

207
7410



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**SINTESIS Y CARACTERIZACION DE UN OLIGOPEPTIDO
QUE MIMETIZA UNA REGION DE LA GLICOPROTEINA
VP7 DEL ROTAVIRUS DE SIMIO SA11."**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A :**

GABRIELA GARCIA PEREZ

MEXICO, D. F.

1986.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E .

INTRODUCCION	1
OBJETIVO	9
MATERIAL Y METODOS	10
RESULTADOS	29
DISCUSION	49
BIBLIOGRAFIA	52

INTRODUCCION.

Las gastroenteritis virales son una de las enfermedades más comunes en muchas regiones del mundo, pudiéndose presentar tanto en forma endémica como epidémica (1). La relación de algunas gastroenteritis son agentes virales. fue puesta al -- descubierta en el año de 1972, con el virus Norwalk (2), el -- cual ha sido asociado con las infecciones intestinales que afectan principalmente a jóvenes y adultos (3,4). En el año de -- 1973 se describieron los rotavirus, los cuales fueron observados al microscopio electrónico en biopsias de tejido duodenal y en heces de niños con diarrea aguda (5,6).

Los rotavirus son considerados en la actualidad uno de los agentes etiológicos más importantes de la diarrea aguda en niños menores de 5 años. También afectan a individuos jóvenes de otras especies como aves (7) y mamíferos (8,9,10,11,12, 13). En humanos los episodios de diarrea ocurren princípalmente en niños entre los seis meses y los dos años de edad (14). La gravedad de los cuadros diarreicos depende del grado de de--sequilibrio hidroelectrolítico que ocasionen, que de no ser -- tratado a tiempo puede ser mortal (15).

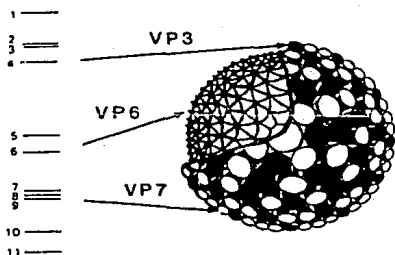
Los rotavirus, pertenecen a la familia Reoviridae, y son partículas icosaédricas con un diámetro de alrededor de -- 70 nm. Su genoma está formado por once segmentos de RNA de -- doble cadena (RNAdc) de diferentes tamaños, que van desde 680 pares de bases hasta 33,000 pares de bases (16). Estos seg--

mentos pueden separarse de acuerdo a su tamaño por electroforesis en geles de poliacrilamida (fig. 1).

Los virus maduros están formados por una doble capa proteica. En el caso del rotavirus de simio SA11 (el cual ha sido usado como modelo de estudio ya que crece eficientemente en cultivo de células); la capa interna está compuesta por tres proteínas, VP1, VP2 y VP6, las cuales tienen pesos moleculares de 116,000, 96,000 y 42,000 daltons respectivamente (17,18). VP6, el producto de traducción del segmento seis -- del RNAc del genoma viral, es la proteína más abundante, y es la responsable de la inducción de anticuerpos capaces de reaccionar con rotavirus aislados de diferentes especies animales y pertenecientes a serotipos distintos, por lo que se le ha denominado como antígeno común de grupo de estos virus (19) (fig. 1).

La capa externa del virus está formada por las proteínas VP3 y VP7. En el rotavirus SA11, VP3 es el producto de traducción del segmento cuatro del genoma; tiene un peso molecular de 88,000 daltons, y ha sido asociado con las propiedades hemaglutinantes y con el aumento de la infectividad del rotavirus al ser tratado con tripsina (20). Este tratamiento con tripsina produce un corte en VP3 originando dos polipéptidos, VP5 y VP8 (21) (fig 2), los cuales se cree están involucrados en los fenómenos de adsorción y/o penetración -- del virus a la célula huésped.

GENOMA DE
RNA DS



VP3
SEROTIPO ESPECIFICO ,

VP6
ANTIGENO COMUN DE GRUPO Y
DISTINTIVO DE SUBGRUPO ,

VP7
SEROTIPO ESPECIFICO ,

Fig 1. Esquema de la estructura del genoma y de la doble capside de los rotavirus. Se muestran los once segmentos del RNAdc separados en un gel de poliacrilamida y se señala la localización -- dentro del virión de los polipéptidos VP3 VP6 y VP7, codificados como se indica, por los segmentos de RNAdc 4, 6 y 9, respectivamente. Algunas de las características de estos polipéptidos se enlistan en la -- parte derecha de la figura.

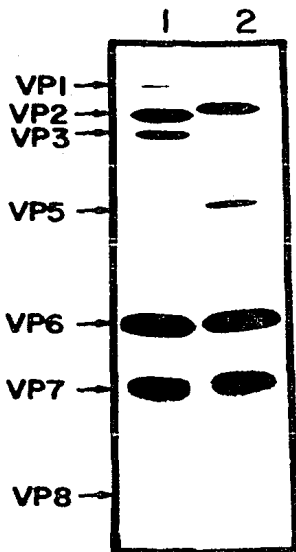


Fig 2 Efecto de la tripsina sobre las protefmas estruc-
turales del rotavirus de simio SA11 . Las protefmas virales marcadas r
radioactivamente con ^{35}S -metionina se separaron por electroforésis en -
un gel de poliacrilamida al 11%. Se muestra la autoradiograffa del gel.
Carril 1, protefmas obtenidas del virus no tratado con tripsina; carril
2, protefmas del virus tratado con 10ug/ml de tripsina, durante treinata
min. a 37°C.

Las proteínas VP7, más abundante de la capa externa, está codificada por el segmento nueve del genoma de SA11; -- tiene un peso molecular de 37,000 daltons y está glicosilada (22). Esta proteína se ha identificado como el antígeno responsable de la especificidad de serotipo (19,23), y contra la cual reaccionan la mayoría de los anticuerpos que neutralizan al virus (22). Algunos estudios recientes han asociado también a VP3 como inductora de anticuerpos neutralizantes, pero en menor grado (24) (fig 1).

Los rotavirus infectan y se replican en las células epiteliales del intestino delgado. Las células de esta región al ser infectadas por el virus se desprenden tempranamente y son reemplazadas por células inmaduras provenientes de las criptas de Lieberkuhn. Estas células inmaduras son incapaces de llevar a cabo las funciones normales de absorción intestinal, lo cual ocasiona una pérdida de electrolitos y agua produciéndose así la diarrea, que puede ser grave, dependiendo del grado de deshidratación que se produce en el individuo (25, 26,27).

Si bien no se conocen con certeza los mecanismos inmunológicos de defensa contra los rotavirus, se sabe que los anticuerpos a nivel intestinal juegan un papel importante para evitar las infecciones causadas por estos virus (28), mientras que los anticuerpos a nivel sistémico no parecen ser pro

tectores contra las infecciones (29,30).

Para poder ofrecer soluciones de tipo terapéutico o profiláctico a los problemas de las gastroenteritis causadas por rotavirus, sería de gran ayuda entender las interacciones entre este virus y su célula huésped, así como sus mecanismos de infección. En general se sabe que los virus para penetrar a la célula huésped deben interaccionar con un receptor celular. Esta interacción entre el receptor y el virus involucra únicamente algunas regiones de las proteínas de la superficie viral, contra las cuales generalmente reaccionan los anticuerpos que neutralizan al virus, y se les han denominado determinantes antigénicos de neutralización o epítopes de neutralización.

Existe gran interés en la caracterización de los epítopes de neutralización en los rotavirus, lo cual ha motivado el estudio de sus proteínas de capa externa por ser éstas las que poseen dichos epítopes. Además se sabe que los rotavirus al perder su capa externa pierden su infectividad (31), lo que indica que estas proteínas juegan un papel importante en el proceso de infección, posiblemente en el reconocimiento de los receptores de la célula huésped y la penetración a la misma.

Para estudiar los determinantes antigénicos de las proteínas se han aplicado diversas metodologías. Una de ellas

es la cristalografía de rayos X que permite definir aquellas regiones de la proteína que se encuentran expuestas en la superficie de la molécula, más no necesariamente señala los determinantes antigénicos. Este es además un proceso bastante sofisticado, el cual requiere de la proteína totalmente pura y en estado cristalino (32).

Otra de las técnicas empleadas para este fin ha sido la producción de anticuerpos monoclonales neutralizantes - que se utilizan para obtener mutantes resistentes a la neutralización. Posteriormente, se obtienen las secuencias de las proteínas del virus mutante, las cuales al compararse con la del virus silvestre revela aquellas regiones que están alteradas y que por consiguiente podrían representar epítopes de -- neutralización (33,34).

Por último, uno de los enfoques más populares en la actualidad para la localización de epítopes de neutralización es la utilización de péptidos sintéticos que mimetizan la estructura primaria de las regiones seleccionadas del virus que se estudia. Estos péptidos sintéticos se utilizan para inmunizar animales, probándose posteriormente la capacidad de los sueros anti-péptido obtenidos para neutralizar la infectividad viral. De esta manera se han podido localizar determinantes antigénicos de neutralización de varios virus, como poliovirus (35), virus de la fiebre aftosa, (36) y el virus de la hepati

tis B (37, 38, 39, 40). En el caso de la fiebre aftosa los péptidos no sólo fueron capaces de inducir anticuerpos que neutralizan la infección en un sistema in vitro, sino que además indujeron anticuerpos en animales experimentales que los protegieron contra retos posteriores con el virus patógeno.

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es localizar un eptope de neutralización de la proteína VP7 del rotavirus de simio - SA11, mediante el uso de péptidos sintéticos.

MATERIALES Y METODOS.

