A niveles de pH fisiológicos, la lactoferrina puede inhibir la producción de radicales libres y disminuir el daño oxidativo

a los tejidos (Levay y Viljoen, 1995). Su actividad como protector antiinflamatorio radica en su capacidad de ligar iones hierro y a su vez, otros componentes pro-inflamatorios tales como lipopolisacáridos y sus receptores. Adicionalmente, la lactoferrina es capaz de interactuar con receptores de la superficie celular (Legrand *et al.*, 2005). Por todas estas propiedades, la LF ha sido utilizada en los últimos años en la industria como ingrediente en fórmulas infantiles, medicinas, alimentos funcionales y probióticos (Duran y Kahve, 2017).

4.3.6. Lactoperoxidasa

La lactoperoxidasa (EC 1.11.1.7) es la enzima más abundante de la leche. Consiste en una única cadena polipeptídica de 612 aminoácidos y posee un peso molecular de aproximadamente 78 kDa. Se produce de forma natural en fluidos orgánicos y se cree que su función es proteger al organismo frente a microorganismos patógenos. En presencia de peróxido de hidrógeno cataliza la oxidación de tiocianato originando productos con actividad antimicrobiana. Distintos grupos de bacterias Gram-positivas y catalasa positivas como *Pseudomonas*, *Coliformes*, *Salmonellas* y *Shigellas* pueden ser inhibidas e incluso morir como consecuencia de la actividad del sistema lactoperoxidasa. De esta forma la lactoperoxidasa es utilizada en la industria como un bioconservante (Kussendrager y Hooijdonk, 2000).

4.3.7. Proteosa peptona

Otra fracción proteica presente en la leche es la proteosa peptona (PPT), compuesta por una serie de componentes proteicos que se mantienen en solución tras un tratamiento térmico elevado. La PPT se divide en dos clases dependiendo de su origen. Por una parte, se encuentran los fragmentos derivados de la proteólisis de la β -caseína desde el extremo N-terminal que deriva en fragmentos no-hidrofóbicos. Por otra parte, están los fragmentos hidrofóbicos derivados de glicoproteínas (Karamoko, 2013).

Dentro de la fracción hidrofóbica de la PPT hay una proteína conocida como componente 3 de la proteosa peptona (PP3), también llamada lactoforina. Esta proteína parece proceder de la membrana del glóbulo graso de la leche. La PP3 es una fosfoglicoproteína formada por 135 aminoácidos, cuyo peso molecular se estima en 28 kDa y que supone el componente mayoritario de la PPT (Sørensen y Petersen, 1993). Esta proteína migra en la electroforesis acompañada por un fragmento de 17 kDa que se libera de la PP3 naturalmente en la leche por proteólisis (Pedersen *et al.*, 2012). La PP3

exhibe propiedades de inhibición de la enzima lipoprotein-lipasa (LPL) (EC.1.1.34) responsable de la lipólisis espontánea de la leche a temperaturas de refrigeración (Girardet *et al.*, 1993). A su vez, la PP3 puede ser degradada obteniendo fragmentos de menor peso molecular. Por procesos de fermentación y proteólisis con enzimas se obtiene una fracción de 19 kDa de peso molecular que tiene efecto inmunomodulador, ya que se ha observado que incrementa la producción de IgM monoclonal en la línea celular HB4C5 (Sugahara *et al.*, 2005). Este fragmento, conocido como lactoforicina, está formado por 23 residuos de aminoácidos que se corresponden con el extremo carboxílico de la PP3 y abarca los residuos del 113 al 135 (Campagna *et al.*, 2004).

4.3.8. Glicomacropéptido

El glicomacropéptido (GMP) es un péptido termorresistente liberado al suero de la leche por acción del cuajo, que tiene como principio activo la rennina o quimosina (EC 3.4.23.4.), sobre la κ -caseína durante la elaboración de queso. La quimosina hidroliza la κ -caseína en la posición Phe105-Met106 dando dos fracciones, una que comprende los residuos 1-105 que forman la para- κ -caseína y otra los residuos 106-169 que constituyen un macropéptido soluble o caseinmacropéptido. Este macropéptido se caracteriza por la ausencia de aminoácidos aromáticos, por lo que no presenta absorbancia a 280 nm y tiene un máximo de absorbancia a 212 nm (El-Salam *et al.*, 1996). Alrededor del 50% de las moléculas del caseinmacropéptido están glicosiladas, denominándose a esta fracción glicomacropéptido (GMP). El ácido siálico o ácido N-acetilneuramínico es el monosacárido que se ha hallado en mayor cantidad en el GMP.

Diversos estudios han demostrado la actividad biológica del GMP. Este fragmento puede actuar como inmunomodulador (López-Posada, 2010) y también se ha demostrado la eficacia de este péptido frente a diferentes microorganismos y sus toxinas (Kawasaki *et al.*, 1992). Sin embargo, no queda claro si el mecanismo de acción es debido al propio péptido o a los glicanos unidos a su superficie. Algunos de los métodos empleados para la detección y cuantificación del GMP siguen la estrategia de la determinación de los ácidos siálicos presentes en la muestra (Warren, 1959; Fernando, 2010). Este tipo de determinación tiene el inconveniente de que no existe una cantidad estándar de ácidos siálicos común a todas las moléculas de GMP, por lo que la cuantificación de estos puede llevar a una correlación errónea entre la cantidad de ácidos siálicos y el GMP presente. Algunos autores han investigado métodos con ácidos como el ácido tricloracético (TCA) con el fin de precipitar el GMP (Chavez-Vela *et*

al., 2012; Li y Mine, 2004); sin embargo, estos métodos producen algunas pérdidas de los glicanos unidos al GMP. El método que ha demostrado los mejores resultados para el aislamiento de GMP ha sido la cromatografía de intercambio iónico (Nakano y Ozimek, 1999, 2000; Silva-Hernández *et al.*, 2002).

En ocasiones, se producen fraudes en la industria cuando se sustituye parte de la leche por lactosuero. La presencia de GMP en una muestra de leche es indicativa de adulteración con lactosuero, puesto que el GMP se encuentra presente incluso tras haber sufrido un tratamiento térmico. Para detectarlo, se utilizan diferentes métodos como son la electroforesis, métodos cromatográficos, espectroscopía e inmunoensayos (Jauregui-Rincón *et al.*, 2019)

4.4. Rotavirus

El rotavirus fue descubierto en 1973 a través de biopsias intestinales realizadas a niños con gastroenteritis aguda. Los rotavirus toman su nombre de la palabra en latín *rota*, que significa rueda. Los rotavirus poseen un ARN bicatenario cuyos segmentos codifican para distintas proteínas. Su estructura consta de tres partes: un núcleo interno, una cápside intermedia y una cápside externa con espículas radiales cortas (Esona *et al.*, 2015). La cápside externa está compuesta por la proteína viral VP7 y la proteína VP4 que debe ser escindida por proteasas para que el virus sea infeccioso, las cuales inducen al sistema inmunológico a producir anticuerpos. Estas proteínas permiten identificar cepas, que se ha demostrado que varían con el tiempo según la ubicación geográfica (Kawai *et al.*, 2012). En el huésped la replicación del rotavirus ocurre exclusivamente en el intestino, principalmente en el intestino delgado. La infección por rotavirus puede presentarse de forma sintomática o asintomática, su patogénesis depende del huésped y de factores de virulencia. La edad del huésped es un importante condicionante en la sintomatología resultante de la infección. El reservorio de los rotavirus son humanos y animales mamíferos. Aunque la transmisión de rotavirus de animales a personas se ha podido estudiar, la mayoría de cepas no resultan en enfermedad clínica (Esona *et al.*, 2015). Generalmente, su transmisión se da por la vía fecal-oral a través de alimentos y agua contaminados o fómites. Los rotavirus son altamente contagiosos y muy resistentes a agentes ambientales. Para causar la infección se requiere un número muy bajo de partículas infecciosas (10 partículas infecciosas) y casi 100 millones de estas partículas de rotavirus son capaces de desprenderse por gramo de materia fecal. Su periodo de incubación se sitúa entre los 2 y 3 días (Sadiq *et al.*, 2018).

Los estudios epidemiológicos han revelado que el rotavirus es uno de los principales agentes causales de la gastroenteritis aguda durante la infancia en todo el mundo y el proceso infeccioso que provoca se asocia con una alta mortalidad, especialmente en los países en desarrollo, en los que no se pueden aplicar los tratamientos adecuados (Vesikari, 2012). Según el último informe de la OMS (Organización Mundial de la Salud) en 2013 el rotavirus causó aproximadamente 215,000 muertes en todo el mundo y representa entre el 35 y 60% de la diarrea aguda grave en niños menores de 5 años en países en los que no se administra la vacuna, afectando especialmente a niños lactantes.

En este sentido es importante la administración de una vacuna frente a rotavirus a los niños en sus primeros años de vida. La finalidad de administrar esta vacuna no es la prevención de la infección del rotavirus, si no la de evitar la diarrea severa que causa el virus. La partícula infecciosa de rotavirus es un virión de triple capa y de aproximadamente 85 nm de diámetro. El primer paso en el ciclo infectivo del rotavirus es su adhesión a la célula huésped. Este proceso es complejo y está mediado por la proteína VP4 y los receptores específicos de la célula (ácidos siálicos). Una vez establecida esta unión se produce un cambio conformacional en la proteína y el rotavirus entra en el citoplasma celular a través de endocitosis o por otros mecanismos. Dentro de la célula es capaz de transcribir y replicar su material genético. La respuesta innata del sistema inmune se produce en forma de cascada de citoquinas mediada por macrófagos, sin embargo, los rotavirus siguen diferentes estrategias para defenderse de estas proteínas antivirales (Sadiq *et al.*, 2018).

En la actualidad, se han desarrollado con éxito dos vacunas orales, RotaTeq (RV5, Merck) y Rotarix (RV1, GlaxoSmithKline) para reducir la carga de morbilidad, pero existen otras estrategias. La leche materna humana contiene varios componentes como son los oligosacáridos y las glicoproteínas, que tienen excelentes beneficios nutricionales e inmunológicos. Estos componentes son capaces de brindar protección contra microorganismos invasores inhibiendo su unión a receptores específicos (Sadiq *et al.*, 2018). Por ello, es importante identificar y caracterizar componentes de la leche bovina con una actividad antiviral similar a la que poseen los de la leche humana, para añadirlos a las fórmulas infantiles y a productos especiales dirigidos a aliviar los síntomas de la diarrea causada por rotavirus.

5. Hipótesis y objetivos

Los estudios previos realizados en el grupo de investigación indican que el lactosuero bovino tiene una elevada actividad inhibitoria de los rotavirus bovinos; sin embargo, no se ha identificado a qué componente proteico se debe dicha actividad. Por tanto, el objetivo principal de este Trabajo de Fin de Máster ha sido el aislamiento y caracterización de fracciones proteicas derivadas del lactosuero bovino y la evaluación de su actividad frente a los rotavirus bovinos.

Para alcanzar el objetivo general, se han desarrollado los siguientes objetivos parciales:

1. Obtención y fraccionamiento del lactosuero de vaca.
2. Aislamiento y caracterización del glicomacropéptido del lactosuero bovino.
 - 2.1. Obtención de hidrolizados del glicomacropéptido del lactosuero bovino.
3. Aislamiento y caracterización del componente 3 de la proteosa peptona del lactosuero bovino.
4. Evaluación de la actividad antirrotavirus del GMP y sus hidrolizados y de la PP3, en la línea celular MA104.

