



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA

03062
12
2 ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

"REARREGLOS GENÓMICOS DE ROTAVIRUS"

TESIS QUE PRESENTA EL QFB ERNESTO MENDEZ SALINAS
PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
INVESTIGACION BIOMÉDICA BÁSICA.

CUERNAVACA, MOR. 1990.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

CONTENIDO.

I. INTRODUCCION.

Generalidades.

Replicación de rotavirus.

Partículas defectivas.

Variabilidad genómica en virus de RNA.

Antecedentes.

II. MATERIALES Y METODOS.

III. RESULTADOS.

IV. DISCUSION.

V. BIBLIOGRAFIA.

INTRODUCCION.

Uno de los principales problemas de salud que afectan a la población infantil en todo el mundo son las gastroenteritis agudas, ya que frecuentemente son causa de muerte en ese grupo de población. Se considera que en todo el mundo, alrededor de 500 millones de niños menores de 5 años se ven afectados anualmente por gastroenteritis agudas (13, 17), de las cuales las causadas por rotavirus ocupan un lugar muy importante.

En países subdesarrollados, se considera que los rotavirus son responsables del 6% de los episodios de gastroenteritis agudas y del 20% de las muertes provocadas por diarrea en niños menores de 5 años, lo cual es debido a la deshidratación tan severa que se produce como resultado de la infección (17). En países desarrollados, en donde el número total de diarreas es menor, el porcentaje de gastroenteritis asociadas a rotavirus es mayor, y se considera que estos virus son responsables de aproximadamente el 30% de los episodios de diarrea en niños que requieren hospitalización y de la mitad de los casos de deshidratación. Por estudios realizados en distintas poblaciones, se ha encontrado que la incidencia de gastroenteritis causadas por rotavirus es similar en países desarrollados y subdesarrollados (0.2 a 0.8 episodios / niño / año) (17), lo que confirma que la infección por estos virus no está directamente relacionada con hábitos higiénicos o status socioeconómico de la población afectada.

Los rotavirus tambien son causa de gastroenteritis agudas en muchas especies animales y por la facilidad que tienen los rotavirus animales para crecer en líneas celulares (a diferencia de los rotavirus humanos), en un principio se utilizaron éstos como cepas de referencia. Actualmente, se han podido adaptar a cultivos celulares muchas cepas de rotavirus humanos, lo que ha propiciado un gran avance en el conocimiento de los estos virus (13b, 52a, 78a).

Generalidades

Los rotavirus son miembros de la Familia Reoviridae a la que también pertenecen otros virus cuyo genoma está constituido por RNA de doble cadena segmentado (dsRNA) (42).

El virión maduro está constituido por dos capas de proteínas, denominadas capa o cápside externa y capa o cápside interna. La capa externa esta formada por las proteínas VP4 y VP7, que son importantes en las primeras interacciones del virus con la célula huésped; la capa interna esta formada por VP6, que rodea al núcleo del virión, que, a su vez, lo constituyen las proteínas VP1, VP2 y VP3, además del dsRNA genómico (46) (Figura 1).

Aunque la(s) función(es) específica(s) de cada una de las proteínas estructurales no esta totalmente clara, se ha sugerido, en base a su estructura primaria y a su localización en el virión que VP1 podría tener la función de RNA polimerasa (15) y que VP2 podría ser la proteína asociada directamente al genoma viral, es decir, podría ser la proteína de la nucleocápside (9, 45). La presencia de VP6 en la partícula viral es imprescindible para que se produzcan los mRNAs virales (69), pero no se sabe su función con exactitud. En lo que respecta a las proteínas de capa externa (VP4 y VP7), se sabe que ambas son inductoras de anticuerpos neutralizantes en el huésped (36, 52), y que juegan un papel muy importante en la adsorción y penetración del virus a la célula huésped (24, 25, 68).