SINTESIS QUIMICA DEL PEPTIDO

La síntesis química del péptido se llevó a cabo por el método en fase sólida descrito por Barany y Merrifield -- (41), empleando como soporte una resina de poliestireno-divinilbenceno. La resina utilizada tenía acoplado el aminoácido lisina, el cual estaba unido a través de su grupo carboxilo - (COOH), mientras que su grupo amino (NH_2) estaba bloqueado por el grupo *ter*butiloxicarbonil (*t*-*boc*), el cual tiene como finalidad evitar que el aminoácido reaccione por su lado NH_2 . Del mismo modo, el grupo lateral de la lisina estaba bloqueado -- por el grupo 2-cloro-carbobenzoxi (2-Cl-Z) para evitar la formación de cadenas laterales no deseadas en el péptido.

Como primer paso en la síntesis, se removió el grupo *t*-*boc* de la lisina mediante tratamiento con ácido trifluoracético (TFA) (Pierce) al 50% en diclorometano (Merck). Esta desprotección se llevó a cabo durante treinta minutos a temperatura ambiente, con agitación suave. Posteriormente, la resina se lavó con diclorometano y se trató con trietil amina - (TEA) (Pierce) al 5% en diclorometano para desprotonar el grupo NH_2 de la lisina. Después se agregó el siguiente aminoácido, en este caso ácido glutámico, en un exceso 3M (lab Península), y se hizo reaccionar con la lisina unida a la resina -- añadiendo diciclohexilcarbodiimida (DCC) (Pierce) como agente acoplante, en cantidad equivalente al aminoácido añadido. El

ácido glutámico tenía su extremo NH_2 bloqueado por su grupo *t*-*bo*c y su cadena lateral por el grupo benzil-éster (OBzl). De esta forma se logró que el aminoácido añadido reaccionara a través de su extremo COOH con el extremo NH_2 del aminoácido unido a la resina, formándose así el enlace peptídico. Este procedimiento se repitió tantas veces como aminoácidos tuvo el péptido que se sintetizó, sólo que en cada caso se utilizó el aminoácido correspondiente a la secuencia deseada. En la figura 3 se encuentra un esquema general de los pasos involucrados para llevar a cabo la síntesis de péptidos en fase sólida. En la figura 4 se muestra la reacción que se lleva a cabo para formar el enlace peptídico.

Cada paso de acoplamiento y desprotección se controló haciendo reaccionar alícuotas de péptido de los distintos pasos, con ninhidrina (42,43). Si la prueba resultaba negativa (sin color), esto indicaba la ausencia de grupos NH_2 libres, si era positiva (con color), indicaba la presencia de grupos NH_2 reactivos. Cuando el resultado de la prueba era positivo, indicando que el acoplamiento no había sido total, el ciclo a partir del paso de desprotonación con TEA se repetía, acoplándose nuevamente el mismo aminoácido hasta que la prueba resultara negativa.

Al finalizar la síntesis química del péptido, este se liberó de la resina por tratamiento con anisol al 10% en -

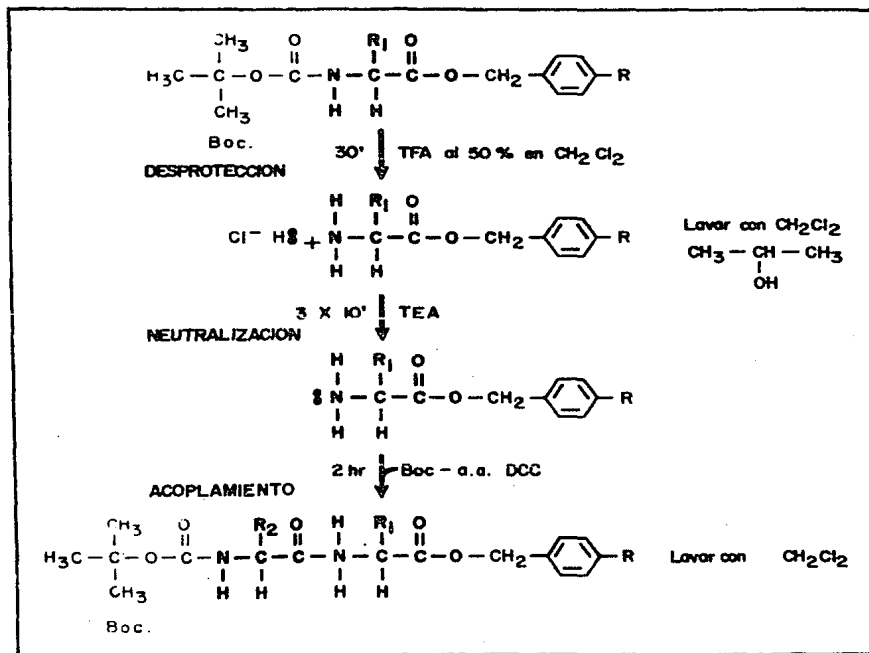


Fig 3. Esquema de la síntesis química de péptidos. R, resina empleada como soporte sólido durante la síntesis; R₁, cadena lateral del aminoácido 1; R₂, cadena lateral del aminoácido 2.

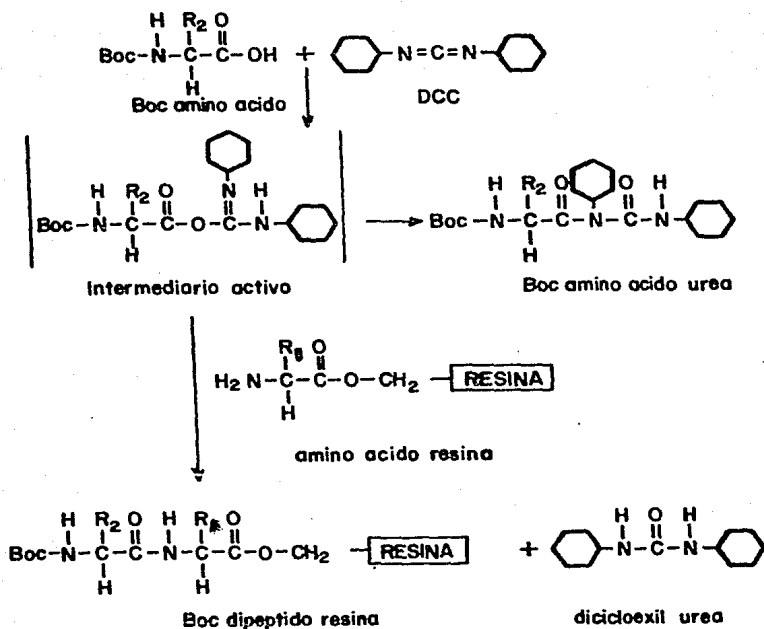


Fig 4. Esquema de la reacción química que se lleva a cabo para formar el enlace peptídico durante la síntesis química de péptidos. - R₁, cadena lateral del aminoácido 1; R₂, cadena lateral del aminoácido 2.

ácido fluorhídrico (HF) (Matheson-curtin gases) durante una hora a 0°C. Posteriormente, el HF se quitó con vacío y el remanente se trató con éter de petróleo (Merck) para extraer el anisol. El péptido se solubilizó en ácido acético al 1% en agua desionizada y se separó de la resina por filtración. Finalmente, el péptido se liofilizó y se guardó a 4°C hasta su utilización.

ANALISIS DE AMINOACIDOS

El análisis de aminoácidos del péptido sintetizado se llevó a cabo por cromatografía de alta presión (HPC) de intercambio iónico, como fue descrita por Stein y Moor (44,45). Para llevar a cabo este análisis, la muestra fue hidrolizada con ácido clorhídrico 6N a 110°C por 20 horas. Posteriormente se inyectó a la columna de intercambio iónico Durrum D-500 de 0.173 X 48 cm, la cual contenía resina Dowex 50.

La detección de cada uno de los aminoácidos eluidos se hizo con ninhidrina. La absorbancia del color desarrollado se midió a una longitud de onda de 454 nm. En el caso de la prolina, a 440 nm. Los valores obtenidos por este método fueron graficados y comparados con patrones para determinar el tipo y la cantidad de cada aminoácido contenido en la muestra.

ANALISIS DE PUREZA

La pureza del péptido sintetizado se determinó por medio de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de fase reversa. Este método se basa en la separación de las diferentes poblaciones de péptidos sintetizados (el esperado, más -- los posibles productos laterales de reacción), de acuerdo a -- su grado de hidrofiliidad e hidrofobicidad. Este análisis -- se llevó a cabo en una columna RP-18, utilizando como eluyente un gradiente de acetonitrilo de la siguiente forma (ver -- fig 5): durante los primeros 5 min se eluyó con acetonitrilo al 5% en agua; en los 45 min siguientes se aumentó gradualmente el acetonitrilo hasta alcanzar una concentración del 60%, donde permaneció durante los 5 min siguientes. Posteriormente la concentración de acetonitrilo descendió hasta 5% en los 10 min siguientes y permaneció a la misma concentración por -- 5 min, con lo cual finalizó la corrida de la columna. Todo -- el proceso se llevó a cabo a una temperatura de 40°C y con -- una velocidad de flujo de 1 ml/min.

Para poder detectar las diferentes muestras que iban saliendo de la columna, el eluido se siguió a una longitud de onda de 254 nm. Los valores aquí obtenidos se graficaron e -- indicaron varios picos que representaron las diferentes pobla -- ciones de péptidos presentes en la muestra.