6. Metodología

6.1. Obtención de lactosuero

La empresa Villacorona S.A. fue el proveedor de la leche de vaca cruda a partir de la cual obtuvimos el lactosuero en la Planta Piloto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Zaragoza. Tras la recepción de la leche se llevaron a cabo dos pruebas rápidas: la prueba de la lactoperoxidasa que dio una coloración azul y la prueba de la fosfatasa alcalina, que mostró una coloración amarilla. Ambos resultados positivos indicativos de que la leche tenía una buena actividad enzimática y no había sido sometida a ningún tratamiento térmico. Partimos de 25 l de leche que se desnataron con una desnatadora-centrífuga modelo ARR-DES 125 de Suministros Químicos Arroyo (Santander, España), previo calentamiento a 50°C. El pH de la leche desnatada fue de 6,09. El porcentaje de grasa tanto de la leche como de la nata se determinó por el método de Gerber. La leche desnatada obtenida fue calentada a la temperatura de actuación del cuajo en una cuba y posteriormente, se le adicionó cloruro de calcio de Laboratorios Arroyo (Santander, España) en una proporción 1:7.000-8.000 a y cuajo líquido en una proporción 1:15000, de la empresa Abiasa (Pontevedra, España). La

leche se dejó coagular durante 30 min y una vez formada la cuajada se cortó con liras hasta obtener granos del tamaño de un dado. El suero formado se recogió y filtró utilizando filtros de tela de algodón. Posteriormente, el suero se filtró de nuevo con lana de vidrio para eliminar restos de caseína y se almacenó a -20°C hasta su uso.

6.1.1. Tratamiento térmico del lactosuero

El pH del lactosuero se ajustó a 4,5 y se le aplicó un tratamiento térmico en un matraz aforado a una temperatura de 90°C en un baño termostático durante 1 h. La muestra se enfrió bajo agua corriente y se centrifugó a 5000 g durante 15 min a 4°C. El sobrenadante obtenido se filtró con papel de filtro, se depositó en bandejas y se congeló a -80°C durante 30-35 min para liofilizarlo posteriormente.

6.2. Aislamiento de fracciones proteicas

6.2.1. Glicomacropéptido (GMP).

El aislamiento de GMP a partir de la fracción termoestable del lactosuero, previamente obtenida, se realizó mediante una cromatografía de intercambio iónico, como se muestra en la **figura 1**. Para ello, se utilizaron 100 ml de gel DEAE-Sephadex A-50 que se lavaron con tres veces su volumen de agua miliQ. Una vez lavado el gel, se adicionó una muestra de 1 mg/ml de lactosuero liofilizado, cuyo pH fue previamente ajustado a 3 con HCl 1 M. El gel con la muestra se mantuvo con agitación suave durante 2 h a 4°C. A continuación, se introdujo el gel en un embudo sinterizado y se realizaron lavados con agua miliQ hasta que la absorbancia a 212 nm fue menor de 0,02. El gel con el GMP retenido por su carácter ácido, se transfirió a una columna (3 cm Ø x 46,2 cm) por la que se hizo pasar una solución de NaCl 0,5 M con un flujo de 0,5 ml/min. El eluido de la columna se recogió en un colector en fracciones de 2 ml, cuya absorbancia se determinó a 212 nm. Las fracciones de la elución con mayor absorbancia se dializaron para eliminar la sal, utilizando dispositivos de ultrafiltración de 50 ml de Millipore Corporation (Bedford, EE.UU.) con una membrana de 3 kDa de tamaño de poro. Las fracciones se dializaron frente al menos tres volúmenes de agua miliQ.

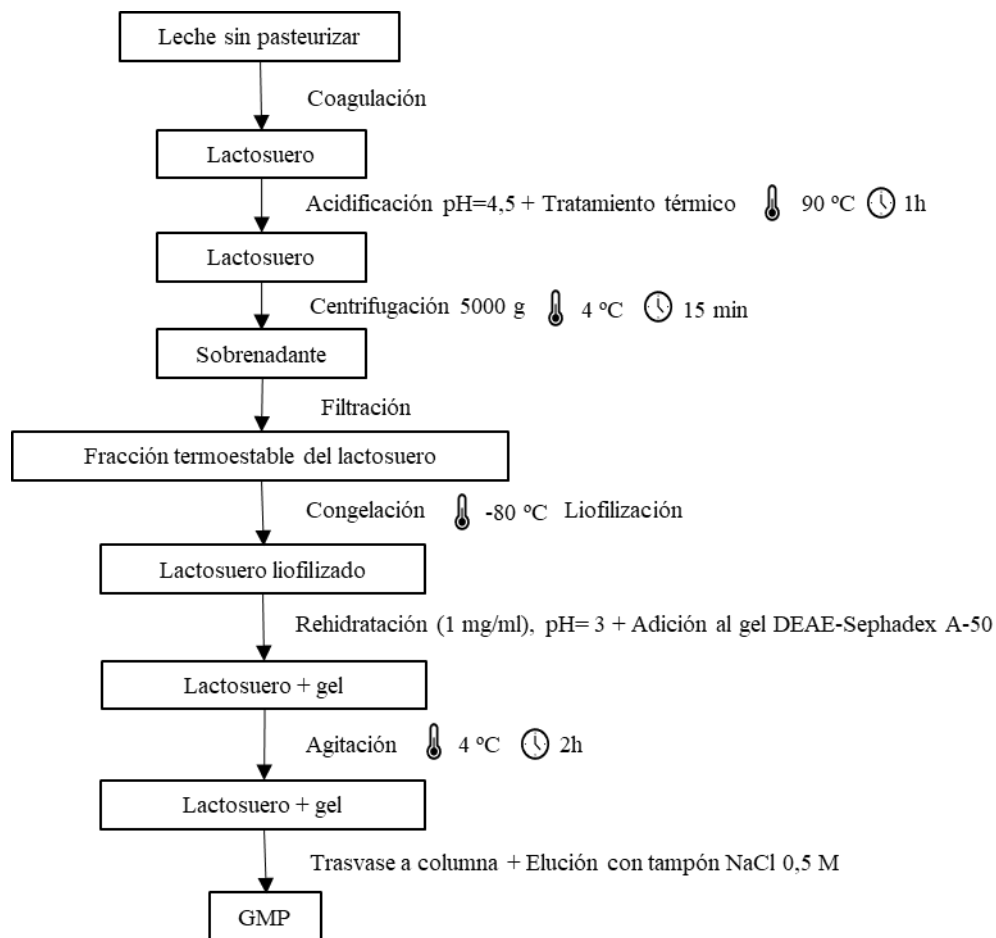


Figura 1. Esquema del proceso de obtención del GMP a partir de leche bovina.

6.2.2. Fracción proteosa peptona.

Se llevó a cabo el aislamiento de la fracción proteosa peptona (PPT) siguiendo el método descrito por Parrón *et al.* (2019) a partir de leche entera cruda de vaca. En primer lugar, se llevó a cabo el desnatado como se ha descrito anteriormente, y la leche obtenida se sometió a un tratamiento térmico a 90°C durante 30 min. Posteriormente, se acidificó la muestra con HCl 2 M hasta llegar a un pH de 4,6. La leche acidificada fue distribuida en tubos y centrifugada a 1500 g durante 30 min a 4°C. Al sobrenadante obtenido se le adicionó ácido tricloroacético (TCA, por sus siglas en inglés) hasta obtener un porcentaje final en la muestra del 13,6% (p/v). Después, se volvió a centrifugar a 1500 g durante 30 min. El precipitado se resuspendió en una solución de TCA al 12% y se centrifugó a 3300 g durante 15 min. Para lavar el precipitado se utilizó acetona y se centrifugó a 3300 g durante 15 min, repitiendo el proceso de lavado tres veces. El precipitado se mantuvo en una cámara de desecación durante 24 h para obtener una fracción en forma de polvo libre de acetona.

6.2.3. Componente 3 de la proteosa peptona

El componente 3 de la proteosa peptona (PP3) bovina se obtuvo por medio de cromatografías consecutivas, como se muestra en la **figura 2**. En primer lugar, se sometió la muestra de PPT a una cromatografía en columna (1,5 cm Ø x 94 cm), utilizando gel Sephadex G-75 y tampón de bicarbonato amónico 0,1 M, pH 8. El eluido se midió a una longitud de onda de 230 nm y se guardaron las fracciones con una absorbancia mayor de 0,1.

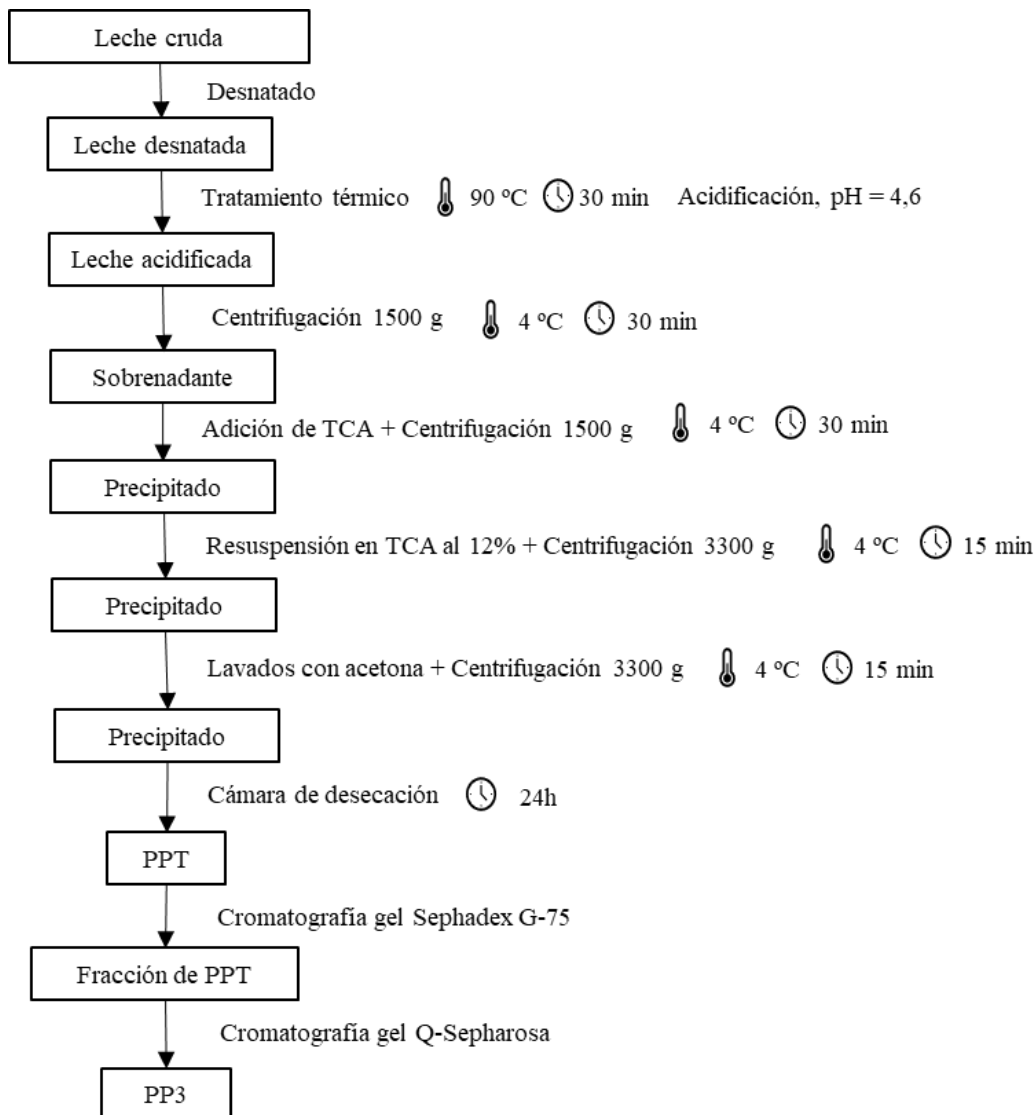


Figura 2. Esquema del proceso de obtención de la PP3 a partir de leche bovina.