Segmentos
de ARN

1 —

2 —

3 —

5 —

6 —

7 —

8 —

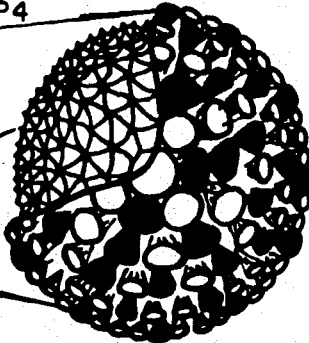
10 —

11 —

VP4

VP6

VP7



VP4

Neutralización (serotipo)
Hemaglutinación
Virulencia

VP6

Antígenos comunes
Antígenos de subgrupo

VP7

Neutralización (serotipo)

Figura 1. Representación esquemática de rotavirus.

Durante la infección viral, se producen además, otras proteínas que no están presentes en la partícula viral madura y que por lo tanto se denominan proteínas "No estructurales" (NS) (42). Dichas proteínas son NS53, NS35, NS34, NS28 y NS26, denominadas así por su peso molecular aparente en geles de poliacrilamida /SDS. La función específica de NS53, NS35 y NS34 se desconoce pero se ha observado que NS35 y NS34 forman parte de partículas subvirales con actividad de replicasa (26); además, en un estudio reciente (6), se sugirió que NS35 es en realidad una proteína estructural que se encuentra en muy pequeña proporción en el virión y que posiblemente interviene en la adsorción del virus a la célula. La proteína NS28 es una glicoproteína que juega un papel muy importante en la morfogénesis del virus, ya que cuando se inhibe específicamente la glicosilación de esta proteína, se observa la acumulación de algunas partículas intermediarias en la morfogénesis viral (65, 73).

Aunque algunos autores han reportado al producto del gene 11 como una proteína estructural (54), se ha demostrado que en la cepa de rotavirus de simio SA11, el producto del gene 11 es una fosfoproteína no estructural que pudiera tener actividad de kinasa y se ha sugerido que juega un papel importante en la replicación del RNA viral (78). La presencia de esta proteína en partículas subvirales con actividad de replicasa (26) apoya esta hipótesis. En la tabla I se resumen algunas características de las proteínas virales, así como el asignamiento génico para cada una de ellas.

TABLA I ASIGNAMIENTO GENICO Y CARACTERISTICAS DE LAS PROTEINAS DE ROTAVIRUS

GENE	TAMAÑO DEL GENE	TAMAÑO DE LA PROTEINA	NOMENCLATURA DE LA PROTEINA	PROCESAMIENTO	LOCALIZACION CI = caps interna CE = caps externa.	PROPORCIÓN RELATIVA EN EL VIRION		CARACTERISTICAS
	pb	Kd				%	REL. MOLAR	
1	3300	125	VP1	No	CI	2	1	Polimerasa?
2	2600	84	VP2	Mrístilada, Proteólisis - 88 kd 84	CI	16	10	Nucleocápside?
3	2550	88	VP3	No	CI	0.5	0.35	
4	2370	88	VP4	Ruptura proteolítica VP8 28 Kd VP5 60 Kd	CE	1.5	1	HA, induce Abs. neut.heterotípicos, Aumento de infectividad Internalización
5	1580	53	NS53		NS			
6	1340	41	VP6	Mrístilada	CI	51	78	Sugerencia de que podría ser procesada en su NH ₂ terminal (13p)
7	1060	34	NS 34	No	NS			Presente en part. subvirales con act. de replicasa
8	1060	36	NS36	No	(NS o CE?)			
9	1060	37-38	VP7	Glicosilada (alta manosa)	CE	30	55	Principal Ag. neutralización adsorción a la célula.
10	780	20	NS 28	Glicosilada (alta manosa)	NS			Importante durante la morfogénesis.
11	680	18.8 9.27	NS 26	Fosforilada	NS			kinasa?

El asignamiento génico de cada uno de los 11 segmentos de dcRNA de rotavirus se ha establecido por experimentos de traducción in vitro de los RNAs virales (3) y a través de virus reasociantes (36), los cuales son el resultado de una coinfección con 2 cepas distintas de rotavirus. Los virus reasociantes contienen segmentos de dcRNA provenientes de ambas cepas por lo que poseen las características fenotípicas de ambos progenitores que segregan con los genes respectivos (42). Los estudios con virus reasociantes también han servido para caracterizar la o las funciones de una proteína (10), sin embargo, en un estudio realizado recientemente con variantes del rotavirus de simio SA11 y con una cepa bovina se demostró que un fenotipo determinado por un gene puede verse modificado en cierto grado por el fondo genético en el que se encuentre (12).