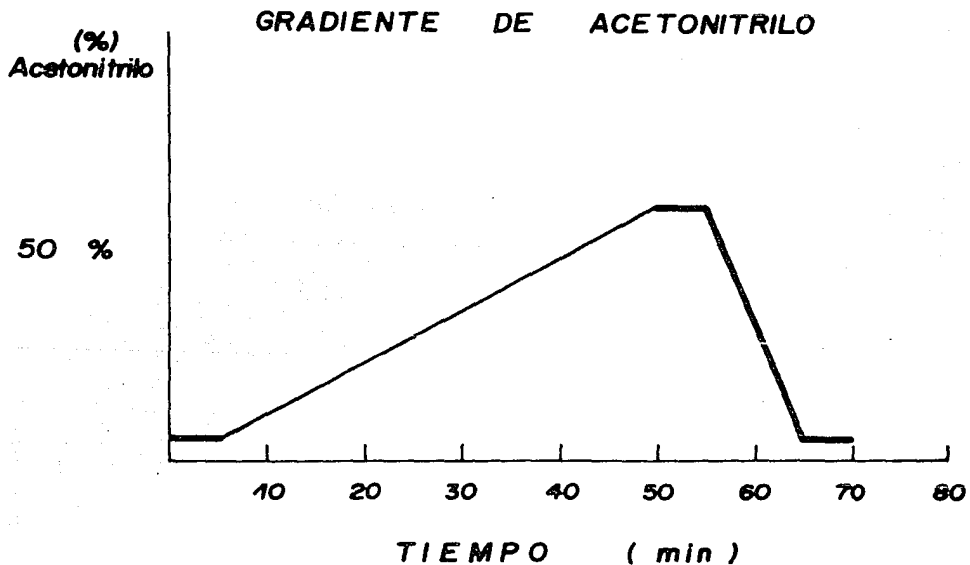


Fig 5. En esta figura se muestra el gradiente de acetonitrilo que fue empleado para correr la columna de HPLC. en fase reversa. Todo el proceso se llevó a cabo a una temperatura de 40°C y con una velocidad de flujo de 1ml/min.

Los picos obtenidos en la columna de fase reversa - fueron colectados por separado para poder identificar a nuestro péptido. Esta identificación se hizo determinando la com posición de aminoácidos para cada una de las muestras.

IODINACION DEL OLIGOPEPTIDO SINTETIZADO

Para aumentar la inmunogenicidad del oligopéptido - sintetizado, se acopló covalentemente a una proteína acarreadora. Para poder cuantificar este acoplamiento el oligopéptido se marcó con yodo radioactivo (^{125}I). La yodinación se -- llevó a cabo por el método descrito por Hunter y Greenwood - (46), el cual se basa en la unión del yodo al anillo aromático de los restos de tirosina, usando cloramina T como agente oxidante.

Se utilizaron 25 ul de solución amortiguadora de -- fosfato de potasio 0.5 M pH 6, conteniendo 25 ug de péptido; se agruparon 0.5 mCuries de ^{125}I y 10 ul de solución amortiguadora de fosfatos pH 7 con 25 ug de cloramina T. La mezcla se agitó fuertemente por 90 segundos y se agregaron 20 ul de solución de fosfatos pH 7 con 25 ug de tirosina. Se agitó -- fuertemente por 60 segundos. Finalmente se adicionó a la -- mezcla 10 ul de ditiotritol (DTT) 0.5 M y 500 ul de solución de fosfatos pH 6 con 5 mg de péptido. Posteriormente se agitó suavemente por 60 segundos y la mezcla de reacción se pasó

por una columna de Sephadex G-10 de 10 ml (previamente hidratada toda la noche en PBS). Una pequeña fracción del eluido de la columna (50 ul), se contó en un detector de radiaciones --gamma, y se calculó la radioactividad específica del péptido (se obtuvo aproximadamente un 20% de recuperación del péptido en todo el procedimiento). La muestra se guardó a -20°C hasta su utilización.

ACOPLAMIENTO DEL PEPTIDO A ALBUMINA SERICA BOVINA

El oligopéptido se acopló a albúmina sérica bovina (BSA) (Miles) utilizando una modificación del método descrito por Schinck y Singer (47). Como agente acoplante se empleó 2-4-diisocianato de tolueno (TC), que es un reactivo bifuncional con la capacidad de reaccionar con los grupos -amino libres tanto del péptido como de la proteína acarreadora.

A 2 ml de BSA (15 mg/ml) en PBS pH 7, se le añadieron 40 ul de TC y la mezcla se agitó durante dos horas a 0°C. Posteriormente, se centrifugó a 420 g por 20 min y el sobrenadante se incubó en hielo durante una hora. Después de esta incubación, a la mezcla de reacción se le agregó 850 ul de péptido (9 mg/ml en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 7) y 6×10^6 cpm de péptido yodado (actividad específica de 1.7×10^5 cpm/ug) y se incubó por 75 min a 37°C. Finalmen

te, la muestra se pasó por una columna de 10 ml de Sephadex -- G-75 de poro fino, equilibrada con PBS, para separar el péptido no acoplado del péptido acoplado a BSA. La columna se eluyó con PBS y se colectaron fracciones de 15 gotas cada una. - Se determinó la radioactividad presente en alícuotas de estas fracciones para saber donde se encontraba el péptido acoplado y estas se guardaron a 4°C hasta su utilización.

ESQUEMA DE INMUNIZACION

Con el fin de obtener anticuerpos contra el péptido sintetizado, se inmunizaron cuyos de 25 días de edad. Dos -- cuyos fueron inmunizados con 150 ug de péptido acoplado a BSA y dos con 150 ug de péptido sin acoplar. En todos los casos la primera inmunización se dió con adyuvante completo de -- Freund (48), administrando el inmunógeno por vía subcutánea en distintas regiones del lomo e intramuscularmente cerca de los ganglios linfáticos de las patas traseras. Los estímulos secundarios se dieron con adyuvante incompleto de Freund a intervalos de 15 días, por vía subcutánea, del mismo modo que - la primera inmunización e inoculando en cada caso 150 ug de - péptido acoplado a solo según el caso.

• Los cuyos se sangraron antes de empezar el esquema de inmunización (suero preinmune) y siete días después de ca-

da una de las inmunizaciones secundarias (sueros hiperinmunes). Después de 10 inmunizaciones los animales se sangraron a blanco.

La sangre obtenida de los animales se incubo primero una hora a temperatura ambiente, después dos horas a 4°C y por último se centrifugó a 250 xg durante 15 min. El suero se separó del coágulo y se alicuotó en fracciones de 0.5 ml. Se -- guardó a -20°C hasta su utilización.

DETERMINACION DE LOS ANTICUERPOS INDUCIDOS POR EL PEPTIDO

Los anticuerpos inducidos por el péptido fueron detectados por los métodos de doble inmunodifusión (DID), ensayo inmunoenzimático (ELISA), e inmunopunto.

DOBLE INMUNODIFUSION

Esta técnica consiste en hacer reaccionar en un medio semisólido de agar, a un antígeno con un anticuerpo. Las moléculas difunden radialmente en los pozos, formando una línea de precipitación en el punto de equivalencia en cada sistema antígeno-anticuerpo (AG-Ac) (49, 50).

Se utilizó agarosa al 1% en PBS pH 7. Se colocaron

20 ul del antígeno (30 ug/ul) en el pozo central y 20 ul de los sueros y sus diluciones correspondientes en los pozos de la periferia. Las placas se dejaron difundir durante 24 horas a temperatura ambiente y posteriormente se lavaron en solución salina isotónica para quitar el antígeno y anticuerpo que no hubieran reaccionado. Las placas se tiñeron con amido negro (Bio Rad) al 0.1% en ácido acético al 10% durante dos horas, y el exceso de colorante se quitó con ácido acético al 10%.

ENSAYO INMUNOENZIMATICO

La técnica de ELISA empleada para este ensayo, fue una modificación de las descritas por Tainer y col. (51) y por el Centro Colaborador de la OMS para Referencia e Investigación en Rotavirus (52). Consiste fundamentalmente en lo siguiente: cincuenta picomoles de péptido, en 10 ul de PBS, se añaden a cada uno de los pozos de una microplaca de titulación de 96 pozos (Dynatech, Immulon 2). Para fijar el péptido a la placa, ésta se incuba a 37°C por toda la noche sin taparla para secar los pozos. Una vez seca la placa se agregan a cada pozo 100 ul de metanol absoluto (Merck) y se incuba 5 min a temperatura ambiente. El metanol se retira y se enjuaga la placa con agua desionizada. Posteriormente, los sitios no ocupados por el péptido en los pozos, se bloquean con BSA al 3% en PBS/0.1% Tween 20 durante 4 horas a 37°C. Los pozos se

lavan con PBS/0.1% Tween 20, tres veces. Después del lavado, se agregan a cada pozo 100 ul de las diluciones correspondientes de cada uno de los sueros hiperinmunes a probarse y se incuban durante toda la noche a 37°C. La placa se lavó con PBS/0.1% Tween 20 tres veces, y se añade un segundo anticuerpo (anti-IgG de cuyo preparado en conejo, acoplado a fosfatasa alcalina) (Miles), diluido 1:400 en PBS y se incubó por dos horas a 37°C. La microplaca se lavó de la misma forma que la vez anterior y se agregó el sustrato de la fosfatasa alcalina (1 mg/ml de p-nitrofenil fosfato en 10% dietanol amina/0.1% - $MgCl_2$).

La reacción se detiene a los 10 min agregando 50 ul de NaOH 3M a cada pozo. Al ser modificado el sustrato con la fosfatasa alcalina, da una reacción colorida cuya intensidad se cuantificó a 410 nm. Los valores nos indican la cantidad de anticuerpo fosfatado unido a cada pozo, lo que a su vez refleja la cantidad de anticuerpos anti-peptido.

PROPAGACION Y PURIFICACION DE ROTAVIRUS SA11

En este trabajo se utilizó el rotavirus SA11 (Simian Agent 11), aislado por el Dr. H. H. Malherbe de la Universidad de Texas. Este virus se propagó en células de riñón de mono MA104, como se ha descrito previamente (12).