6.2.4. Fraccionamiento del lactosuero

Partiendo de lactosuero bovino sin tratar se llevó a cabo un fraccionamiento mediante ultrafiltración comenzando con un dispositivo de ultrafiltración de tamaño de poro de 10 kDa. Se tomaron 15 ml de muestra y se centrifugaron a 4000 g durante 15 min. La fracción que quedó retenida en la parte superior del filtro se denominó F1. El filtrado se centrifugó utilizando un dispositivo de ultrafiltración de tamaño de poro 3 kDa. La fracción que quedó retenida en la parte superior del filtro se denominó F2 y aquella que fue filtrada F3. Las tres fracciones obtenidas se liofilizaron para su posterior análisis.

6.3. Ensayo del ácido bicinconínico

El ácido bicinconínico (BCA) en su forma de sal de sodio soluble en agua es capaz de reaccionar con iones Cu^{1+} a través de la reacción de Biuret dando iones Cu^{2+} . El ensayo del ácido bicinconínico se utiliza para la cuantificación de proteínas a través de una reacción colorimétrica producida cuando las proteínas se encuentran en un medio alcalino con iones Cu^{2+} , formando un complejo morado cuyo color se intensifica a mayor concentración proteica. Se realiza en una placa de 96 pocillos utilizando BSA como patrón (Smith *et al.*, 1985). Se utilizó el kit Pierce™ BCA Protein Assay de ThermoFisher (Rockford, EE.UU.) para realizar la cuantificación de proteína en las distintas muestras obtenidas. La curva patrón se preparó con concentraciones de 0; 0,06; 0,125; 0,25; 0,5; 1 y 2 mg/ml de BSA por duplicado. En los pocillos se colocaron 25 μl de las muestras y de los estándares, y 200 μl de reactivo. El reactivo que creará el medio alcalino se prepara a partir de otros dos reactivos: reactivo A y reactivo B, en una proporción de 50:1 (v/v), tal como indica el fabricante. Una vez colocadas las muestras y los estándares se agitó la placa y se incubó a 37°C durante 30 min. La lectura de la placa se realizó a 562 nm Thermo / LabSystems Multiskan MS Original 352 de LabSystems Diagnostics Oy (Tiihtie, Finlandia).

6.4. Electroforesis en gel de poli(acrilamida) con SDS (SDS-PAGE)

Con la finalidad comprobar que estábamos obteniendo nuestras proteínas de interés, analizamos las fracciones obtenidas en los diferentes procesos de aislamiento mediante SDS-PAGE. Para preparar la muestra se comenzó por la preparación del “sample buffer” a partir de 980 μl del tampón de la muestra y 20 μl de β -mercaptoetanol. El tampón de la muestra estaba compuesto por 125 mM de Tris-HCl, 4% SDS, 20% glicerol, 0,02% azul de bromofenol, pH 6,8. Se mezclaron 20 μl de muestra con 20 μl

de “sample buffer” en viales Eppendorf de 0,5 ml, que se perforaron en la parte superior para evitar la condensación de agua en el interior y se introdujeron en un baño a 100°C durante 5 min. Para el desarrollo de la electroforesis se utilizó el “running buffer”, que se preparó tomando 100 ml del running buffer concentrado (10 x) y 900 ml de agua destilada para obtener un tampón compuesto por 25 mM Tris, 192 mM Glicina, 0,1% SDS, pH 8,3. El gel utilizado para la electroforesis fue un gel comercial Mini-PROTEAN Tris-Tricina de 4-20% de poliacrilamida con 15 pocillos, de la marca Bio-Rad Laboratories (Hercules, EE.UU.). Se colocó el gel en el equipo Mini-PROTEAN Tetra System (Bio-Rad) y se comenzó a llenar con “running buffer” desde el interior hasta cubrir todo el gel. Se quitó el peine del gel para dejar libres los pocillos y se colocaron 15 µl de muestra en cada pocillo y 5 µl de los patrones de alto y bajo peso molecular Page Ruler Prestained Protein Ladder de GE Healthcare (Buckinghamshire, Reino Unido). Se tapó el equipo y se puso a 180 V durante 30 min, aproximadamente, hasta que el frente electroforético llegó a la línea inferior del gel. Una vez terminada la electroforesis se sacó el gel del equipo y se procedió a su tinción.

6.5. Tinción PAS (Periodic-Acid-Schiff)

Para poder visualizar las bandas del gel se llevaron a cabo dos tinciones empezando por una tinción PAS, que permite visualizar en color rojo-rosado las proteínas glicosiladas. La realización de esta tinción comenzó con la preparación de la solución de ácido acético al 5%. Para ello, se tomaron 10 ml de ácido acético al 95% y se diluyeron en 190 ml de agua destilada. De esta solución se tomaron 50 ml, a los que se les adicionaron 0,35 g de ácido periódico. Se colocó el gel en una bandeja de plástico inmerso en la solución de ácido periódico incubándolo durante 1 h en agitación. Una vez transcurrido ese tiempo se retiró la solución, se lavó dos veces el gel con agua miliQ y se adicionaron 50 ml de una solución de metabisulfito de sodio. Para preparar esta solución se utilizaron 100 ml de la solución de ácido acético al 5% y 0,2 g de metabisulfito de sodio. Esta solución se dejó en el gel durante unos minutos hasta que todo el gel se tiñó de amarillo. Después, se retiró la solución y se adicionaron los 50 ml restantes hasta la decoloración del gel. A continuación, se retiró esta última solución y se añadieron 50 ml del reactivo de Schiff dejando el gel sumergido durante 2 h en agitación. Tras retirar el reactivo de Schiff se adicionaron 50 ml de tampón de fijación durante 7 min, se retiraron y se añadieron otros 50 ml del mismo tampón. Una vez retirado el tampón de fijación se añadieron 50 ml de la solución decolorante de ácido

acético al 10%, proceso que se realizó dos veces. Terminado este proceso se escaneó el gel para su análisis posterior.

6.6. Tinción con azul de Coomassie

Se adicionó el colorante azul de Coomassie, previamente filtrado, al gel de manera que quedó inmerso en este durante 1 h. El azul de Coomassie se sustituyó por la solución decolorante compuesta por 250 ml de metanol, 80 ml de ácido acético, 20 ml de glicerina y 650 ml de agua destilada y el gel se incubó durante 30 min, tras los cuales se eliminó el decolorante y se volvió a adicionar hasta que el gel quedó decolorado. Por último, se eliminó el decolorante y se escaneó el gel para su posterior análisis.

6.7. Detección de GMP con el kit comercial Stick cGMP

Con la finalidad de verificar que entre las proteínas que estábamos obteniendo en nuestros aislamientos del GMP correspondían con este péptido, se realizó un inmunoensayo con el kit comercial Stick cGMP de Operon (Zaragoza, España) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se tomó 1 mg de la muestra en polvo y se realizaron diluciones seriadas hasta obtener una dilución 1:4000. De esa dilución se tomaron 200 μ l y se depositaron en un pocillo de fondo plano. La tira inmunocromatográfica se sumergió en el pocillo con la dilución durante 10 s y transcurridos 5 min se hizo la lectura. Trascurrido ese tiempo debe aparecer una línea azul indicativa de que la prueba funciona correctamente. La aparición de una línea transversal roja en la tira reactiva es indicativa de que la muestra es positiva para GMP.

6.8. Cuantificación de ácidos siálicos con un kit comercial

Se utilizó un kit comercial de Abcam (Cambridge, Reino Unido) para la determinación de ácido siálico libre o ácido N-acetilneuramídico (NANA) en muestras biológicas. Este ensayo utiliza una reacción acoplada a una enzima en la que la oxidación del ácido siálico libre crea un compuesto intermedio que reacciona estequiométricamente con la sonda para generar un producto que puede detectarse por absorbancia ($\lambda = 570$ nm) o fluorescencia (Ex/Em = 535/587 nm). En el caso de las muestras de GMP se utilizó la detección colorimétrica. El kit mide el ácido siálico en el rango lineal de 0,1 a 10 nmol con una sensibilidad de detección de ~ 1 μ M de concentración. El ensayo se realiza en una placa de 96 pocillos. En cada pocillo se introdujeron las muestras a evaluar y el master mix de reacción. La placa se incubó a temperatura ambiente protegida de la luz durante 30 min y se realizó la lectura a 570 nm.

6.9. Hidrólisis de GMP comercial

El producto lácteo comercial enriquecido en GMP utilizado fue Lacprodan CGMP-10 donado por Arla Foods S.A. (Madrid, España).

6.9.3. Hidrólisis con pepsina

Se preparó una solución de 20 mg/ml de Lacprodan CGMP-10 en agua miliQ y se ajustó el pH a 3 con HCl 0,1 M. Se añadieron 3 mg de pepsina previamente diluida en 100 µl de agua miliQ. La muestra junto con la enzima se incubó en un recipiente de vidrio tapado a 37°C en agitación durante 4 h. Para detener la reacción enzimática la muestra se calentó a 80°C durante 15 min y posteriormente, se ajustó el pH a 7 con NaOH 0,1 M. La muestra hidrolizada se centrifugó a 13.000 g durante 15 min y el sobrenadante se llevó a liofilización.

6.9.4. Hidrólisis con tripsina

Se preparó una solución de 20 mg/ml de Lacprodan CGMP-10 en tampón NH_4HCO_3 0,1 M, pH 8. Se añadió 1 mg de tripsina y se incubó a 37°C durante 3 h en agitación. Después, se calentó la muestra a 90°C durante 10 min para inactivar la tripsina y se centrifugó a 16.000 g durante 5 min. El sobrenadante recogido se llevó a liofilización.

6.9.5. Hidrólisis con pepsina, tripsina y quimotripsina

La muestra de Lacprodan CGMP-10 se diluyó en ácido fórmico al 5% (v/v) hasta una concentración de 20 mg/ml. Se añadió pepsina en una proporción de 0,4:100. Tras la adición de la enzima se incubó la muestra a 37°C durante 2 h en agitación. Para inactivar la tripsina se neutralizó la muestra con NH_4HCO_3 2 M. Posteriormente, se añadió 1 mg de tripsina y 1 mg de quimotripsina y se incubó a 37°C durante 3,5 h. Las enzimas se inactivaron aplicando un tratamiento térmico de 90°C durante 10 min. Después, la muestra hidrolizada se centrifugó a 16.000 g durante 5 min y el sobrenadante se liofilizó.

6.10. Ensayos con cultivos celulares

6.10.3. Siembra y mantenimiento del cultivo celular

La línea celular utilizada fue la línea MA104 de células epiteliales de riñón fetal de mono Rhesus. Todos los procedimientos de cultivo se realizaron en un ambiente estéril en campana de flujo laminar vertical Bio II Advance de Telstar (Terrasa, España). Las células se cultivaron en frascos de 25 cm² y se mantuvieron en medio MEM

suplementado con suero fetal bovino (FCS) al 10% (v/v), solución de antibióticos (penicilina 100 U/ml, 10 µg/ml estreptomicina) al 1% (v/v), L-glutamina 2 mM y 0,25 µg/ml de anfotericina B, a este medio se le llamó “MEM completo”. En algunas etapas de los ensayos se utilizó el MEM con la misma composición que el MEM completo, pero sin FCS al que llamamos “MEM básico”. Los frascos de cultivo se mantuvieron a 37°C en incubación con 95% de aire y 5% CO₂.