Como se ha mencionado, el genoma de los rotavirus consta de 11 segmentos de dcRNA; el tamaño de estos segmentos varía desde aproximadamente 660 pb para el gene 11 (numerados por el orden de migración electroforética) hasta aproximadamente 3300 pb para el gene 1 (42), sin embargo estos tamaños varían entre distintas cepas, lo que origina, junto con la composición particular de cada gene, que cada cepa de rotavirus tenga un patrón electroforético característico, (también llamado electroferotipo). En la figura 2 se puede apreciar el electroferotipo de distintas cepas de rotavirus entre las cuales se distinguen cepas con patrón largo (carriles 1 y 7), con patrón corto (carriles 2, 3, 4 y 6) y con patrón supercorto (carril 5), denominadas así por la movilidad relativa de los segmentos 10 y 11. Se ha

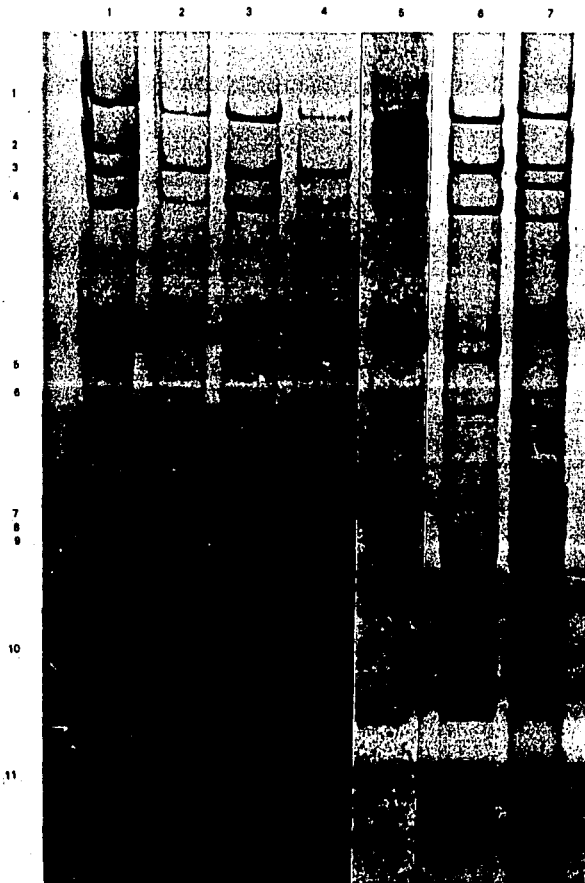


Figura 2

Patrones electroforéticos de las cepas de Rotavirus en geles de Poliacrilamida.

encontrado que los genes 11 de las cepas de patrón largo son equivalentes a los segmentos 10 de las cepas de patrones corto y supercorto (60, 74)

En los rotavirus, cada segmento de dcRNA representa un gene, lo cual ha sido confirmado por la secuencia de distintos genes de rotavirus aislados de diferentes especies, en las que se ha encontrado un solo marco abierto de lectura, con excepción del gene 11, que contiene 2 (31), aunque hasta ahora no se sabe si ambos marcos de lectura son funcionales.

La cadena de polaridad positiva en el dcRNA genómico es idéntica a la molécula de mRNA, contiene cap en su extremo 5' y carece de señales de poliadenilación en su extremo 3'. Una característica sobresaliente es que todos los genes de rotavirus secuenciados hasta la fecha contienen secuencias conservadas de 10 y 8 bases en sus extremos 5' y 3' respectivamente (39, 42).

Al igual que en los rotavirus, en todos los grupos de virus cuyo genoma es segmentado, existen secuencias conservadas en los extremos de cada segmento que son características para cada grupo de virus, algunos ejemplos se observan en la Tabla 2 (79). La función de dichas secuencias no se conoce, pero en algunos virus de la Familia Reoviridae, la misma a la que pertenecen los rotavirus, se ha propuesto que tales secuencias podrían funcionar como señales de

#####

TABLA 2. SECUENCIAS CONSERVADAS EN LOS EXTREMOS DE LOS
SEGMENTOS DE RNA EN ALGUNOS VIRUS CON GENOMA SEGMENTADO.