La purificación del virus se llevó a cabo de la siguiente manera: las células infectadas se extrañeron con triclorotrifluoroetano (freón) durante 30 min, con agitación fuerte, para romper las membranas celulares y poder liberar las partículas virales del interior de las células. Posteriormente, se centrifugó durante 30 min a $10,000 \times g$ a $4^{\circ}C$; la fase acuosa, donde está contenido el virus, se separó y se le agregó polietilén glicol al 50% hasta obtener una concentración final de 8%. La muestra se incubó toda la noche a $4^{\circ}C$ para precipitar los virus. Posteriormente, se centrifugó a $10,000 \times g$ por 20 min a $4^{\circ}C$ para bajar las partículas virales precipitadas. El sedimento se resuspendió en 0.3 ml de solución amortiguadora TSM (Trizma base 0.05 M, NaCl 0.15 M, $MgCl_2$ 0.01%, pH 8.4). La muestra resuspendida se puso sobre una solución de CsCl con una densidad de 1.36 g/cm^3 y se centrifugó hasta equilibrio ($180,000 \times g$ durante 18 horas).

Después de la centrifugación, la banda opalescente observada se colectó y se analizó su composición de proteína por electroforesis (56). El virus purificado se concentró por medio de ultracentrifugación a $180,000 \times g$ por dos horas a $4^{\circ}C$, y el botón se resuspendió en solución TM (Trizma base 0.05M, NaCl 0.15 M, pH 8.4) y se guardó a $4^{\circ}C$ hasta su utilización.

INMUNOPUNTO

Esta técnica se utilizó para determinar si los anticuerpos dirigidos contra el péptido eran capaces de reaccionar con el virus completo (53,54) y consiste fundamentalmente en lo siguiente: 100 ug de péptido ó 12 ug de virus SA11 como antígeno se aplican en una gota, sobre papel de nitrocelulosa (NC) (0.45 um Schleicher y Schuell), y las muestras se dejan secar. Una vez secos los papeles de NC, los sitios que no fueron ocupados por el antígeno se bloquean con solución TSGT (Tris HCl 10 mM, pH 4, NaCl 0.9%, Gelatina 3% y Tween 20 0.3%). Los papeles de NC se incuban a temperatura ambiente con agitación suave, durante 60 min, cambiando la solución -- cada min.

Los antígenos fijos al papel de NC se incuban con los sueros hiperinmunes diluidos 1:500 en TSGT. Posteriormente, los papeles se lavan tres veces a temperatura ambiente -- durante 15 min cada vez, con TSGT.

Para detectar los anticuerpos unidos al antígeno, los papeles de NC se incuban con 0.5 uCi/ml de proteína A-¹²⁵I (Amersham). El exceso de proteína A-¹²⁵I se lava tres veces por 15 min a temperatura ambiente con TSTG. Una vez lavados, los papeles se dejan secar sobre el filtro y se exponen a una placa fotográfica (Kodak X-Omat k) durante 20 hr a -70°C (55).

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA

Este método se utilizó para probar si los anticuerpos inducidos por el péptido eran capaces de reconocer a la proteína viral completa, de la cual el péptido fue copiado.

Primero las proteínas del virus se solubilizaron -- hirviendo la muestra durante 2 min en una solución de: trizma base 0.05 M, pH 6.8, dodecilsulfato de sodio (SDS) 2.5%, glicerol 10%, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.002 M, azul de bromofenol 1% y 2-mercaptoetanol (14.4 M). Las proteínas se separaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (EGPA 10%-SDS) de acuerdo al método de Laemmli. Posteriormente, las proteínas separadas se electrotransferieron a un filtro de NC durante dos horas con una corriente de 1A, a 4°C, como lo describe Tsang y col. (54) y Towbin H y col. (57). Después de la transferencia los papeles de NC se bloquearon con TSGT. Todos los pasos posteriores a este fueron los mismos descritos anteriormente para la técnica de inmunopunto.

EFEECTO DEL PEPTIDO SOBRE LA INFECTIVIDAD VIRAL

Para estudiar la capacidad del péptido sintetizado para inhibir la infectividad del virus SA11, se empleó la técnica de reducción de focos de inmunoperoxidasa (58).

El péptido se incuba con una monocapa de células -- MA104 por una hora a 37°C. Posteriormente, se agrega un volumen de virus a una dilución a la cual se sabe que infecta de 70 a 80 células (focos infecciosos) en ausencia del péptido. El virus en presencia del péptido se deja adsorber a la monocapa durante una hora a 37°C. Después de este tiempo la monocapa celular se lava dos veces con PBS para quitar el exceso de virus y péptido. Después de añadir medio a las células -- se incuban a 37°C durante 12 horas para dar oportunidad a que el virus se replique en el interior de las células infectadas. A las 12 horas postinfección, las células se lavan dos veces con PBS y se fijan a las microplacas con acetona al 80% en -- PBS durante 20 min. Posteriormente, las células se incuban -- con suero hiperinmune anti-SA11 para detectar aquellas células que tienen antígeno viral en su interior. La monocapa celular se lava dos veces con PBS para quitar el exceso de anticuerpos que no reaccionaron y aquellas células que tienen los complejos AG-Ac se revelan por incubación con proteína A-peroxidasa (2 horas a 37°C) y subsecuente adición del sustrato de la peroxidasa (carbazol 4 mg/ml en una solución de 1.5 ml de dimetil formamida, 4.0 ml de solución amortiguadora de acetatos 0.05 M pH 5.0 y 10 ul de peróxido de hidrógeno al 30%). -- Este sustrato cuando es modificado por la enzima se torna colorido y se precipita en el sitio de reacción. Estas células con el sustrato precipitado en su interior pueden ser fácilmente detectadas y cuantificadas con un microscopio invertido

de contraste de fase.

EFFECTO DEL SUERO ANTI-PEPTIDO EN LA INFECTIVIDAD VIRAL

Una cantidad conocida de partículas infecciosas del rotavirus de simio SA11 se incubaba con diferentes diluciones - del suero anti-peptido durante una hora a 37°C. Esta mezcla de virus suero-antipeptido se utiliza para infectar una monocapa de células MA104, y el número de células infectadas se - cuantifica por el método de reducción de focos de inmunoperoxidasa descrito anteriormente. Si el suero tiene actividad neutralizante el número de focos infecciosos se verá reducido en relación a un control de virus el cual no fue incubado con el suero.

RESULTADOS.

CRITERIOS PARA LA ELECCION DE PEPTIDOS

Se emplearon tres criterios diferentes para elegir la región de la proteína VP7 que se sintetizó.

1. Se eligió una región de VP7 que fuera altamente hidrofílica, con el objeto de tener una mayor probabilidad de que esta región estuviera expuesta en la superficie de la molécula y por lo tanto, disponible para la interacción con los anticuerpos.

La identificación de esta zona hidrofílica se hizo en base a la curva de hidropatía de la secuencia primaria de VP7 (59), de acuerdo al programa de computación de Hoop y Woods (60) (fig 6).

2. Es una región que no contiene argininas ni lisisnas, en la región intermedia del péptido. Este criterio fue considerado, ya que cuando el virión purificado es tratado -- con tripsina [enzima proteolítica que corta en lisisnas y argininas], la proteína VP7 no sufre ningún corte (3,4). Esto sugiere que dichos aminoácidos de VP7 no están expuestos en la superficie del virus o están poco accesibles, y por lo tanto, es poco probable que puedan formar parte de un determinante - antigénico de superficie.

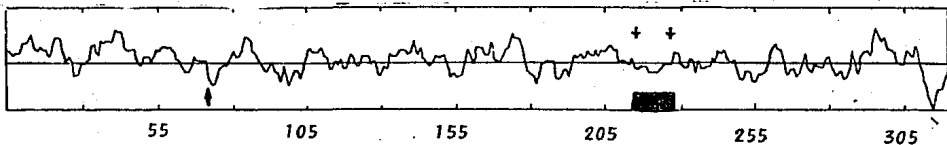


Fig 6. Perfil hidrofílico de la proteína VP7 del rotavirus SA11 (Tomado de la referencia 59). El grado de hidrofobicidad aumenta de la línea media hacia abajo; el grado de hidrofobicidad, de la línea media hacia arriba. La franja negra () señala la región de VP7 que se sintetizó químicamente. La flecha negra que se encuentra entre los aminoácidos 55 y 105, señala el sitio de glicosilación de la proteína.

3. Es una zona poco conservada con respecto a la secuencia de aminoácidos de proteínas homólogas obtenidas de rotavirus pertenecientes a diferentes serotipos. Este criterio fué considerado debido a que VP7 es la proteína que confiere la especificidad de serotipo (61), y los anticuerpos neutralizantes dirigidos contra un serotipo no neutralizan a rotavirus pertenecientes a serotipos distintos. Por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de aquellas zonas donde pudieran localizarse los epítopes de neutralización deberían tener cambios no conservativos con respecto a las proteínas homólogas de rotavirus de diferentes serotipos. Las secuencias de VP7 que se compararon fueron las obtenidas de los rotavirus - Wa (serotipo 1) (62); Hu/5 (serotipo 2) (63); UK (serotipo 6) (64); SA11 (serotipo 3) (59,65); y NCDV (serotipo 6) (66) -- (fig 7).