El subcultivo de las células se realizó cuando estas alcanzaron la confluencia. En primer lugar, se eliminó el medio de los frascos de cultivo mediante aspiración con pipeta estéril. La monocapa celular fue lavada con 5 ml de PBS estéril. Una vez retirado el PBS, se añadieron a la monocapa 0,5 mL de una solución de tripsina-EDTA al 0,25% (p/v), con la que se incubó a 37°C durante 5 min para que las células se desprendieran de la superficie del frasco. Para frenar la acción de la tripsina se adicionaron 2 ml de MEM completo y de esta solución se tomó una alícuota para poder ser observada al microscopio óptico y realizar el recuento celular en una cámara de Thoma. Se contaron las células visibles a través del microscopio en la cuadrícula y se realizaron los cálculos necesarios para obtener un subcultivo con una densidad de 5×10^3 células/cm². La cantidad obtenida según la fórmula fue depositada en un nuevo frasco de cultivo que contenía 5 ml de MEM completo y se incubó en las condiciones previamente mencionadas.

Previamente al inicio de cualquier ensayo, el MEM completo fue sustituido por MEM básico en la placa de MA104 que había alcanzado la confluencia y se incubó durante 2 h a 37°C para eliminar el FCS que pudiera interferir en los ensayos.

6.10.4. Ensayo de citotoxicidad

La finalidad de este ensayo fue evaluar la influencia que pudiera tener la propia muestra sobre el cultivo celular a las concentraciones que se pretendían estudiar en el ensayo de neutralización. El ensayo de citotoxicidad está basado en una reacción colorimétrica derivada de la formación de formazán a partir de sales de tetrazolio, mediante los sistemas citocromos de las células viables, el color desarrollado se relaciona directamente con la viabilidad del cultivo (Barltrop *et al.*, 1991).

Se preparó una placa de 96 pocillos de fondo cónico donde se mezclaron el GMP o PP3 y el rotavirus. Cada pocillo de la placa con las células fue lavado con PBS y se adicionó la muestra de proteína con rotavirus, preparado en la placa de fondo cónico, y sin

rotavirus sobre las células. Se incubó durante 1 h a 37°C en agitación lenta, tras lo cual se adicionó una solución de MEM básico con 20 µl de MTS a cada pocillo. La placa se incubó a 37°C durante 2 h y se realizó la lectura de la placa a 490 nm en el lector de placas.

6.10.5. Ensayo de neutralización

Este ensayo se realizó en una placa de 96 pocillos. El virus utilizado fue la cepa WC3 de rotavirus bovino VR-2102 suministrada por la American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, EE.UU.). En una placa de 96 pocillos de fondo cónico se introdujo la solución de proteína a las concentraciones a evaluar y el mismo volumen de la suspensión de la cepa WC3 de rotavirus bovino activado (25 µl de cada uno). La suspensión del virus, previamente obtenida por propagación en nuestro laboratorio y mantenida a -80°C, se diluyó 1:5 en MEM. Para la activación del virus se realizó la dilución al 1:5 en un vial Eppendorf y se adicionó tripsina en PBS, previamente filtrada por 0,22 µm, a una concentración final de 20 µg/ml. El vial se introdujo en un baño a 37°C durante 1 h y se fue agitando cada 10 min para dejar actuar la tripsina y activar el rotavirus. Durante ese tiempo la tripsina rompe la proteína VP4 de la cápside del rotavirus para que el virus pueda penetrar en la célula e infectarla. La placa se incubó durante 1 h a 37°C en agitación lenta.

El siguiente paso fue transferir los 50 µl de la mezcla de muestra de proteína con el rotavirus, preparada en la placa de 96 pocillos de fondo cónico, a una placa con las células de MA104 con un 95% de confluencia, que fue incubada durante 1 h a 37°C en agitación suave. Posteriormente, se adicionó MEM básico suplementado con 4% de FCS y 2 µg/ml de tripsina para facilitar la infección, y se incubó a 37°C durante 16 h en agitación suave.

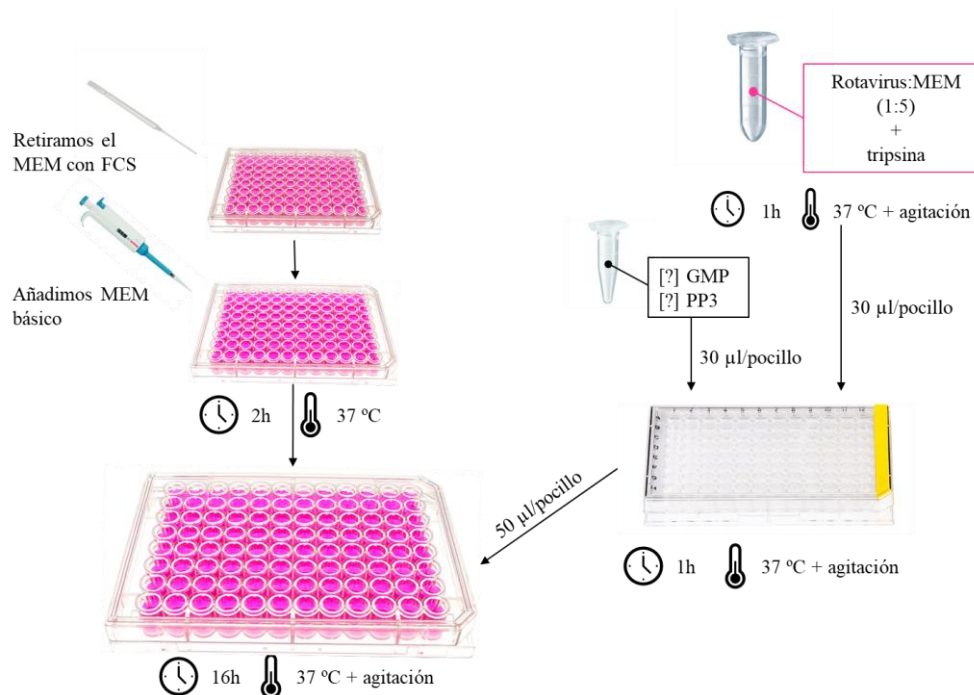


Figura 3. Esquema del ensayo de neutralización de la infección de la línea celular MA104 por rotavirus bovinos.

6.10.6. Ensayo de bloqueo celular

La primera etapa de este ensayo fue añadir la muestra de proteína o péptido a evaluar su actividad, a las células de MA104 durante 1 h a 37°C. Después se añadió la suspensión de la cepa WC3 de rotavirus bovino activado, incubando 1 h a 37°C. Por último, se adicionó MEM básico suplementado con 4% de FCS y 2 µg/ml de tripsina y se incubó durante 16 h.

6.10.7. Ensayo de post-unión

En el ensayo de post-unión se comenzó con la adición del rotavirus bovino, activado y resuspendido en MEM básico, a las células MA104. Se incubó durante 1 h a 4°C. Transcurrida esa hora se retiró todo el contenido de los pocillos y se adicionaron las muestras de proteína a distintas concentraciones. La placa se incubó 1 h a 37°C en agitación. De nuevo, se retiró todo y se realizaron los lavados con PBS. Por último, se adicionó el inóculo de virus y se incubó la placa a 37°C en agitación durante 16 h.

6.10.8. Inmunoensayo de fluorescencia

La actividad neutralizante de las muestras frente a la cepa de rotavirus bovino WC3 se evaluó mediante el ensayo de inmunofluorescencia, según Arnold et al. (2009). Este ensayo se realizó una vez transcurridas las 16 h de infección de las células MA104. En primer lugar, se retiró el inóculo y las células se lavaron con 200 µL/pocillo de PBS. A

continuación, se procedió a la fijación celular añadiendo 300 μ L/pocillo de una solución de acetona:metanol:formalina (1:1:1) e incubando durante 1 min a 4°C.

Tras eliminar la solución de fijación y lavar la placa dos veces con PBS, las células infectadas se detectaron mediante inmunofluorescencia indirecta. Para poder evaluar la actividad de las muestras de proteína frente al rotavirus se utilizó una técnica inmunoquímica. Primero, se utilizó un anticuerpo anti-rotavirus bovino obtenido en oveja diluido 1:300 en PBS y con gelatina de piel porcina de Sigma-Aldrich (San Luis, EE.UU.) al 2%. Se añadieron 100 μ l de la solución del anticuerpo primario a cada pocillo y se incubó durante 2 h a 37°C en agitación suave. Después, se lavaron los pocillos con PBS y se añadió el anticuerpo secundario. Este anticuerpo anti-inmunoglobulina G de oveja obtenido en burro está marcado con una molécula fluorescente, el isotiocianato de fluoresceína. Se adicionó diluido 1:200 en PBS con gelatina al 2%. Se adicionaron 100 μ l y se incubó en las mismas condiciones que el primer anticuerpo. Tras lavar con PBS tres veces se realizó el recuento de células fluorescentes en el microscopio de fluorescencia Eclipse E400 con filtro para FITC de Nikon, y el software de tratamiento de imagen Zen lite 2012.

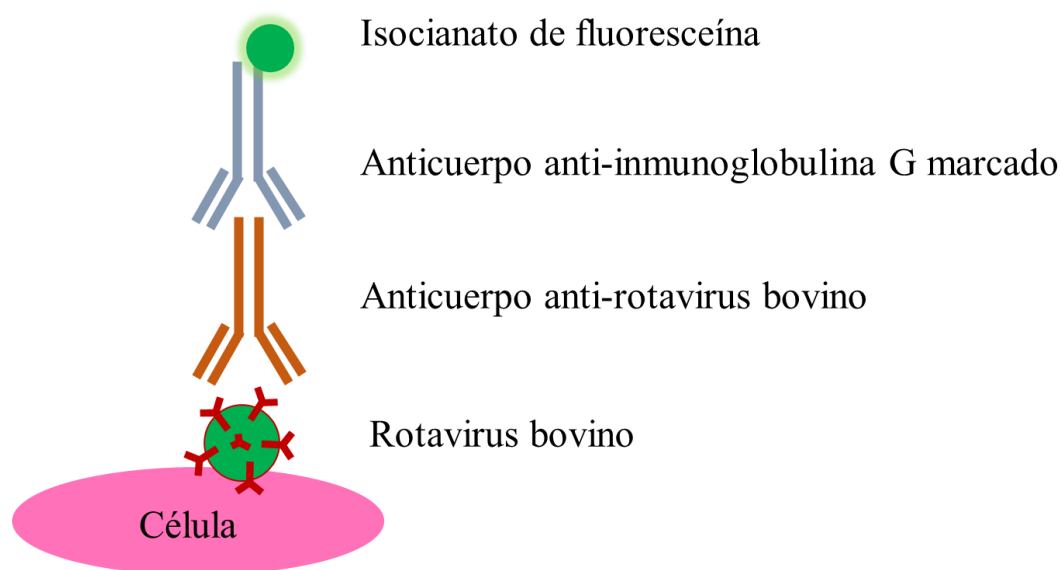


Figura 4. Esquema del ensayo de inmunofluorescencia.

6.11. Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron para determinar la significación estadística con el software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, La Jolla, EE.UU.), mediante el uso de

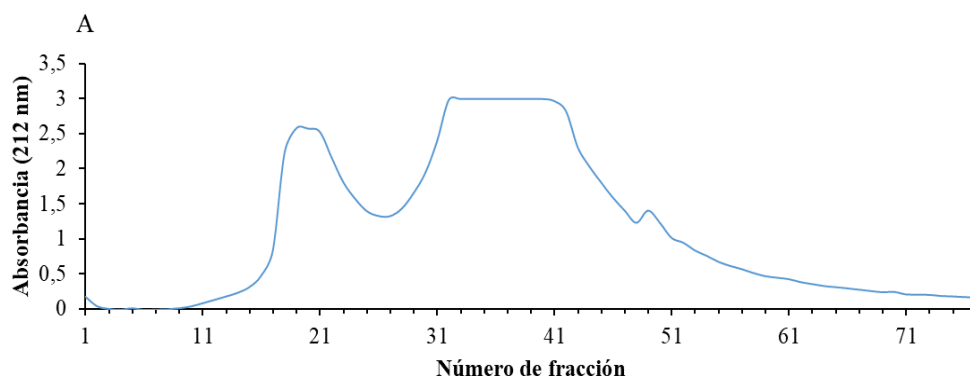
una prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, ANOVA de una vía y la prueba t de Student con la prueba de comparación múltiple de Tukey. Se consideraron estadísticamente significativas aquellas diferencias con un valor $p \leq 0,05$.