FAMILIA	GENERO	SECUENCIAS (5'....3')	REFERENCIA
Reoviridae (dcRNA)	Orthoreovirus	GCUA.... ...UCAUC	2
	Phytoreovirus	GGUA.... ...UGAU	2
	Rotavirus	GGCUUUUAAA....AUGUGACC	39, 42
Orthomyxoviridae (-RNA)	Influenza A	AGUAGAACAAGG...CCUGCUUUGCU	16
	Influenza B	UCAUCUUUGUU....CGAAGACGA	72
	Influenza C	AGUAGAACAA....CGCUUCUGU	16
Bunyaviridae (+RNA)	Bunyavirus	AGUAGUGUAC....GUACACUACU	42

#####

encapsidación (2, 79); y, también se ha sugerido que son señales que reconoce la polimerasa viral durante la transcripción y/o replicación (16, 39).

Replicación de Rotavirus.

El ciclo de replicación de los rotavirus se lleva a cabo en el citoplasma de la célula (42). La infección comienza con la adsorción del virus a la célula; algunos autores (25, 68) han sugerido que la adsorción del virus es a través de VP7, basados en estudios de competencia con anticuerpos monoclonales y estudios bioquímicos; sin embargo, un estudio reciente (6) demuestra que la proteína NS35 es en realidad una proteína estructural y que es ésta, y no VP7, la que se adsorbe a la célula. Algunos experimentos de unión de distintas cepas de rotavirus humanos y animales a eritrocitos y células MA 104 (permisibles para todas las cepas de rotavirus adaptadas al crecimiento en cultivos celulares), sugieren que VP4 podría también participar en la adsorción del virus a la célula (24).

La penetración del virus a la célula es un proceso en el que VP4 es la proteína responsable, para lo cual requiere de un corte específico con tripsina (produciendo VP5 y VP8) (20, 47, 70); en algunas cepas de rotavirus este rompimiento es imprescindible para una infección productiva (25), mientras que en otras, el tratamiento con tripsina incrementa la infectividad hasta 1000 veces (56). En base a la secuencia amino terminal de VP5 en la cepa de simio SA11, se sabe que existen 2 sitios sobre los que actúa la tripsina (47), (separados

entre sí por 6 aminoácidos), que están conservados en todas las cepas de rotavirus hasta ahora analizadas (41, 48), lo cual es indicio del papel biológico tan importante que tiene este corte con tripsina.

Se ha sugerido que al penetrar el virus a la célula, pierde las proteínas de capa externa, de manera que las partículas con capa interna son las que se introducen a la célula e inician la síntesis de los mRNAs.

Las partículas con una sola cápside pueden producirse *in vitro* a partir de partículas con doble cápside mediante un tratamiento con agentes quelantes como EDTA (14) y son funcionalmente activas, es decir, son capaces de producir mRNAs funcionales tomando como templado el dcRNA genómico endógeno (14, 69), por lo que se infiere que alguna o algunas de las proteínas que constituyen estas partículas (VP1, VP2, VP3 y VP6) tienen la actividad de transcriptasa viral (síntesis de mRNA a partir de dcRNA).

Durante una infección de células en cultivo con rotavirus, la síntesis del RNA viral se empieza a detectar a las 3 horas postinfección (40, 54, 71) y se incrementa con el tiempo hasta alcanzar un máximo a las 9-12 hrs (40). Los mRNAs producidos se utilizan para la síntesis de proteínas y forman un complejo con éstas, originando partículas subvirales (34), en las que, a su vez, sirven como templados para la síntesis de su cadena complementaria, formando así el dcRNA genómico (26, 34). Se ha considerado que entre el 1 y el

17%, dependiendo de cada gene, de los mRNAs producidos en una infección son encapsidados y de éstos, solamente una pequeña proporción están contenidos en partículas infecciosas maduras (40).

La expresión genética en los rotavirus parece estar regulada; estudios recientes con una cepa bovina muestran que existe regulación a nivel transcripcional y traduccional ya que los mRNAs son sintetizados en distintas proporciones y los niveles de cada una de las proteínas no está en relación directa con la cantidad del mRNA correspondiente (40).