En base a los tres criterios antes discutidos, se -- eligió la región de VP7 comprendida entre los aminoácidos -- 211-223. La secuencia de esta región es la siguiente:

NH₂

COOH

*-Tyr-Asp-Ala-Thr-Thr-Phe-Glu-Glu-Val-Pro-Thr-Ala-Glu-Lys,

211

223

La tirosina que se encuentra en el extremo NH₂ no pertenece a la secuencia original de la proteína VP7. Este --

MYGIEYTVLTLFLISIIILLNYILKSLTRIHDCIIYRLFFIIVILSPFLRAQNYGINLPITGSMETAYANSTQEEETFLTST	SALL
I I T T I M Y F L V A T I I H V D S P	NCDV
I I T T I Y F L V A T M L N V S P	UK
I I V Y F L T A F A L T L A V T V	WA
I I T I N T Y F F L L A L I V T M Y L A V T S G P	HU/5
I I T I Y F F L L A L I V T M Y L A V T S G P	S2
LCLYYPTEAATEINDNSMKOTLSQLFLTKGMPTGSGYFKEYTNIASFSDPGLYCDYMWMLMKTDATLQLDMSELADLLIL	SALL
V S N A T E L A D A E L S G E	NCDV
V S N A T E D A E L S G E	UK
S Q G D S M S V D L G S E	WA
A K N S D E E N I D N D N T N R N S E A	HU/5
A K N S D E E N D N D T T M R N S E V	S2
NEWLGNPFDITLTYQQGTDEANKWISMGSSCTIKVCPINTGTLGIGCLTATTFEEVPTAEKLVITDWDVGNHKLIDLT	SALL
T V I N P D T M N V	NCDV
V I N P D T T N V	UK
V Q N V D M I E N A V I I N L	WA
S S S S T D V K V N I S S N N I N I S	HU/5
S S S S T D V K I V D I S S N N I N I S	S2
TATCTIRNCKKLGPRENWAIVIGVGGSDIILDIADPTTAPQTER*HRIINMKKMGVFYTWDDQIIGMSKRSRSLNSA	SALL
AWW T N T S	NCDV
I AWW N T T S	UK
T N I AWV N V I I N V I DA	WA
I N I PVA N V Q I V I N V I DA	HU/5
I N I PVA N V Q I V I N V I DT	S2
AFYRV	SALL
I	NCDV
I	WA
	HU/5
	S2

Fig 7. Secuencias de aminoácidos de las proteínas VP7 de de los siguientes rotavirus: SALL(serotipo 3); NCDV(serotipo 6); UK(serotipo 6); Wa(serotipo 1); Hu/5(serotipo 2); S₂(serotipo2). La región marcada con asteriscos y delimitada con dos flechas representa el péptido sintetizado. El código para los aminoácidos de una letra es: A, Ala; C, Cys; D, Asp; E, Glu; F, Phe; G, Gly; H, His; I, Ile; K, Lys; L, Leu; M, Met; N, Asn; P, Pro; Q, Gln; R, Arg; S, Ser; T, Thr; V, Val; W, Trp; Y Tyr.

aminoácido fue agregado a dicha secuencia para poder marcar - radioactivamente el péptido por el método antes descrito (46) y facilitar el seguimiento de éste en ensayos posteriores.

SINTESIS QUIMICA Y ANALISIS DEL PEPTIDO VP7₂₁₁₋₂₂₃

La síntesis química se llevó a cabo por la técnica en fase sólida de Merrifield, tal como se describió en Materiales y Métodos. Después de finalizada la síntesis del péptido VP7₂₁₁₋₂₂₃, éste se separó de la resina soporte, mediante hidrólisis con HF. Al finalizar este último paso el oligopéptido se obtuvo con un rendimiento del 59% (este rendimiento fue calculado considerando la cantidad esperada teóricamente en base al número de miliequivalentes que contenía la resina empleada para iniciar la síntesis, y el valor obtenido al final de dicho proceso).

Para probar si el péptido sintetizado tenía la composición deseada se hizo un análisis de aminoácidos de una fracción del mismo. En la tabla 1 se muestran estos resultados, donde se puede observar que la composición de aminoácidos encontrada para el péptido VP7₂₁₁₋₂₂₃ coincide con la esperada, lo que indica que muy probablemente el péptido obtenido tiene la secuencia correcta. Para poder detectar si el producto sintetizado estaba representado por una sola población -

TABLA 1. COMPOSICION DE AMINOACIDOS DEL
 PEPTIDO VP7²¹¹⁻²²³

AMINOACIDO	VALOR ESPERADO	VALOR OBTENIDO
Asp	1.0	0.98
Thr	3.0	2.62
Glu	3.0	2.79
Pro	1.0	0.60
Ala	2.0	2.30
Val	1.0	0.91
Tyr	1.0	1.02
Phe	1.0	1.09
Lys	1.0	1.24

de péptidos o si tenia contaminaciones con poblaciones formadas por productos secundarios de reacción durante el proceso de síntesis, se analizó una alícuota a través de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de fase reversa. En la figura 8 se muestra el cromatograma obtenido, donde se puede apreciar la presencia de al menos seis diferentes picos, que pudieran representar poblaciones diferentes de péptidos. Uno de estos picos; el número tres, representa la mayor parte del material analizado. Para investigar cual de estos picos tenia la composición de aminoácidos esperada, cada uno de ellos se recuperó individualmente en una corrida preparativa del HPLC y se les determinó su composición de aminoácidos. Los resultados de este análisis se encuentran en la tabla 2, donde podemos observar que los picos 1 y 2 corresponden a la secuencia esperada, mientras que los picos 4, 5 y 6 tienen una prolina y una tirosina de más y una prolina de menos respectivamente. Desafortunadamente, el análisis de aminoácidos del pico 3 no se pudo obtener debido a que se sobrecargó el analizador de aminoácidos con la muestra. Sin embargo, tomando en consideración que la mezcla total del péptido VP7₂₁₁₋₂₂₃ tiene la composición de aminoácidos esperada (ver tabla 1), y que el pico 3 es el que representa la mayor parte de la muestra analizada, asumimos que este pico representa el producto principal de la síntesis, con la secuencia y composición adecuada.

Con los resultados mencionados anteriormente se consi

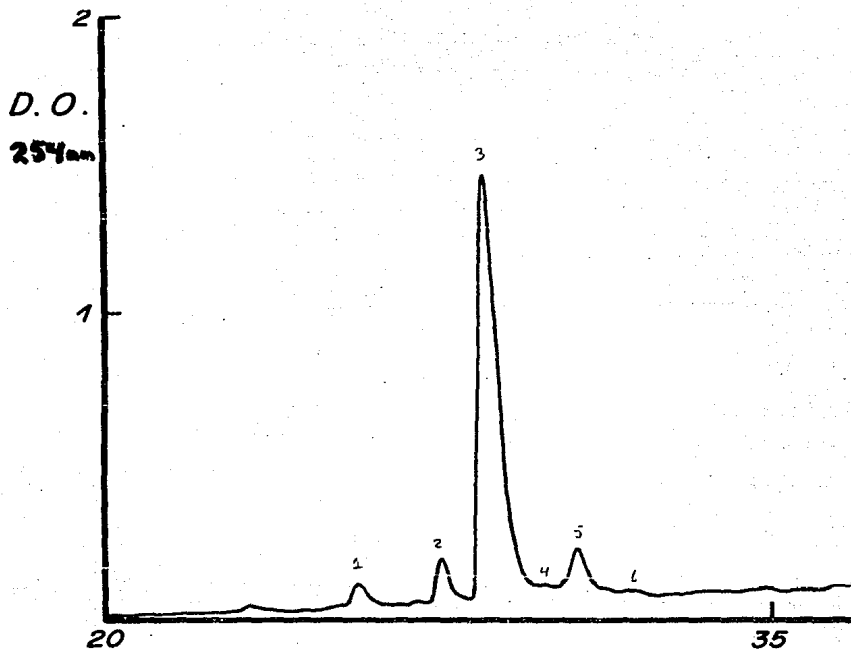


Fig 8. cromatograma obtenido de la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) en fase reversa del péptido VP7₂₁₁₋₂₂₃.

TABLA 2. COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE CADA UNO DE
 LOS PICOS OBTENIDOS POR HPLC EN FASE REVERSA DEL
 PEPTIDO VP7₂₁₁₋₂₂₃.

AMINOACIDO	VALOR ESPERADO	VALORES OBTENIDOS					
		1	2	3	4	5	6
Asp	1	1.08	0.99	----	1.00	1.26	1.10
Thr	3	3.26	3.09	----	2.93	3.60	3.10
Glu	3	2.97	2.96	----	2.68	2.70	2.80
Pro	1	0.65	0.65	----	1.15	0.80	0.30
Ala	2	2.22	2.17	----	2.16	2.20	2.20
Val	1	0.83	0.97	----	1.04	****	1.01
Tyr	1	0.85	0.99	----	0.98	0.70	****
Phe	1	0.93	1.01	----	0.96	0.63	1.03
Lys	1	1.21	1.17	----	1.22	1.30	1.20

---- no se determinó

**** no se detectó.

dero innecesario purificar el péptido VP7₂₁₁₋₂₂₃, ya que tomando en cuenta que lo que se pretende es producir anticuerpos que reaccionen contra la proteína completa, la inmunización con este producto mixto que, como asumimos, contiene en mayor proporción el péptido deseado no afectaría la respuesta inmune en contra del péptido de interés.

DOBLE INMUNODIFUSION

Como primer intento para detectar los anticuerpos que pudieran haber sido indicados por el péptido se utilizó la técnica de doble inmunodifusión. Para este ensayo además de los sueros preinmunes, se utilizaron los sueros hiperinmunes obtenidos a las 4^a y 6^a semanas de inmunización. Estos sueros se hicieron reaccionar con el péptido sólo; con el péptido acoplado a BSA; y con BSA sola como control negativo.