7. Resultados y discusión

7.1. Aislamiento de GMP

El aislamiento de GMP se llevó a cabo mediante una cromatografía de intercambio iónico, como se ha mencionado en la sección de materiales y métodos, utilizando DEAE-Sephadex A-50. Para la elución del GMP se utilizó un tampón salino al 0,5 M. En la **figura 5A** se puede ver representado el perfil de elución obtenido tras la lectura de las fracciones a una longitud de onda de 212 nm. Las fracciones que correspondían a los distintos picos se juntaron, dializaron y concentraron por ultrafiltración para su posterior caracterización. Se pueden observar dos picos diferenciados. Las fracciones 19-21 se corresponden con el primer pico y las fracciones 35-37 con el segundo pico, que forma una meseta. En el proceso de concentración de las diferentes fracciones se fueron recogiendo los filtrados, cuya absorbancia se determinó a 212 nm, para confirmar que no se perdía proteína durante este paso.

La **figura 5B** representa el perfil de elución de una cromatografía en gel DEAE-Sephadex A-50 realizada en las mismas condiciones que la anterior. La fracción 6-11 se corresponde con el primer pico de elución y cuya absorbancia una vez concentrada y dializada medida a 212 nm fue de 0,985. Las fracciones 32-55 forman una meseta al alcanzar los valores máximos de absorbancia a 212 nm y una vez agrupadas, concentradas y dializadas arrojaron un valor de absorbancia de 2,419.



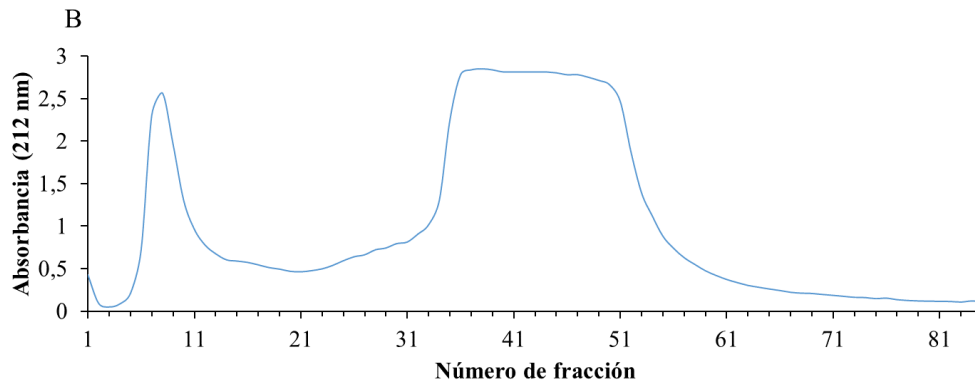


Figura 5. Perfil de cromatografía en gel DEAE-Sephadex A-50 de la fracción de GMP obtenida tras la elución con solución salina a partir de lactosuero bovino.

Los resultados de la electroforesis de las fracciones cromatográficas del aislamiento de GMP se muestran en la **figura 6**. Se puede observar en las carreras número 1 y 2 la aparición de tres bandas con un peso molecular de 23, 18 y 13 kDa. La carrera número 3 solo mostró unas tenues bandas, mientras en la número 4 se observan bandas con un peso molecular de 23 y 18 kDa. En la carrera 5 se puede ver una única banda que se corresponde con un peso molecular de 18 kDa. Según Galindo-Amaya *et al.* (2006) no es habitual observar la forma monomérica del GMP, que posee un peso molecular de 6,7 kDa, ya que en la mayoría de los casos se encuentra en forma de dímeros y trímeros. La estructura del GMP que se encuentra tras su aislamiento difiere según el método de obtención. Tal como describen en sus resultados Nakano y Ozimek (2000) estas bandas se corresponderían con un agregado de tres monómeros de GMP.

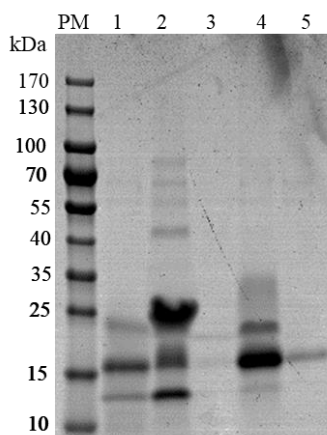


Figura 6. Electroforesis en gel de poliacrilamida de 4-20% con SDS de las fracciones de las cromatografías en DEAE-Sephadex A-50 (**figura 5A** y **5B**) teñida con azul de Coomassie: (PM) Patrón de pesos moleculares, (1) fracciones 52-53 de la cromatografía 5A, (2) fracciones 35-37 de la cromatografía 5A, (3) fracciones 19-21 de la cromatografía 5A, (4) fracciones 32-55 de la cromatografía 5B, (5) fracciones 6-11 de la cromatografía 5B.

En la carrera número 1 de la **figura 7** se observa el perfil del GMP purificado a partir del Lacprodan CGMP-10 por cromatografía de intercambio iónico. Cuando nos encontramos con el aspecto de la banda correspondiente a 30 kDa que se observa en la carrera 1, puede ser indicativo de que estamos en presencia de glicoproteínas. El mismo perfil puede verse en la carrera 5 que se corresponde con el pico que forma una meseta en la cromatografía 5A.

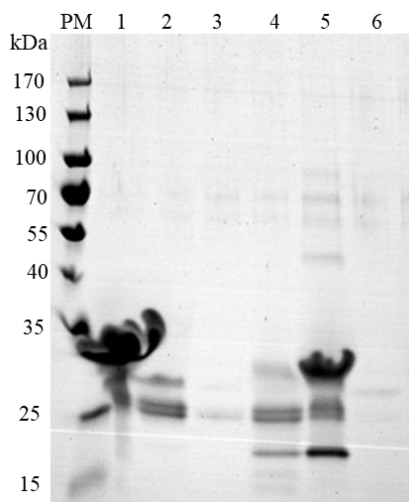


Figura 7. Electroforesis en gel de poliacrilamida 4-20% con SDS teñida con azul de Coomassie: (PM) Patrón de pesos moleculares, (1) fracción de GMP aislado a partir de Lacprodan CGMP-10, (2) fracciones 32-55 de la cromatografía 5B, (3) fracciones 6-11 de la cromatografía 5B, (4) fracciones 52-53 de la cromatografía 5A, (5) fracciones 35-37 de la cromatografía 5A, (6) fracciones 19-21 de la cromatografía A.

Las muestras obtenidas de GMP mediante cromatografía de intercambio iónico que mostraron un perfil electroforético semejante se juntaron y liofilizaron. Este liofilizado se sometió a un ensayo de cuantificación de proteína mediante BCA y con estos datos se prepararon dos soluciones de concentración recomendada por el fabricante para poder llevar a cabo el ensayo inmunocromatográfico. Las líneas rojas que se observan en ambas tiras (**figura 8**) son indicativas de la presencia de GMP en las muestras. Estas muestras fueron las que se utilizaron posteriormente en los ensayos celulares.



Figura 8. Tiras inmunocromatográficas del kit comercial Stick cGMP (Operon) para la detección de GMP.

También se utilizó un kit comercial para determinar el porcentaje de ácidos siálicos unidos a las proteínas aisladas, que son glicoproteínas. Fernando *et al.*, 2010 llevó a cabo en su investigación la cuantificación del ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico) en GMP obtenido de distintas formas. Este autor utilizó un método con ácidos para provocar la liberación del ácido siálico unido al GMP y poder ser cuantificado posteriormente. Estos autores utilizan tres muestras de GMP de distinta procedencia, dos comerciales y una tercera obtenida por ellos mismos por precipitación con dos ácidos. Según el método utilizado se obtienen valores diferentes, puesto que el uso de ciertos ácidos puede provocar la destrucción del ácido siálico. El método para la cuantificación del ácido siálico que utiliza este autor es un método espectrofotométrico optimizado. Para una de las muestras de GMP comercial el valor obtenido mediante su ensayo es muy similar al reportado por la casa comercial, mientras en otro de los GMP comerciales el contenido está sobreestimado en un 2% por posibles compuestos interferentes. En el GMP obtenido por dichos autores obtuvieron un valor de 5-6,4% de ácidos siálicos. En nuestros ensayos se cuantificó el contenido de ácido siálico del Lacprodan CGMP-10 haciendo uso del kit comercial de cuantificación y el resultado obtenido fue de 5,46% de ácido siálico en el caso de tener una concentración de GMP del 65% y 7,14% de ácido siálico en el caso de que el contenido de GMP fuera del 85%. Estos resultados se corresponden con la ficha técnica de Arla Food Ingredients en la que indican un valor mínimo de ácido siálico de 5,4%. También se realizó la determinación con el kit comercial de las muestras de GMP obtenidas por medio de cromatografía de intercambio iónico arrojando un valor medio de 4,66% de ácido sálico.

7.2. Aislamiento de PP3

Con la finalidad de aislar la PP3 se llevó a cabo una filtración en gel utilizando Sephadex G-75. La muestra utilizada fue la PPT en forma de polvo diluido en un tampón de NH_4HCO_3 5 mM. La longitud de onda a la que se considera que absorben las proteínas es 280 nm; sin embargo, según estudios previos la longitud de onda a la que más absorbe la PP3 está en 230 nm, de manera que fue tomada como la longitud de onda a la que se realizaron todas las mediciones en el aislamiento de la PP3. Las absorbancias de las fracciones obtenidas en la filtración en gel fueron inferiores a 0,250 y por tanto la concentración obtenida no fue suficiente para pasar a una segunda cromatografía de intercambio iónico en Q-Sepharosa. Por ello, se decidió someter la

PPT directamente a la cromatografía en Q-Sepharosa para obtener PP3 sin realizar la separación previa en Sephadex G-75.

En la **figura 10A** se puede observar la elución de la PP3 tras su aislamiento en Q-Sepharosa utilizando un gradiente de concentración de NH_4HCO_3 que fue desde 5 mM hasta 1 M. Las fracciones 47-50 se corresponden con el perfil del primer pico de elución y las fracciones 56-59 representan el segundo pico de elución con absorbancias superiores a las del primero.

La **figura 10B** también se corresponde con el perfil de elución de la PP3 en el mismo gel que la anterior, aunque con una cantidad mayor de PPT. Mientras en la cromatografía A se utilizaron 4 mg de PPT en la B esta cantidad se aumentó a 6,22 mg.