Durante el ciclo de replicación de los rotavirus se producen diferentes tipos de partículas subvirales que contienen distinta composición de proteínas (34). En base a su morfología se han distinguido 4 tipos de partículas en células infectadas: el núcleo viral que mide aproximadamente 37 nm; partículas de 55 nm con una sola cápside; partículas con membrana; y, partículas maduras con doble cápside de 70 nm (11, 65, 66, 73).

Se ha propuesto que las partículas de 37 nm son partículas subvirales que presentan actividad de replicasa (producción de dcRNA a partir de mRNA), compuestas por las proteínas VP1, VP3, VP9, NS35, NS34 y NS26; además, se ha sugerido que éstas representan el primer estadio en la morfogénesis del virus (26). Aunque no se sabe cual de las proteínas mencionadas es la responsable directa de la actividad de replicasa, es muy probable que algunas de ellas sean requeridas para la síntesis del dcRNA, ya que por estudios con mutantes termosensibles

(tc) en la cepa de rotavirus de simio SA11, se sabe que VP1, VP3 y NS35 son requeridas para tal efecto (28). Durante la síntesis del dcRNA, estas partículas con actividad de replicasa adquieren las proteínas VP2 y VP6 y posteriormente pierden las proteínas no estructurales (NS35, NS34 y NS26), formando así partículas con una sola cápside (26, 69).

Posteriormente, las partículas con una sola cápside geman a través de la membrana del retículo endoplásmico hacia el lumen de éste por un mecanismo de reconocimiento entre VP6 presente en la partícula y NS28 presente en la membrana, produciéndose así, las partículas "envueltas" (4, 57). El mecanismo por el que las partículas "envueltas" pierden la membrana y adquieren las proteínas de capa externa para dar como resultado partículas virales maduras, se desconoce aún.

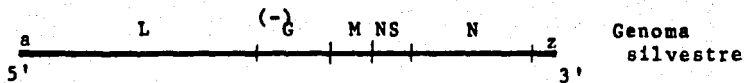
Partículas defectivas.

Durante una infección con cualquier tipo de virus, frecuentemente se generan partículas que tienen defectos en su genoma, como resultado de rearrreglos y deleciones del genoma viral silvestre. Las partículas que poseen estos genomas modificados se han llamado partículas virales defectivas (defecting interfering particles = DI), ya que son incapaces de replicarse por sí mismas y requieren de un virus ayudador que les proporcione la(s) proteína(s) de la(s) que carecen; sin embargo, a su vez, interfieren con la replicación de éstos (64).

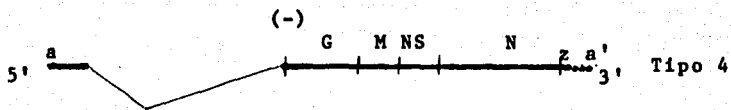
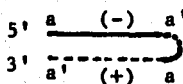
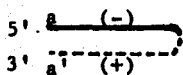
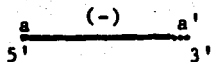
En virus de RNA que contienen un genoma de una sola molécula, se han encontrado RNAs defectivos tan pequeños que solamente tienen capacidad para replicarse y encapsidarse, como en el caso del virus de estomatitis vesicular (VSV), pero también se han encontrado partículas defectivas que contienen un genoma deletado pero conservan algunos genes funcionales, como el poliovirus (35a), y VSV (64).

En virus con genoma de RNA segmentado (por ejemplo: influenza y reovirus), se han detectado partículas defectivas que poseen moléculas de RNA pequeñas, que son el resultado de deleciones de genes de alto peso molecular, pero siguen conservando los genes silvestres de menor peso molecular (64).

Todos los RNAs defectivos estudiados a la fecha contienen uno o ambos extremos 5' y 3' idénticos al RNA silvestre. En virus con genoma no segmentado, es común que se encuentre solo uno de los extremos conservados; mientras que, en virus con genoma segmentado, los RNAs defectivos contienen ambos extremos idénticos al RNA silvestre pero poseen deleciones en la parte interna del gene (64). En la figura 3-A se esquematiza la estructura de RNAs defectivos del virus de estomatitis vesicular, los mejor estudiados hasta ahora, los cuales tienen similitud con RNAs defectivos de otros virus de RNA (64). En base a la estructura de estos RNAs, se han propuesto algunos modelos para explicar el mecanismo de su generación, los cuales se resumen en la figura 3-B (64).