Como se puede observar en la figura 9, cuando se probaron los sueros obtenidos con los cuyos C y D (inmunizados con péptido sólo), se detectaron bandas de precipitación (complejo Ag-Ac) hasta una dilución 1:4 del suero hiperinmune. Sin embargo, de los sueros obtenidos de los cuyos inmunizados con péptido acoplado (cuyos A y B) no se obtuvieron resultados positivos. Los cuyos C y D, no dieron reacción positiva en contra de BSA (datos no mostrados), lo cual indica que la --

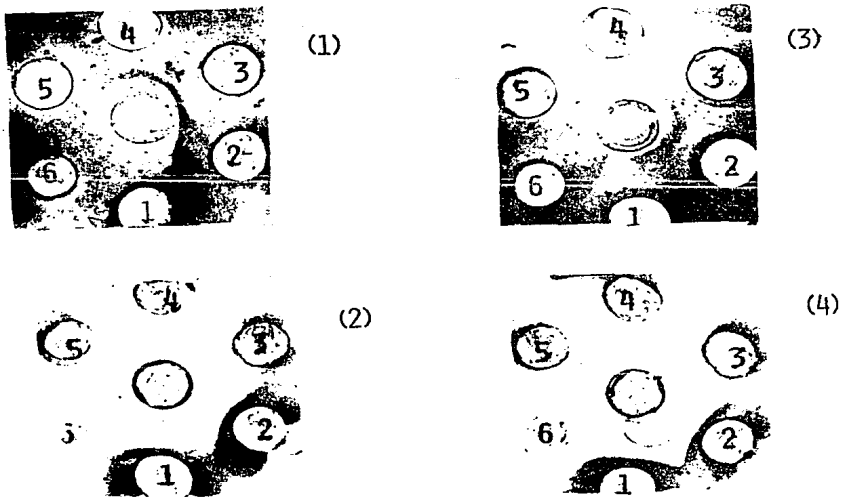


Fig 9. Ensayo de doble inmunodifusión para los sueros obtenidos de la sexta semana de iniciado el protocolo de inmunización de los cuyos C y D (inoculados con péptido solo). En los pozos numerados del 1 al 5 se puso el suero hiperinmune correspondiente, iniciando con el suero sin diluir en el pozo 1, y haciendo diluciones seriadas 1:2 hasta el pozo 5. Al pozo 6 se le añadió suero preinmune sin diluir, del cuyo correspondiente. En el pozo central se puso el péptido, ya sea solo (placas 1 y 3) o acoplado a BSA (placas 2 y 4). El suero del cuyo D se empleó en las placas 1 y 2 y el del C, en las placas 3 y 4.

reacción observada en contra del péptido acoplado a BSA es específica del péptido.

Para comprobar los resultados obtenidos con el ensayo de doble inmunodifusión, y considerando que la sensibilidad de esta técnica no es muy alta, se consideró probar los sueros anti-péptido por ELISA, ensayo inmunoenzimático de mayor sensibilidad.

ENSAYO INMUNOENZIMATICO

En los resultados obtenidos en este ensayo de ELISA (ver figura 10) se puede apreciar una mayor y más rápida producción de anticuerpos anti-péptido en los que los cuyos C y D (inmunizados con péptido solo) que para los cuyos A y B -- (inmunizados con péptido acoplado a BSA), lo cual concuerda con los resultados obtenidos anteriormente. Sin embargo, aun que en menor grado, los cuyos A y B también respondieron en contra del antígeno.

INTERACCION DE LOS ANTICUERPOS ANTI-PEPTIDO CON LA PROTEINA VIRAL VP7

Una vez que se detectaron anticuerpos en contra del péptido, probamos si estos anticuerpos tenían la capacidad de

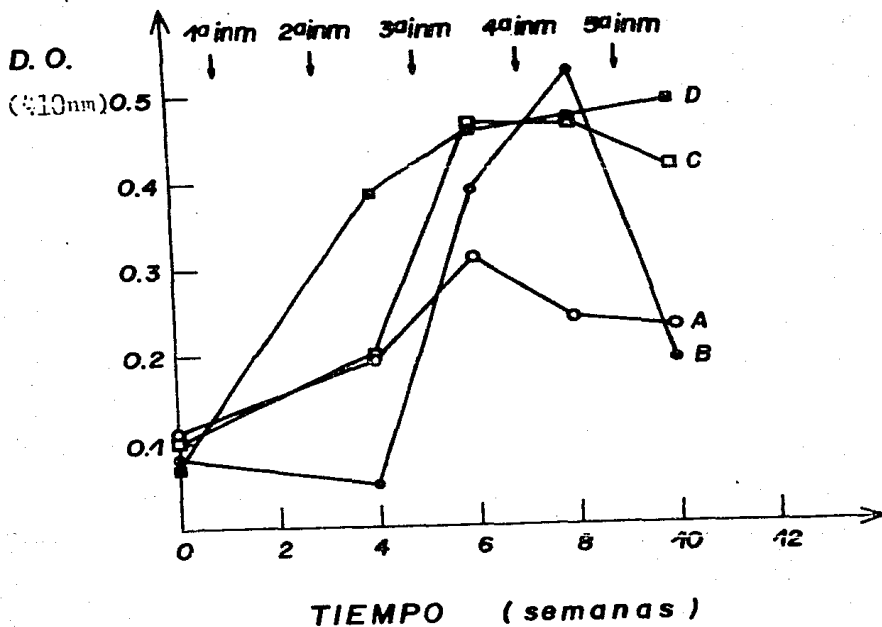


Fig 10. Ensayo inmunoenzimático (ELISA) de los suero obtenidos de los diferentes cuyos inmunizados. Cuyos A y B inmunizados con péptido acoplado a BSA, y cuyos C y D, inmunizados con péptido solo.

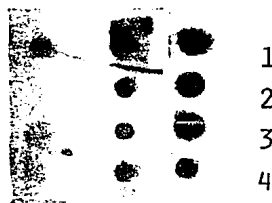
reaccionar con la proteína VP7 que se encuentra ensamblada en las partículas virales completas. Para ello se utilizó la técnica de inmunopunto, en la cual el antígeno se fija a una matriz (NC) y posteriormente se hace reaccionar con los sueros correspondientes. En los resultados obtenidos (figura 11) se puede observar que los sueros hiperinmunes de los diferentes cuyos (se muestran solo los resultados obtenidos con los cuyos A y D) reaccionaron tanto con el péptido como con el virus SA11. Es importante hacer notar que la señal es aún más intensa cuando el virus fue tratado con 2-mercaptoetanol y SDS (condiciones desnaturalizantes para las proteínas del virus), que cuando el virus permanece intacto o es tratado con EDTA (tratamiento que separa la capa externa del virus, pero no desnaturaliza las proteínas). Al analizar nuestro control positivo (un antisuero dirigido en contra del virus completo) se obtiene una fuerte reacción en contra del virus sin tratar (partículas completas) y tratado con EDTA, mientras que la reacción en contra del virus tratado con 2-mercaptoetanol y SDS es mucho menor, al igual que la observada en contra del péptido. Estos resultados sugieren que los anticuerpos en contra del péptido pueden estar reconociendo a la proteína viral de la cual fue copiada su secuencia, pero solo en su forma desnaturalizada, y que estos anticuerpos parecen reconocer en menor grado a la proteína en su forma nativa.

Para probar si los anticuerpos antipéptido estaban

SUERO ANTI-PEPTIDO
CUYO A



SUERO ANTI-PEPTIDO
CUYO D.



SUERO ANTI-SA11.

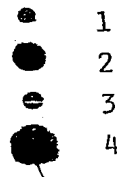


Fig 11. Ensayo de inmunopunto. Los sueros de los cuyos A y D, se utilizaron con una dilución 1:500, mientras que el suero anti-SA11 se utilizó a una dilución 1:2000. 1, 100 ug de péptido VP7₂₁₁₋₂₂₃; 2, 12 ug de virus SA11; 3, 12 ug de virus SA11 tratado con 1% de 2-mercaptoetanol y 2.5% de SDS; 4, 12 ug de virus SA11 tratado con EDTA 0.05 M.

reconociendo específicamente a la proteína viral VP7, como lo sugieren los resultados del ensayo anterior, se hizo una electrotransferencia a nitrocelulosa de las proteínas virales separadas por electroforesis y estas proteínas se reaccionaron con los sueros correspondientes. Los resultados así obtenidos (figura 12) muestran que tanto los sueros preinmunes como los hiperinmunes reaccionaron con las proteínas VP2 y VP6, que son las más abundantes del virus, lo cual sugiere que estos animales habían sido infectados con rotavirus antes del inicio del experimento (solo se muestran los resultados obtenidos para el cuyo B).

Finalmente, decidimos probar si los sueros de estos animales eran capaces de neutralizar la infección del rotavirus SA11 en un sistema in vitro. Para esto llevamos a cabo el ensayo de neutralización de focos infecciosos descrita en Materiales y Métodos. Con este ensayo de neutralización no pudimos detectar la actividad neutralizante ni en los preinmunes ni en sueros hiperinmunes. Esto nos indica que el rotavirus que infectó a cuyos utilizados en nuestro esquema de inmunización pertenecía a un serotipo distinto al del rotavirus SA11. Por otro lado queda claro que los anticuerpos en contra del péptido tampoco tienen actividad neutralizante contra SA11.

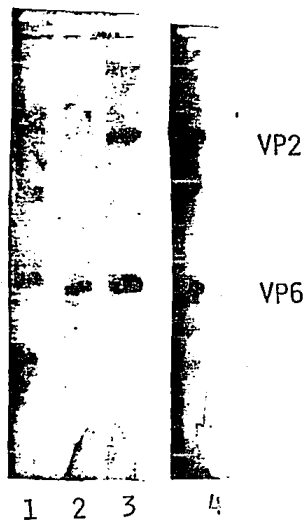


Fig 12. Ensayo de inmunoelectrotransferencia. Las proteínas del rotavirus SA11 se separaron por electroforésis y después se transfirieron a filtros de nitrocelulosa. Posteriormente los filtros se incubaron con suero preinmune (carril 1), suero de la 8^a semana (carril 2) y suero de la 14^a semana (carril 3) del cuyo B. Las proteínas virales en el carril 4 se incubaron con el suero hiperinmune anti-SA11. Los complejos Ag-Ac se detectaron por incubación con proteína A¹²⁵I y posterior exposición a una placa fotográfica.