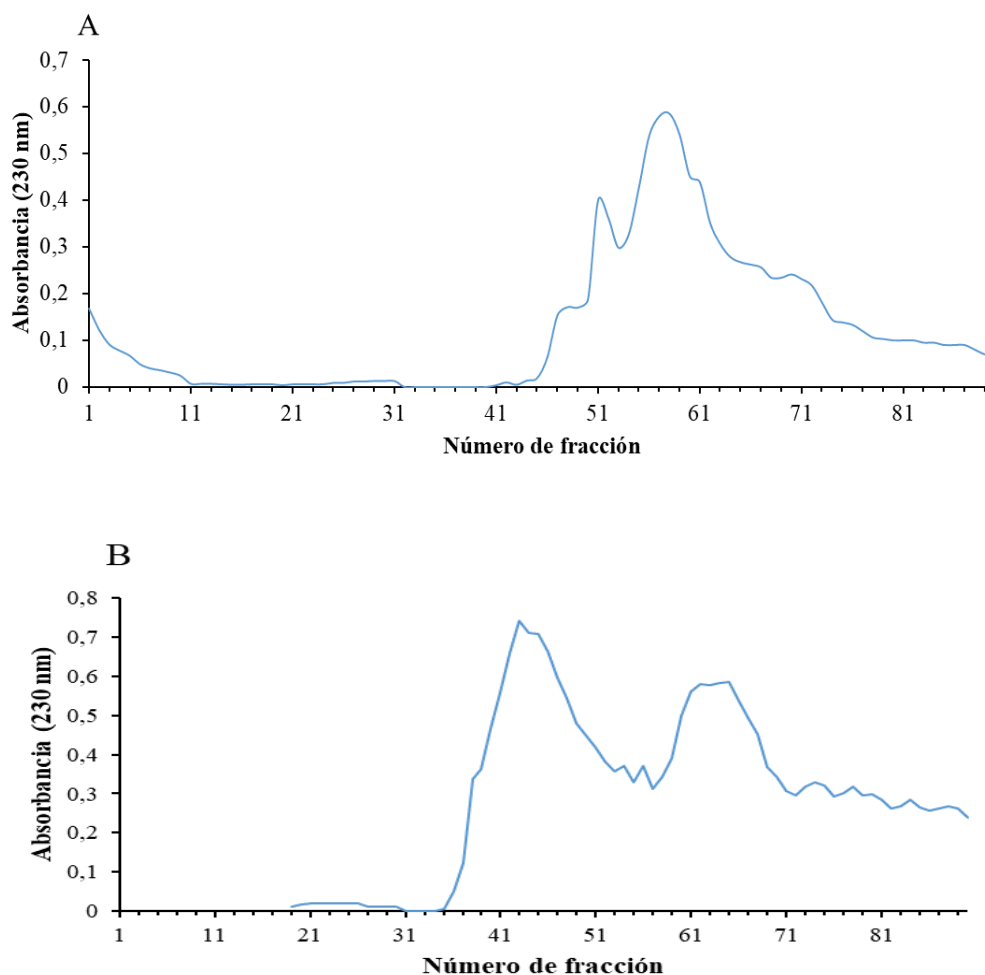


Figura 10. Perfil de dos cromatografías en gel Q-Sepharosa del aislamiento de la fracción de PP3, obtenida por gradiente elución de solución salina, a partir de (A) 4 mg de PPT y (B) 6,22 mg de PPT.

En la carrera número 1 de la **figura 11** se muestra el perfil electroforético de la fracción 56-59 del aislamiento de PP3 en gel Q-Sepharosa (**figura 10A**). La segunda carrera se corresponde con 1 mg/ml de PPT del que se partió para el aislamiento de la PP3.

Las bandas marcadas como A y B fueron enviadas al Servicio de Proteómica del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud para ser analizadas por espectrometría de masas. En las dos bandas se identificó la presencia de una proteína denominada GlyCAM-1, que según la base de datos UniProt (www.uniprot.org) es una denominación alternativa a la de PP3.

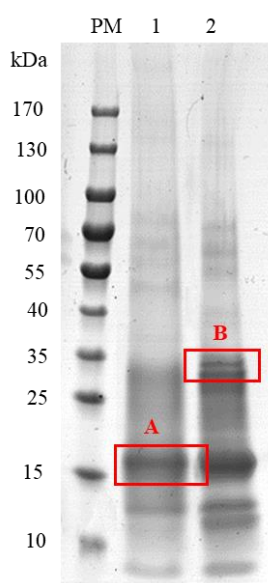


Figura 11. Electroforesis en gel de poliacrilamida 4-20% con SDS teñida con azul de Coomassie: (PM) Patrón de pesos moleculares, (1) fracción 56-59 del aislamiento de PP3 en gel Q-Sepharosa de la cromatografía 10A, (2) fracción PPT a 1 mg/ml.

Las carreras número 2 y 3 de la **figura 12** representan el perfil electroforético de los dos picos representados en la cromatografía 10B. En ambas se observan bandas a 18 kDa que se corresponde con el peso molecular de la PP3. Estas dos muestras fueron concentradas y utilizadas en los ensayos celulares.

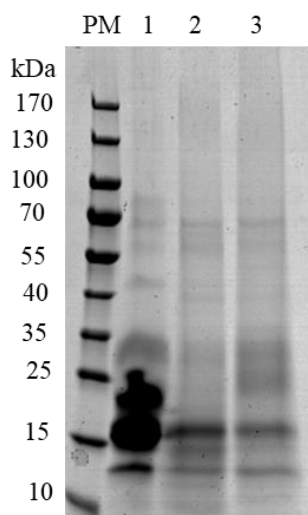


Figura 12. Electroforesis en gel de poliacrilamida 4-20% con SDS de las fracciones de las cromatografías del aislamiento de GMP y PP3 teñida con azul de Coomassie: (PM) Patrón de pesos moleculares, (1) fracciones correspondientes a los dos picos de las cromatografías 5A y 5B aislado por cromatografía de intercambio iónico, (2) fracción 38-55 de la cromatografía 10B de PP3, (3) fracción 56-82 de la cromatografía 10B.

7.3. Aislamiento de fracciones del lactosuero

Tras el fraccionamiento del lactosuero por medio de métodos de ultrafiltración se obtuvieron tres fracciones. Una fracción con peso molecular por encima de 10 kDa conteniendo las proteínas que quedaron retenidas en la membrana tras la centrifugación utilizando tubos con membranas de 10 kDa de tamaño de poro, una fracción con proteínas con un peso molecular por debajo de 3 kDa obtenidas tras el uso de tubos con membrana con el mismo tamaño de poro y una fracción intermedia, de 3-10 kDa, correspondiente a las proteínas retenidas en los tubos de 3 kDa. Las fracciones obtenidas se llevaron a electroforesis para conocer su composición. En la **figura 13** se aprecia la ausencia de bandas para las muestras 2 y 3 que se corresponden con las fracciones de 3-10 kDa y la inferior a 3 kDa, respectivamente, aunque posiblemente contienen proteínas o péptidos que no se quedaron retenidos en el gel por su pequeño tamaño. Por el contrario, la banda 1 muestra el perfil de aquellas fracciones con peso molecular superior a 10 kDa. Posteriormente estas fracciones fueron liofilizadas para poder ser utilizadas en los ensayos biológicos.

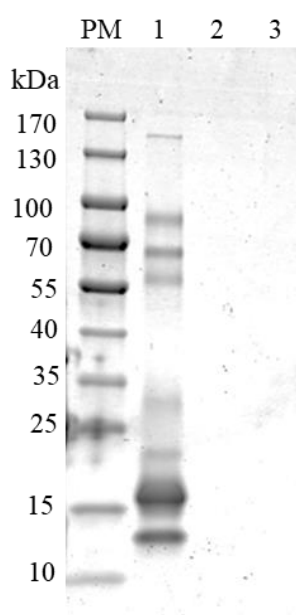


Figura 13. Electroforesis en gel de poliacrilamida 4-20% SDS de las fracciones de lactosuero y fracción proteosa peptona teñido con azul de Coomassie: (PM) Patrón de pesos moleculares, (1) fracciones > 10 kD, (2) fracciones entre 3-10 kDa, (3) fracciones < 3 kDa.

7.4. Evaluación de la actividad antirrotaviral de las fracciones proteicas

7.4.1. Lacprodan CGMP-10

El ensayo de citotoxicidad se realizó utilizando las concentraciones más alta y más baja de Lacprodan CGMP-10, que serían posteriormente utilizadas en los ensayos de

neutralización. Este ensayo mostró unos resultados de viabilidad de las células MA104 del 100% a las dos concentraciones evaluadas. Esto es indicativo de que la propia proteína a evaluar no afecta a las células.

La actividad antirrotavirus del Lacprodan CGMP-10 fue evaluada utilizando soluciones a diferentes concentraciones en PBS, así como el GMP purificado a partir de este producto comercial tras realizar la cromatografía en gel DEAE-Sephadex A-50. El Lacprodan CGMP-10 está constituido en un 65-85% por GMP, y el porcentaje restante lo forman otros componentes como son lactosa, grasa, minerales y agua. Los resultados de la neutralización obtenidos con las muestras de Lacprodan CGMP-10 fueron negativos en el rango de concentraciones de 0,2 hasta 9,4 mg/ml. Por el contrario, a las concentraciones más altas ensayadas de este se observó un aumento de la infección, por lo que se puede pensar que alguno de los componentes presentes en el Lacprodan pudiera hacer de vehículo de la infección, potenciándola en vez de inhibirla.

La finalidad de realizar una cromatografía del Lacprodan CGMP-10 fue obtener el GMP purificado y eliminar el resto de compuestos interferentes. En la cromatografía realizada se observó una meseta muy pronunciada de absorbancias altas a 212 nm. La fracción correspondiente a esta meseta fue recogida, dializada y liofilizada para poder utilizarse en los ensayos celulares. Según los resultados del BCA el contenido en proteína de este liofilizado fue de 47,46% (p/p). Esta fracción tampoco no mostró una actividad neutralizante frente a los rotavirus a concentraciones de proteína de entre 1 y 9,4 mg/ml.

Otra estrategia seguida en este ensayo fue la hidrólisis utilizando tres métodos enzimáticos distintos para hidrolizar el Lacprodan CGMP-10, con el objetivo de evaluar si los péptidos generados tenían actividad antirrotavirus. Autores como Cheng *et al.* (2015) han investigado los posibles efectos de los hidrolizados del GMP y los mecanismos moleculares de estos derivados enzimáticos. En sus resultados se observa que los hidrolizados de GMP tienen efectos inhibidores sobre la respuesta inflamatoria. Sin embargo, existe poca información sobre otros posibles efectos que puedan tener estos componentes. Las muestras obtenidas del Lacprodan CGMP-10 fueron: un hidrolizado de tripsina, un hidrolizado de pepsina y un hidrolizado de pepsina, tripsina y quimotripsina. Todas las muestras hidrolizadas fueron introducidas en un ensayo de neutralización, sin embargo, no se pudieron leer correctamente los resultados puesto que la monocapa celular se vio afectada durante el ensayo. Esto pudo deberse a que los

productos de hidrólisis afectaran de alguna manera a las propias células comprometiendo la estabilidad de la monocapa.

Adicionalmente, se realizaron los ensayos de bloqueo celular y post-unión para investigar otros mecanismos que pudiera tener el Lacprodan CGMP-10 para neutralizar la infección por rotavirus. El ensayo de bloqueo celular se llevó a cabo con la finalidad de comprobar si el propio Lacprodan CGMP-10 pudiera interaccionar con los receptores de la célula de manera que el virus no pueda adherirse a dichos receptores e infectar la célula. Sin embargo, el GMP tiene mayor afinidad con las proteínas del rotavirus que con los receptores de las células MA104. El ensayo de post-unión se realiza poniendo en contacto la proteína con las células para que penetre en la célula y posteriormente adicionamos el rotavirus. Al no haber presencia de la proteína en el exterior celular no existe una barrera que impida penetrar al virus en la célula. Una vez dentro la proteína tendría la capacidad de interaccionar con los mecanismos de transcripción y reproducción del virus inhibiéndolos o modificándolos de alguna forma. Se debería ver menor infección del virus en el caso de que tuviera esta capacidad. Sin embargo, los resultados de ambos ensayos mostraron que el Lacprodan CGMP-10 es incapaz de bloquear los receptores de la célula, ni manifiesta efecto en los mecanismos de transcripción del rotavirus.