DI CLASE I (no-transcritos)



DI CLASE II (transcritos)

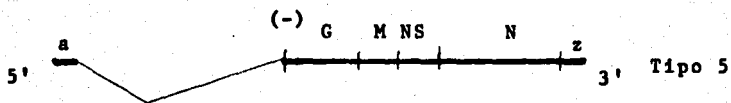


Figura 3-A. Tipos de rearrreglos genómicos en RNAs DI del virus VSV. El genoma silvestre (aproximadamente de 11 Kb) codifica para cinco proteínas (L, G, M, NS y N). La línea punteada indica secuencias de la cadena positiva y a' es la copia complementaria de a. La línea delgada indica deleciones (64).

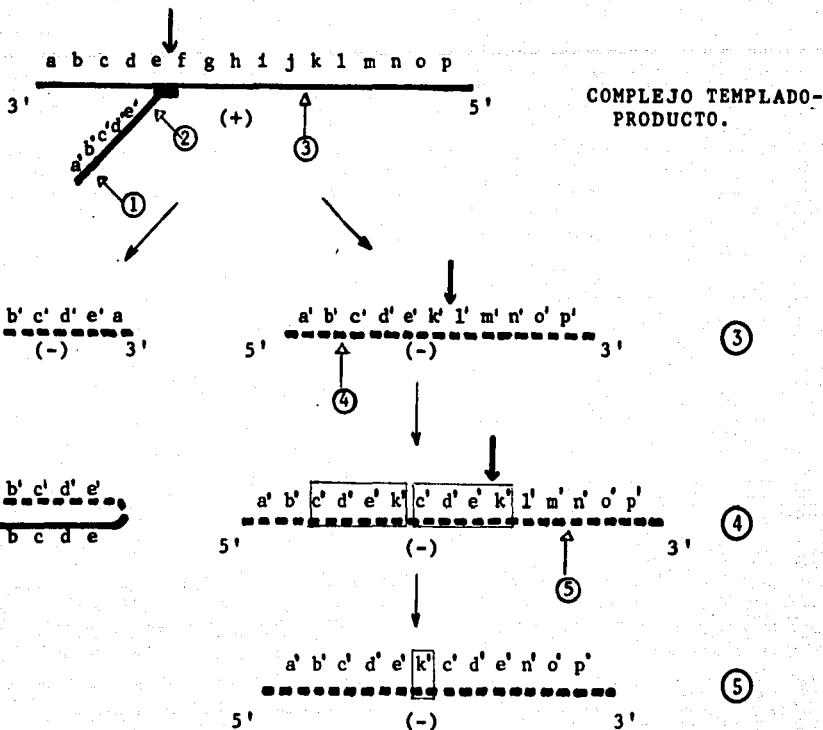


Figura 3-B. Modelo general para explicar algunos rearrreglos que dan lugar a RNAs DI. Se ilustran cinco tipos de rearrreglos en genomas de cadena negativa. 1 y 2 corresponden a un mecanismo denominado "copy back". 3, 4 y 5 se ilustran como una sucesión de eventos, en los que el resultado es una deleción interna, una repetición y una aparente inserción, respectivamente (64).

La caracterización de los RNAs de partículas defectivas de algunos virus ha sido útil para determinar ciertas secuencias importantes durante la replicación de estos virus, ya que estos RNAs se encapsidan y replican normalmente. Así, se han identificado secuencias importantes en la replicación y encapsidación de Wound Tumor Virus (2) y del virus L-A de levadura (21); y señales que parecen ser necesarias en el inicio de la transcripción del genoma del virus de sarampión (19a); además, el estudio de los RNAs defectivos ha sido útil para dilucidar el mecanismo de replicación en el coronavirus de hepatitis de ratón (50a).

Variabilidad genómica en virus de RNA.