DISCUSSION.

En este trabajo se reporta la síntesis y caracterización de un oligopéptido que contiene la secuencia de un posible epítotope de neutralización de la proteína VP7 del rotavirus de simio SA11.

La pureza del péptido sintetizado se analizó por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de fase reversa. Con este método, el péptido obtenido se separó en seis diferentes poblaciones. Los resultados del análisis de aminoácidos de los picos 1 y 2 concuerdan con la composición de aminoácidos del péptido esperado. Esto sugiere que ambas poblaciones de péptidos pudieran tener la secuencia deseada. La razón por la cual migran diferente en el HPLC puede ser por la presencia de algunos grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos, los cuales hayan permanecido en el péptido aún después del paso final de desprotección con HF. Al analizar la composición de aminoácidos obtenida para los picos 4, 5 y 6 podemos concluir que estos contienen péptidos que se apartan de la composición y por lo tanto de la secuencia esperada.

La composición de aminoácidos del pico número tres no fue posible determinarla, ya que el analizador de aminoácidos se sobrecargó y los resultados no se pudieron cuantificar. Sin embargo, considerando que el análisis hecho a la totalidad de la muestra corresponde a la composición esperada (ta-

bla 1), y que el pico tres representa la mayor proporción de la muestra, la composición de aminoácidos de la muestra total debe representar de manera indirecta, la composición del pico tres.

Con los resultados hasta aquí obtenidos se consideró innecesario purificar el péptido y se procedió a inmunizar animales para obtener anticuerpos en contra de éste. Los resultados de las técnicas utilizadas para la detección de anticuerpos anti-péptido (DID, ELISA) nos indican que estos anticuerpos fueron inducidos más eficientemente en los animales - inmunizados con péptido solo (ver fig 10) que en aquellos inmunizados con péptido acoplado (cuyos A y B). La explicación para este hecho no es muy clara ya que en la mayoría de los casos reportados, los resultados no muestran diferencias significativas en el título. En aquellos en que sí se encuentran diferencias, el título más alto es el obtenido para aquellos animales inmunizados con el péptido acoplado. Una posible explicación para estos resultados pudiera ser el hecho de que el acoplamiento del péptido a BSA hubiera restringido en él la posibilidad de adoptar conformaciones más inmunogénicas, las cuales estuvieran presentes en el péptido libre. Otra posibilidad es que la diferencia pudiera ser debida a la respuesta individual de los animales empleados, o a la presentación y accesibilidad del péptido al sistema inmune.

Una vez que se detectó la presencia de anticuerpos en contra del péptido se procedió a determinar la capacidad de dichos anticuerpos para reaccionar en contra de la proteína viral de la cual fue copiada la secuencia. Esto se llevó a cabo por medio de los ensayos de inmunopunto e inmunoelectrotransferencia, en los cuales se hizo difícil la determinación de este reconocimiento ya que se detectaron anticuerpos en -- contra del virus completo, tanto en los sueros preinmunes, -- como en los sueros hiperinmunes (fig 12). Finalmente, los -- resultados negativos obtenidos en los ensayos de neutralización nos indican que los anticuerpos dirigidos en contra del péptido no son capaces de neutralizar el efecto del virus, y además, que los anticuerpos totales detectados en los sueros preinmunes e hiperinmunes de los cuyos utilizados fueron inducidos por infección de los animales con rotavirus pertenecientes a un serotipo distinto del que fue utilizado en este estudio (serotipo 3).

Por otro lado, durante la elaboración de este trabajo, Holmes y col. (67) reportaron el aislamiento de variantes del rotavirus SA11, los cuales eran resistentes a la neutralización por anticuerpos monoclonales neutralizantes dirigidos contra la proteína VP7. En estas variantes se secuenció la proteína VP7 para detectar en que región o regiones se encontraban los cambios producidos. En las variantes analizadas se encontraron tres aminoácidos cambiados en relación a las -

secuencias de VP7 del virus silvestre. Dos de estos cambios estuvieron localizados en la región de la cual se copió el -- oligopéptido sintetizado por nosotros (posiciones 211 y 223). Más tarde apareció en la literatura un trabajo realizado por Bellamy col. (68), en el cual sintetizaron algunos péptidos -- derivados de la secuencia de la proteína VP7 del rotavirus de simio SA11. Uno de los péptidos que sintetizaron abarcó del aminoácido 208 al 225, por lo tanto, este péptido contiene la secuencia del péptido sintetizado por nosotros, con tre aminoácidos más en el extremo amino y dos en el extremo carboxilo. En su estudio los anticuerpos producidos contra dicho -- péptido no neutralizaron al virus.

Los resultados obtenidos por Holmes y col. sugieren que la región contenida en nuestro péptido podría representar un determinante antigénico de neutralización. Sin embargo, -- tomando en cuenta nuestros resultados, así como los resultados obtenidos por Bellamy y col., dicho determinante antigénico muy probablemente sería estructural y no lineal.

BIBLIOGRAFIA.

1. WARREN S.K. 1985. *Great Neglected Diseases of the Developing World and Their Possible Control by vaccination*. In: Lerner et al., eds. *Vaccines 85*. N.Y. Cold Spring Harbor Laboratories. 373-376.
2. KAPIKIAN A.Z., Wyatt R.G., Doling R., Thornhill T.S., Kalica A.R. y Chanock R.M. 1972. *Visualization by immune electron microscopy of a 27 nm particle associated with acute infectious non-bacterial gastroenteritis*. *J. Virol.* 10: 1075-1082.
3. KAPLAN J.E., y Gary, G.W., Baron R.C., Singh N., Schonberger L.B., Feldman R. y Greenberg H.B. 1982. *Epidemiology of Norwalk virus in outbreaks of acute non-bacterial gastroenteritis*. *Ann. Intern. Med.* 96: 756-762.
4. KAPIKIAN A.Z. y Chanock R.M. 1985. *Norwalk group of viruses: agents associated with epidemic viral gastroenteritis*. In: Fields B.N., et al., eds. *Virology*. New York: Raven Press, 1495-1518.
5. BISHOP R.F., Davidson G.P., Holmes I.H. y Ruck B.J. 1974. *Detection of a new virus by electron microscopy of fetal extracts from children with acute gastroenteritis*. *Lancet.* 1: 149-151.

6. FLEWET H., Bryden A.S. y Davies H. 1973. *Virus particles in gastroenteritis*. *Lancet* 2: 1487.
7. JONES R.C., Hughes C.S. y Henry R.R. 1979. *Rotavirus infection in commercial laying hens*. *Vet. Rec.* 104: 22.
8. SNODGRASS D.R., Smith W., Gray E.W. y Herring J.A. 1976. *A rotavirus in lamb with diarrhea*. *Res. Vet. Sci.* 20: 113-114.
9. MELBUS C.A., Kno M., Underdahl N.R. y Twiehaus M.S. 1971. *Cell culture propagation of neonatal calf diarrhea (scours) virus*. *Can. Vet. J.* 12: 69-72.
10. McNULTY M.S., Pearson G.R., McFerran J.B., Collins D.S. y Allan G.M. 1976. *A reovirus like agent (rotavirus) associated with diarrhea in neonatal pigs*. *Vet. Microbiol.* 1: 55-63.
11. MUCH y Zajac I. 1971. *Purification and characterization of epizootic diarrhea of infant mice virus infections*. *Immun.* 6: 1019-1024.
12. MALHERBE H.H. y Strickland Cholmey M. 1967. *Simian virus SA11 and the related "O" agent*. *Arch. Gesmte Virus Forsch.* 22: 235-245.
13. BRYDEN A.S., Advies H.A., Hadley R.E., Fleweh T.H., Morris C.A. y Oliver P. 1975. *Rotavirus enteritis in the West Midland during 1974*. *Lancet* 2: 241-243.

14. FLEWETT T.H., Mryden A.S., Davies H., Woode G.N., Bridger J.C. y Derrick J.M. 1974. Relation between virus from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *Lancet* 2: 61-63.
15. RUIZ GOMEZ J., Alvarez M.T., Silva Acosta C., Espejo, R.T., Games J., Palacios J. y Juarez G. 1981. Rotavirus II: virus relacionados con la gastroenteritis aguda en el niño. *Arch. Invest. Med.* 12: 133-140.
16. KAPIKIAN A.Z. y Chanock R.M. 1985. Rotavirus. In: Fields B.N. et al., eds. *Virology*. New York Raven Press, 863-906.
17. SMITH M.L., Lazdins L. y Holmes T.H. 1980. Coding assignments of double stranded RNA segments of SA11 rotavirus established by in vitro translation. *J. Virol.* 33: 976-982.
18. ARTIAS C., Lopez S. y Espejo R. 1982. Gene protein products of SA11 simian rotavirus genome. *J. Virol.* 41: 42-50.
19. KALICA A.R., Greenberg H.B., Wyatt R.G., Flores S., Sereno M.M., Kapiklan A.Z., y Chanock R.M. 1982. Genes of human (strain Wa) and bovine (strain UK) rotavirus that code for neutralization and subgroup antigens. *Virology* 112: 385-390.