7.4.2. Glicomacropéptido

Para la evaluación de la actividad antirrotavirus del glicomacropéptido se utilizó el liofilizado obtenido de las fracciones recogidas de la cromatografía en gel DEAE-Sephadex A-50. Los resultados del BCA indican que el 7,04% del polvo obtenido equivale a proteína y a partir de este resultado se prepararon las diluciones en PBS mostradas en la **tabla 1**. Se puede observar que a concentraciones crecientes de la proteína el efecto de la neutralización es mayor.

Existen diferentes estrategias a través de las cuales las proteínas pueden neutralizar la infección por rotavirus: bloqueando las proteínas de la cápside del rotavirus responsables de la unión con los receptores de membrana celular, bloqueando los receptores celulares impidiendo la interacción con el virus de manera que no sea fagocitado, alterando los mecanismos de ensamblaje y disgregación del virus o inhibiendo los mecanismos de traducción y transcripción del RNA mensajero (Berkhout *et al.*, 2004).

Según Gerardy-Schahn *et al.* (2013), algunos virus son capaces de unirse a ácidos siálicos a través de receptores que se encuentran en la superficie del virus de manera que en presencia de glicoproteínas rompería su unión con la célula infectada para unirse a los glicanos adheridos a la superficie de la proteína. Tal como explican estos autores, el concepto de que los rotavirus se unen al ácido siálico está respaldado por la observación de que un tratamiento con neuraminidasa elimina la unión que establecen algunas cepas con las células.

Tabla 1. Resultados obtenidos en los ensayos de neutralización de la infección con rotavirus bovino de la línea celular MA104 utilizando GMP obtenido de lactosuero bovino. Los valores representan la media \pm la desviación estándar (SD). Los valores que presentan diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Proteína	Concentración (mg/ml)	Media \pm SD	Número de réplicas
GMP	0,70	99,12 \pm 1,75 ^a	6
	0,50	43,75 \pm 3,50 ^{abc}	2
	0,35	19,59 \pm 31,07 ^{bc}	6
	0,18	0,00 \pm 41,34 ^{bc}	4

7.4.3. Fracciones de lactosuero

A partir de lactosuero bovino se obtuvieron tres fracciones de distinto peso molecular cuya actividad antirrotavirus fue evaluada utilizando la línea celular MA104 y cuyos resultados se muestran en la **tabla 2**. Los resultados del BCA mostraron que el contenido de proteína de las fracciones > 10 kDa, 3-10 kDa y < 3 kDa fueron del 16,02%, 0,78% y 2,19%, respectivamente. De manera que la fracción con mayor porcentaje de proteína se corresponde con aquella fracción con un peso molecular superior a 10 kDa (F1), seguida de aquella con proteínas inferiores a 3 kDa (F3) y en último lugar, aquella que comprende el rango de peso molecular entre ambas (F2). Los resultados del ensayo de neutralización mostraron que a mayor concentración de proteína mayor fue el efecto de inhibición de la infección por rotavirus por parte de la F1. A concentraciones de entre 0,5-3,2 mg/ml el efecto observado fue del 100% de neutralización.

Todas las proteínas del lactosuero mencionadas en la parte de introducción quedarían en la fracción denominada F1, lo que concuerda con nuestros resultados en los que el

efecto neutralizante es mayor. En la fracción F3 nos encontramos aquellos componentes con un peso molecular inferior a 3 kDa que en el caso del lactosuero podría corresponder con oligosacáridos como el ácido siálico que pueden haberse desprendido de las proteínas en alguno de los pasos de acidificación o con péptidos pequeños. En la fracción F2 debería estar presente la forma monomérica del GMP, aunque como se menciona en el apartado anterior es la forma agregada la que se encuentra más frecuentemente. En tal caso, sería en la F1 donde se podría encontrar este componente. Además, se puede observar que hay gran variabilidad en los datos de neutralización obtenidos cuanto más bajamos la concentración de proteínas utilizada.

Tabla 2. Resultados obtenidos en los ensayos de neutralización de la infección con rotavirus bovino de la línea celular MA104 utilizando las fracciones de lactosuero con distinto peso molecular (n = 4). Los valores representan la media \pm la desviación estándar (SD). Los valores que presentan diferentes letras son significativamente diferentes (p <0,05).

Fracción	Concentración (mg/ml)	Media \pm SD
F1	3,20	100,00 \pm 0,00 ^a
	2,00	99,93 \pm 0,08 ^a
	1,00	96,05 \pm 2,39 ^a
	0,50	96,05 \pm 14,37 ^b
	0,25	0,00 \pm 19,91 ^c
F2	0,23	0,00 \pm 13,17
F3	0,44	28,80 \pm 11,89 ^a
	0,22	21,13 \pm 15,61 ^a

7.4.4. Componente 3 de la proteosa peptona

La PP3 se evaluó utilizando las dos fracciones obtenidas de un mismo aislamiento correspondientes a los dos picos de mayor absorbancia. En la **tabla 3** podemos ver los resultados del ensayo de neutralización. A mayor concentración de la proteína se observa mayor neutralización de la infección por rotavirus llegando a una neutralización del 100% a concentraciones iguales o mayores a 0,42 mg/ml de PP3.

Estos resultados pueden ser derivados de la propia proteína o de algún fragmento del que suele ir acompañado. Tal como veíamos en las electroforesis no se observa una única banda, sino que la muestra contiene fragmentos de distintos pesos moleculares.

Tabla 3. Resultados obtenidos en los ensayos de neutralización de la infección con rotavirus bovino de la línea celular MA104, utilizando dos fracciones cromatográficas correspondientes al aislamiento de PP3 a partir de lactosuero bovino. Los valores representan la media \pm la desviación estándar (SD). Los valores que presentan diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Proteína	Concentración (mg/ml)	Media \pm SD	Número de réplicas
PP3 (1)	1,20	100,00 \pm 0,00 ^{ad}	2
	0,60	100,00 \pm 0,00 ^{ad}	4
	0,30	77,31 \pm 6,04 ^a	4
	0,15	26,29 \pm 25,10 ^{bc}	4
	0,07	33,08 \pm 26,16 ^{bce}	4
PP3 (2)	0,84	100,00 \pm 0,00 ^a	2
	0,42	99,82 \pm 0,21 ^a	6
	0,21	70,67 \pm 9,00 ^{ac}	4
	0,10	26,70 \pm 20,46 ^b	4

En la **figura 14** vemos una imagen tomada en el microscopio de fluorescencia de las monocapas celulares infectadas solo con los rotavirus bovinos (control positivo) o con los rotavirus neutralizados con las muestras de PP3 a una concentración de 0,3 mg/ml (**figura 14B**) y de GMP a 0,35 mg/ml (**figura 14D**). Las **figuras 14A y 14C** se corresponden con los controles positivos correspondientes al ensayo de evaluación de actividad de la PP3 y del GMP, respectivamente. Lo que se observa en los controles es un mayor número de células infectadas en comparación con las monocapas celulares a las que se había adicionado el rotavirus previamente incubado con PP3 o GMP. La morfología de las células es claramente epitelial y no se modifica por la acción del rotavirus. El núcleo celular se visualiza en negro y el resto de la célula desprende fluorescencia debido a que el citoplasma está invadido por los rotavirus que reaccionan con el anticuerpo primario y este con el anticuerpo secundario marcado con fluoresceína.

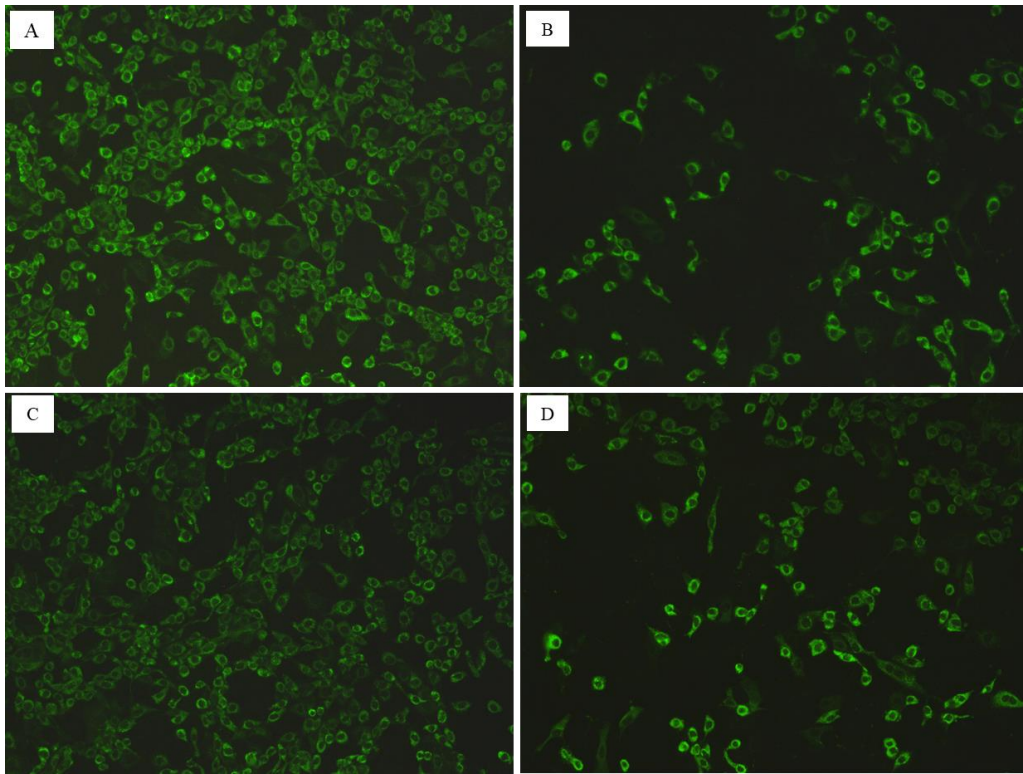


Figura 14. Imágenes procedentes de un microscopio de fluorescencia de las células MA104 tras un ensayo de neutralización con diferentes muestras, (A), (C) control positivo de rotavirus, (B) 0,30 mg/ml de PP3, (D) 0,35 mg/ml de GMP. Las imágenes fueron tomadas con 100x aumentos.

8. Conclusiones

Los objetivos propuestos en este Trabajo de Fin de Máster y los resultados obtenidos nos llevan a las siguientes conclusiones:

1. La cromatografía de intercambio iónico es un método efectivo para aislar el glicomacropéptido a partir de lactosuero bovino.
2. El glicomacropéptido es capaz de neutralizar completamente la infección causada por los rotavirus bovinos en la línea celular MA104 a una concentración de proteína de 0,7 mg/ml.
3. El componente 3 de la proteosa peptona es capaz de neutralizar completamente la infección causada por los rotavirus bovinos en la línea celular MA104 a partir de una concentración de proteína de 0,6 mg/ml.
4. La fracción del lactosuero bovino con un peso molecular superior a 10 kDa, que comprendería la mayoría de las proteínas del lactosuero, exhibe mayor capacidad de neutralización frente a los rotavirus bovinos que las fracciones de pesos moleculares inferiores.