La mayoría de los virus de RNA de cadena sencilla son una población de variantes virales heterogéneas, cuyos genomas están relacionados pero que difieren entre sí por una cantidad considerable de mutaciones en el genoma silvestre. Se ha considerado que la alta velocidad de mutación en estos virus se debe a la carencia de un sistema de corrección ("proofreading") en la replicación del RNA (35).

A pesar de la heterogeneidad, bajo condiciones de equilibrio, existe una población homogénea predominante que es capaz de replicarse por largos períodos sin cambios aparentes en su fenotipo, por ejemplo, el virus de estomatitis vesicular (VSV), se mantiene estable después de 593 pases en cultivos celulares a bajas multiplicidades de infección (71a); cuando se modifican esas condiciones de equilibrio,

pueden predominar las variantes virales que estaban presentes en baja proporción pero que poseen ventajas selectivas sobre las primeras, en estas nuevas condiciones.

Los factores identificados que contribuyen al desequilibrio dentro de una población de virus de RNA, para el surgimiento de nuevas variantes virales, son: la interferencia por partículas defectivas (DI) (ejemplo: virus VSV); diferente huésped o líneas celulares (ejemplo: poliovirus); selección inmune (ejemplo: virus de influenza); cambios de temperatura e infecciones persistentes (ejemplo: virus del sarampión) (71a).

Antecedentes.

En 1984, por estudios de epidemiología molecular mediante el análisis electroforético el dcRNA genómico de rotavirus en muestras de heces, se detectaron algunos pacientes inmunodeprimidos que excretaban rotavirus con patrones electroforéticos anormales; en estos electroferotipos destacaba la ausencia de los segmentos de RNA 11 o 9 y, la aparición de segmentos adicionales de mayor peso molecular.

Este tipo de variaciones en el electroferotipo de los rotavirus también se detectó en una cepa bovina después de varios pases consecutivos a altas multiplicidades de infección (moi); en este caso, se aislaron variantes virales viables y cada una de ellas carecía del segmento 5 (que codifica por la proteína NS53), que estaba sustituido por otro segmento de mayor peso molecular (37). Asimismo, en otros

estudios, algunos investigadores lograron generar virus reasociantes que carecían de genes silvestres y en su lugar contenían segmentos anormales de mayor peso molecular (1, 7).

La presencia de los segmentos "anormales" en partículas de rotavirus viables sugirió que éstas no eran partículas defectivas, ya que no necesitaban de un virus ayudador para replicarse, y por otro lado, que dichos segmentos debían de conservar la capacidad de codificar por una proteína funcional y de ser replicado y encapsidado de manera similar a la del gene silvestre al que sustituía.

En experimentos de hibridación tipo Northern con clones de cDNA provenientes de distintos segmentos de rotavirus se observó que los segmentos "anormales" contenían secuencias del gene al que sustituían, aunque no se demostró si exclusivamente tenía secuencias de ese gene (38, 63). En base a estos experimentos, se planteó la idea de que los segmentos "anormales" eran el producto de rearrreglos en los genes silvestres que estaban sustituyendo, lo cual resultaba en la formación de concatámeros de éstos, cuya estructura exacta se desconocía.

Aunque se han detectado genes anormales o rearrreglantes de rotavirus que contienen secuencias de los genes 5, 6, 8, 9, 10 y 11, solamente se han podido aislar partículas viables que poseen segmentos rearrreglados provenientes de los genes 5, 8, 9, 10 y 11, que codifican para proteínas no estructurales (1, 31, 37, 38, 51, 53, 63)..

Probablemente, algunos genes concataméricos no sean capaces de producir una proteína funcional, por modificación en su marco de lectura, y por lo tanto no dan lugar a partículas viables.

Durante el desarrollo del presente trabajo, aparecieron algunos reportes en los que se caracterizaron genes 11 rearrreglados provenientes de cepas aisladas de la naturaleza y que poseían patrones corto y supercorto (30, 31, 51, 60). En algunos de estos casos, se observó que los genes rearrreglados son el resultado de una duplicación parcial del gene 11, en la que se ha perdido la región 3' del gene ubicado hacia el extremo 5' (que resulta ser el gene funcional), y la región 5' del gene ubicado al extremo 3'. En otros casos, el gene 11 contiene una inserción rica en A+T de 189 y 322 nt entre el codón de terminación y la región 3' no codificadora (51, 60).