20. ESTES M.K., Graham D.V. y Mason B.B. 1981. Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: Molecular mechanisms. *J. Virol.* 39: 879-888.
21. ESPEJO R.T., Lopez S. y Arias C.F. 1982. Structural polypeptides of Simian Rotavirus SA11 and the effect of trypsin. *J. Virol.* 37: 156-160.
22. SONZA S., Breschkin A.M. y Holmes I.H. 1984. The mayor surface glycoprotein of Simian Rotavirus (SA11) contains distinct epitopes. *Virology.* 134: 318-327.
23. GREENBERG H.B., Wyatt R.G., Kapikian A.Z., Kalica A.R., Flores J. y Jones R. 1982. Rescue and Serotypic gene reassortment. *Infect. Immun.* 37: 104-109.
24. OFFIT P.A., Shaw R. y Greenberg H.B. 1986. Passive protection against rotavirus induced diarrhea by monoclonal antibodies to surface proteins VP3 and VP7. *J. Virol.* 58: 700-703.
25. MEBUS C.A. y Newman L.E. 1977. Scanning electron microscopy of intestine of gnotobiotic calf infected with reovirus like agent. *Am. J. Vet. Res.* 38: 553.
26. THEIL K.W., Bohl E.H., Cross R.F., Kohler E.M. y Agnes A.G. 1978. Pathogenesis of porcine rotaviral infection in experimentally inoculated gnotobiotic pigs. *Am. J. Vet. Res.* 39: 223-220.

27. DAVIDSON G.P. y Barnes G.L. 1979. *Structural and functional abnormalities of the small intestine in infants and young children with rotavirus enteritis.* Acta Paediatr. Scand. 68: 181.
28. McLEAN B., y Holmes I.H. 1982. *Effect of antibodies, trypsin, and trypsin inhibitors on susceptibility of neonates to rotavirus infection.* J. Clin. Microbiol. 13: 22.
29. McNULTY M.S. 1978. *Rotaviruses.* J. Gen. Virol. 40: 1.
30. OFFIT P.A., y Clark H.F. 1985. *Maternal antibody-newborn mice is dependent on both serotype and titer of antibody.* The J. of Infect. Dis. 12: 1152-1158.
31. COHEN J. 1977. *Ribonucleic acid polymerase activity associated with purified calf rotavirus.* J. Gen. Virol. 36: 395-402.
32. HOLMES K. y Blow D. M. 1984. *The use of X ray diffraction in the study of protein and nucleic acid structure.* Methods of Biochem. Anal. 13: 113-239.
33. DIAMOND D.C., Jameson B.A., Emini E.A., y Wimmer E. 1985. *Antibody resistant variants of poliovirus type 1.* In: Lerner *et al.*, eds. Vaccines 85. N.Y. Cold Spring Harbor Laboratories. 241-247.

34. NUNBERG J.H., Gilbert H., Rodgers G., Snead R.M., y Nitecki D.E. 1985. Localization of a determinant of virus neutralization on feline leukemia virus envelope protein gp70. In: Lerner *et al.*, Vaccines 85. N.Y. Cold Spring Harbor Laboratories 221-234.
35. BARON H.M. y Baltimore D. 1982. Antibodies against a synthetic peptide of the Poliovirus replicase protein: Reaction with native virus-encoded proteins and inhibition of virus specific polymerase activities *in vitro*. J. Virol. 43: 969-978.
36. BITTLE L.S., Houghten A.R., Alexander H., Shinnick T.M., Sutcliffe G., Lerner A.R., Rowlands D.S. y Brown F. 1982. Protection against foot and mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleic sequence. Nature 298: 30-33.
37. LERNER R.A., Green N., Alexander H., Lui F.T., Sutcliffe, y Shinnick T.M. 1982. Chemically synthesized peptides predicted from the nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome elicit antibodies relative with the native envelope protein of Dane particles. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 3403-3407.
38. NEURATH R., Kent S.B., y Strick N. 1982. Specificity of antibodies elicited by a synthetic peptides having a sequence in common with a fragment of a virus protein, the hepatitis B surface antigen. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79: 7871-7875.

39. PRINCE A.M., Kram H., y Hopp P.T. 1982. Hepatitis B vaccine: Identification of HBsAg/a and HBsAg/d but not HBsAg/y subtype antigenic determinants on a synthetic immunogenic peptide. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79: 579-582.
40. GERING J.L., Pourcell R.H., y Lerner R.A. 1985. Use of synthetic peptides to identify protective epitopes of the hepatitis B surface antigen. Vaccines 85: Molecular and Chemical Basis of resistance to Parasitic, Bacterial and Viral Disease. Cold Spring Harbor Laboratory 235-239.
41. BARANY G. y Merrifield R.B. 1980. Solid Phase peptide synthesis. In: E. Gross et al., eds. The Peptides: Analysis, synthesis, biology 2:3. N.Y. Academic Press.
42. KAISER E., Collescott R.L., Bossinger C.A. y Picook A. 1970. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid phase, synthesis of peptides. Anal. Biochem. 34: 594-596.
43. MORE S. 1968. Amino acid analysis: aqueous dimethyl sulfoxide as solvent for ninhydrin reaction. J. Biol. Chem. 243 (23): 6281-6283.
44. STEIN W.H. y Moore's. 1949. Chromatography. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 14: 179.

45. MORE S. y Stain W.H. 1954. Ion exchange chromatography. *J. Biol. Chem.* 211: 907.
46. HUNTER W.M. y Greenwood F.C. 1942. Preparation of iodine 131 labeled human growth hormone of high specific activity. *Nature* 194: 495-496.
47. SHICK A.F. y Singer S.J. 1961. On the formation of covalent linkages between two protein molecules. *J. Biol. Chem.* 236: 2477-2485.
48. *Immunologia* 1981. In: Francois B.J., et al., eds. Mason, N.Y. Cap. 15.
49. WILLIAMS C.A. y Chase M.W. 1968. *Methods in Immunology and immunochemistry*. Vol II Academic Press, N.Y.
50. CABBELL D.H., Garvey J.S., Cremmer N., y Sussdorf D.H. 1970. *Methods in Immunology*, 2nd ed. W.A. Benjamin Inc. N.Y.
51. TAINER J.A., Getzoff E.D., Alexander H., Houghten R.A., Olson J.A. y Lerner R.A. 1984. The reactivity of anti-peptide antibodies is a function of the atomic mobility of site in a protein. *Nature* 312: 127-134.
52. W.H.O. Collaborating Centre for Reference and Research on Rotavirus, Regional Virus Laboratory. East Birminham Hospital, W.H.O. ELISA for detection of Rotavirus antigen in faeces. 1982.

53. KEITH Gooderham 1982. *Protein Blotting*. Schleicher y Schuelll.
54. TSANG V.C.W., Peralta J.M. y Simmons R.A. 1983. *Enzyme linked immunoelectrotransfer blot*. *Methods in enzymology*. Protein 29: 376-391.
55. LASKEY A.R. y Mills D.A. 1977. *Enhanced autoradiography detection of ^{32}P and ^{125}I using intensifying screens and hypersensitized film*. FEBS 82: 314-316.
56. LAEMMLI U.K. 1970. *Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature* 227: 680-685.
57. TOWBIN H., Staehelin T., y Gordon J. 1979. *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79: 4350-4354.
58. ARIAS C.F., Lizano M. y Lopez S. 1986. *Synthesis in Escherichia coli and immunological characterization of a polypeptide containing the cleavage site associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity*. *J. Gen. Virol.* En prensa.
59. ARIAS C.F., López S., Bell, J.R. y Strauss H.S. 1984. *Primary structure of the neutralization antigen of simian rotavirus SA11 as deduced from cDNA sequence*. *J. Virol.* 50: 657-661.

60. HOPP T.P. y Woods K.R. 1981. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 3824-3828.
61. ESPEJO T.R., López S. y Arias C. 1981. Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and the effect of trypsin. *J. Virol.* 37: 156-160.
62. RICHARDSON M.A., Iwamoto A., Ikegami N., Namoto y Furvichi V. 1984. Nucleotide sequence of the gene encoding the serotype specific antigen of human (Wa) rotavirus comparison with the homologous genes from simian SA11 and UK bovine rotavirus. *J. Virol.* 51: 860-862.
63. SMITH D.M.L. y Homes I.H. 1984. Sequence homology between human and animal rotavirus serotype-specific glycoproteins. *Nucleic Acid. Res.* 12: 3973-3982.
64. ELIMANTC. Hoyne P.A. Dyal S.M.L., Holmes I.H. y Aza A.A. 1983. Nucleotide sequence of the gene encoding for the serotype specific glycoprotein of UK bovine rotavirus. *Nucleic Acid Res.* 11: 4689-4701.
65. BOTH G.W., Nattick J.S. y Bellamy A.R. 1983. The serotype glycoprotein of simian SA11 rotavirus: Coding assignment and gene sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80: 3091-3095.

66. GLASS R.I., Keith J., Nakagomi O, Nakagomi T.J., Aka, A.A., Kapikian Z.A., Chanock y Flores J. 1985. Nucleotide sequence of the structural glycoprotein VP7 gene of Nebraska calf. *Diarrea virus rotavirus: comparation with homologous gene from four strain of human and animal rotavirus.* *Virology* 141: 292-298.
67. DYALL-SMITH M.L. y Holmes I.H. 1984. Gene sequence of the serotype-specific glycoprotein of the type 2 human rotavirus, and its use in identifying antigenic regions. *Sixth International Congress of Virology Sendai, Japan.* p. 363.
68. GUUN p.R., Sato F., Powell K.H., Bellamy R.A., Napier J.R., Harding D.K., Hancock W.S., Slegman L.S. y Both G. 1985. Rotavirus neutralizing protein VP7: Antigenic determinants investigated by sequence analysis and peptide synthesis. *J. of Virol.* 54: 791-797.