9. Bibliografía

- Arnold, M., Patton, JT., McDonald, SM. (2009). Culturing, storage and quantification of rotaviruses. *Current Protocols in Microbiology*, 15, 15C.3. DOI:10.1002/9780471729259.mc15c03s15.
- Barltrop, JA., Owen, TC., Cory, AH., Cory, JG. (1991). 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl)tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans As cell-viability indicators. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1(11), 611-614. DOI:10.1016/s0960-894x(01)81162-8.
- Berkhout, B., Floris, R., Recio, I., Servaas, V. (2004). The antiviral activity of the milk protein lactoferrin against the human immunodeficiency virus type 1. *BioMetals*, 17(3), 291-294. DOI: 10.1023/b:biom.0000027707.82911.be.
- Campagna, S. Mathot, AG., Fleury, Y., Girardet, JM., Gaillard, JL. (2004). Antibacterial activity of Lactophorin, a synthetic 23-residues peptide derived from the sequence of bovine milk component-3 of proteose peptone. *American Dairy Science Association* 87(6), 1621-1626. DOI: 10.3168/jds.s0022-0302(04)73316-0.
- Conesa, C., Rota, C., Castillo, E., Pérez, MD., Calvo, M., Sánchez, L. (2009). Effect of heat treatment on the antibacterial activity of bovine lactoferrin against three foodborne pathogens. *International Journal of Dairy Technology*, 63, 209-215.
- Chatterton, DE., Smithers, G., Roupas, P., Brodkorb, A. (2006). Bioactivity of β -lactoglobulin and α -lactalbumin - Technological implications for processing. *International Dairy Journal*, 16(11), 1229-1240. DOI: 10.1016/j.idairyj.2006.06.001.
- Chávez-Vela, NA., Salinas-Mirallas, E., Jáuregui-Rincón, J., Bon-Rosas, F., Pérez-Tellez, DMD. (2012). Reactividad de anticuerpos policlonales anti-glicomacropéptido de suero de quesería bovino frente al glicomacropéptido de suero de quesería de oveja. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*, 54, 12-16.

- Cheng, X., Dao, G., Chen, B., Mao, X. (2015). Endotoxin-binding peptides derived from casein glycomacropeptide inhibit lipopolysaccharide-stimulated inflammatory responses via blockade of NF- κ B activation in macrophages. *Nutrients*, 7(5), 3119-3137. DOI: 10.3390/nu7053119.
- Chockry B., Pérez, MD. (2011). Interaction of α -lactalbumin with lipids and possible implications for its emulsifying properties – A review. *International Dairy Journal*, 21(10), 724-741. DOI: 10.1016/j.idairyj.2011.04.009.
- Dewettinck, K., Rombaut, R., Thienpont, N., Le, TT., Messens, K. y Van Camp, J. (2008). Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. *International Dairy Journal*, 18(5), 436-457. DOI: 10.1016/j.idairyj.2007.10.014.
- Duran, A., Kahve, HI. (2017). The use of lactoferrin in food industry. *Academic Journal of Science*, 7(2), 89-94.
- Esona, MD., Gautam, R. (2015). Rotavirus. *Clinics in Laboratory Medicine*, 35(2), 363–391. DOI:10.1016/j.cll.2015.02.012.
- Farnaud, S., Evans, RW. (2003). Lactoferrin-a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Molecular immunology*, 40(7), 395-405. DOI: 10.1016/s0161-5890(03)00152-4.
- Fox, PF. (2009). Lactose: Chemistry and properties. *Advanced Dairy Chemistry*, 1-15. DOI: 10.1007/978-0-387-84865-5_1.
- Fox PF., Uniacke-Lowe T., McSweeney PLH., O'Mahony JA. (2015). Production and Utilization of Milk. *Dairy Chemistry and Biochemistry*.1-19. DOI:10.1007/978-3-319-14892-2_1.
- Galindo-Amaya, LM., Valbuena-Colmenares, E., Rojas-Villaruel, E. (2006). Estandarización de la detección del glicomacropéptido por PAGE-SDS como índice de adulteración de leche. *Revista Científica*, 16(3), 308-314.
- Gapper, LW., Copestake, DE., Otter, DE., Indyk, HE. (2007). Analysis of bovine immunoglobulin G in milk, colostrum and dietary supplements: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389(1), 93-109. DOI: 10.1007/s00216-007-1391-z.

- Gerardy-Schahn, R., Delannoy, P., von Itzstein, M. (2013). Sialic acid receptors of viruses. *SialoGlyco Chemistry and Biology II*, 365, 1-28. DOI: 10.1007/128_2013_466.
- Gibbons, JA., Kanwar, RK., Kanwar, JR. (2011). Lactoferrin and cancer in different cancer models. *Frontiers in Bioscience*, 3, 1080-1088. DOI: 10.2741/212.
- Girardet, JM., Linden, G., Loye, S., Courthaudon, JL., Lorient, D. (1993). Study of mechanism of lipolysis inhibition by bovine milk proteose-peptone component 3. *Journal of Dairy Science*, 76(8), 2153-2163. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(93)77551-7.
- Hartmann, R., Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2), 163-169. DOI: 10.1016/j.copbio.2007.01.013.
- Huang, BX., Kim, HY., Dass, C. (2004). Probing three-dimensional structure of bovine serum albumin by chemical cross-linking and mass spectrometry. *Journal of American Society for Mass Spectrometry*, 15(8), 1237-1247. DOI: 10.1016/j.jasms.2004.05.004.
- Hurley, W. L., & Theil, P. K. (2011). Perspectives on immunoglobulins in colostrum and milk. *Nutrients*, 3(4), 442-474.
- Jahanban-Esfahlan, A., Ostadrahimi, A., Jahanban-Esfahlan, R., Roufegarinejad, L., Tabibiazar, M., Amarowicz, R. (2019). Recent developments in the detection of bovine serum albumin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 138, 602-617. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.07.096.
- Jauregui-Rincón, J., Salinas-Miralles, E., Chávez-Vela, N., Jiménez-Vargas, M. (2019). Glycomacropeptide: biological activities and uses. *Whey - Biological Properties and Alternative Uses*, 1-21. DOI: 10.5772/intechopen.82144.
- Jenness, R., Holt, C. (1987) Casein and lactose concentrations in milk of 31 species are negatively correlated. *Experientia*, 43, 1015-1018. DOI:10.1007/BF01952224.
- Kawasaki, Y., Isoda, H., Tanimoto, M., Dosako, S., Idota, T., Ahiko, K. (1992) Inhibition by lactoferrin and κ -Casein glycomacropeptide of binding of cholera toxin to its receptor. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 56(2), 195-198. DOI:10.1271/bbb.56.195.

- Kontopidis, G., Holt, C., Sawyer, L. (2004). Invited review: β -Lactoglobulin: binding properties, structure, and function. *Journal of Dairy Science*, 87(4), 785-796. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73222-1.
- Kussendrager, KD., Hooijdonk, AC. (2000). Lactoperoxidase: physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. *British Journal of Nutrition*, 84(S1), 19-25. DOI: 10.1017/S0007114500002208.
- Legrand, D., Elass, E., Carpentier, M., Mazurier, J. (2005). Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62, 2549-2559. DOI: 10.1007/s00018-005-5370-2.
- Levay, PF., Viljoen, M. (1995). Lactoferrin: a general review. *Haematologica*, 80(3), 252-267. DOI: 10.3324/%25x.
- Lien, EL. (2003). Infant formulas with increased concentrations of α -lactalbumin. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77(6), 1555S-1555S. DOI: 10.1093/ajcn/77.6.1555S.
- Li, EWY., Mine, Y. (2004). Technical note: Comparison of chromatographic profile of glycomacropeptide from cheese whey isolated using different methods. *Journal of dairy science*, 87(1), 174-177. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73155-0.
- López-Posadas, R., Requena, P., González, R., Suárez, MD., Zarzuelo, A., Sánchez de Medina, F., Martínez-Augustin, O. (2010). Bovine glycomacropeptide has intestinal antiinflammatory effects in rats with dextran sulfate-induced colitis. *The Journal of Nutrition*, 140(11), 2014-2019. DOI:10.3945/jn.109.118448.
- Markus, CR., Olivier, B., De Haan, DHF. (2002). Whey protein rich in α -lactalbumin increases the ratio of plasma tryptophan to the sum of the other large neutral amino acids and improves cognitive performance in stress-vulnerable subjects. *American Society for Nutrition*, 75(6), 1051-1056. DOI: 10.1093/ajcn/75.6.1051.
- Nakano, T., Ozimek, L. (2000). Purification of glycomacropeptide from caseinate hydrolysate by gel chromatography and treatment with acidic solution. *Journal of Food Science*, 65(4), 588-590. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2000.tb16054.x.
- Nakano, T., Ozimek, L. (1999). Purification of glycomacropeptide from non-dialyzable fraction of sweet whey by anion-exchange chromatography. *Biotechnology Techniques*, 13(11), 739-742. DOI: 10.1023/A:1008957928446.

- Pedersen, LRL., Nielsen, SB., Hansted, JG., (2012). PP3 forms stable tetrameric structures through hydrophobic interactions via the C-terminal amphipathic helix and undergoes reversible thermal dissociation and denaturation. *The FEBS Journal*, 279, 336-347. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2011.08428.x.
- Pérez, MD. y Calvo, M. (1995). Interaction of β -Lactoglobulin with retinol and fatty acids and its role as a possible biological function for this protein: A review. *Journal of Dairy Science*, 78(5), 978-988. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(95)76713-3.
- Ramos, OL., Pereira, RN., Rodrigues, RM., Teixeira, JA., Vicente, AA., Malcata, FX. (2016). Whey and whey powders: production and uses. *Encyclopedia of Food and Health*. 498-505. DOI: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00747-9.
- Sadiq, A., Bostan, N., Yinda, KC., Naseem, S., Sattar, S. (2018). Rotavirus: genetics, pathogenesis and vaccine advances. *Reviews in Medical Virology*, e2003. DOI:10.1002/rmv.2003.
- Sánchez, L., Calvo, M., Brock, JH. (1992). Biological role of lactoferrin. *Archives of Disease in Childhood*, 67, 657-661. DOI: 10.1136/adc.67.5.657.
- Sørensen, ES., Petersen, TE. (1993). Purification and characterization of three proteins isolated from the proteose peptone fraction of bovine milk. *Journal of Dairy Research*, 60(2), 189-197. DOI:10.1017/s0022029900027503.
- Silva-Hernandez, ER., Nakano, T., Ozimek, L. (2002). Isolation and analysis of κ -casein glycomacropeptide from goat sweet whey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(7), 2034-2038. DOI: 10.1021/jf010732q.
- Smith, PK., Krohn, RI., Hermanson, GT., Mallia, AK., Gartner, FH., Provenzano, MD., Klenk, DC. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76-85. DOI:10.1016/0003-2697(85)90442-7.
- Sugahara, T., Onda, H., Shinohara, Y., Horii, M., Akiyama, K., Nakamoto, K., Hara, K. (2005). Immunostimulation effects of proteose-peptone component 3 fragment on human hybridomas and peripheral blood lymphocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1725(2), 233-240. DOI: 10.1016/j.bbagen.2005.05.008.
- Vesikari, T. (2012). Rotavirus vaccination: a concise review. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(5), 57-63. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2012.03981.x.

- Vincent, D., Elkins, A., Condina, M. R., Ezernieks, V., Rochfort, S. (2016). Quantitation and identification of intact major milk proteins for high-throughput LC-ESI-Q-TOF MS analyses. *PLoS One*, 11(10), e0163471. DOI: 10.1371/journal.pone.0163471.
- Ward, PP., Conneely, OM. (2004). Lactoferrin: Role in iron homeostasis and host defense against microbial infection. *Biometals*, 17(3), 203-208. DOI: 10.1023/B:BIOM.0000027693.60932.26.
- Warren, L. (1959) The thiobarbituric acid assay of sialic acids. *The Journal of Biological Chemistry*, 234(8), 1971-1975. DOI:10.1016/S0021-9258(18)69851-5.
- Zhang, Y., Lima, CF., Rodrigues, LR. (2014). Anticancer effects of lactoferrin: underlying mechanisms and future trends in cancer therapy. *Nutrition Reviews*, 72(12), 763-773. DOI: 10.1111/nure.12155.