En los estudios con genes 11 rearrreglados se encontró que todos ellos poseen algunas características en común:

1. Una inserción, que en algunos casos corresponde a secuencias del mismo gene y, en otros, a secuencias ajenas a él, que está colocada a 4-9 nt después del codón de terminación funcional, de manera que todos ellos codifican para una proteína del mismo peso molecular que el gene silvestre.
2. Las regiones 5' y 3' están muy conservadas y no se repiten en la parte interna de dichos genes.
3. Todos los genes rearrreglados que se han caracterizado forman parte de partículas viables.

En términos generales, los segmentos "rearrreglados" de los rotavirus tienen ciertas similitudes con los RNAs defectivos de otros virus de RNA, por ejemplo: parecen ser producto de rearrreglos genómicos y son capaces de sobrecrecer al RNA silvestre por pases consecutivos del virus a altas moi (37). Sin embargo, también tienen diferencias notables con respecto a aquellos, siendo la principal que, al menos algunos de ellos, se encuentran en partículas viables, es decir que representan genes funcionales capaces de replicarse y encapsidarse como los RNA's de los virus silvestres y no necesitan, por lo tanto, de un virus ayudador para replicarse (1, 7, 37, 53). Al menos, en un caso (6a), se comprobó que las variantes virales que poseen un gene rearrreglado conservan su virulencia.

Este fenómeno de variación genómica observado en los rotavirus parece interesante, ya que, como se ha mencionado, estas variantes son viables y no dependen para su replicación de un virus ayudador; lo que implica que la sustitución de un segmento de RNA normal por otro segmento de mayor peso molecular (que contiene, por lo menos, parte del segmento sustituido), no interfiere con las funciones del virus, incluyendo las de replicación y encapsidación de esos segmentos.

El presente trabajo fue realizado en base a los siguientes objetivos:

1. Obtener variantes de rotavirus que posean genes rearrreglados a partir de cepas virales adaptadas a crecer en cultivos celulares, y,
2. Caracterizar molecularmente los segmentos rearrreglados de esas variantes.

Pensamos que el estudio de este tipo de variantes genómicas y más específicamente, de los segmentos rearrreglados de esas variantes, comparados con los genes homólogos normales, podría sugerir algunas de las señales presentes en estos RNAs para garantizar su replicación y encapsidación.

MATERIALES Y METODOS.

Línea celular. La línea celular denominada MA104 derivada de células epiteliales de riñón de mono Rhesus se utilizó para la propagación de todos los virus, la cuantificación de partículas infecciosas y el ensayo en placa.

Estas células se cultivaron con Medio mínimo esencial con sales de Eagle (MEM) GIBCO y 8% de suero fetal bovino GIBCO como suplemento, en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C.

Cepas Virales. Las cepas utilizadas fueron: la cepa Wa, de origen humano, proporcionada por el Dr. Luis Padilla del Instituto Mexicano del Seguro Social, México; la cepa de origen porcino YM, aislada y adaptada al crecimiento en cultivos celulares por nuestro laboratorio (67a); y, la cepa WAH, de origen humano pero con modificaciones en su electroferotipo, proporcionada por el Dr. Hoshino de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos, Washington.

Propagación de virus. El inóculo viral fue tratado con 10 o 15 µg de tripsina por ml de lisado (tripsina DIFCO 1:250) durante 1 hora a 37°C para activar el virus. La monocapa celular una vez confluyente se lavó dos veces con PBS antes de agregar el inóculo, el cual se mantuvo sobre la monocapa celular durante 1 hora a 37°C. Finalmente, se agregó MEM sin suero y se incubó a 37°C hasta que apareció efecto

citopático (ecp). El lisado de células infectadas se congeló a -20°C hasta su utilización, y las infecciones se realizaron sobre células crecidas en cultivo rotatorio.

Para realizar los pases en los que el virus fue concentrado, los lisados de células infectadas se extrajeron con freón (diclorodifluoroetano), se centrifugaron para separar la fase acuosa y a ésta se le añadió 0.19 ml de Polietilenglicol 6000 (PEG 6000) al 50% por cada ml de lisado para precipitar el virus; después de una incubación de 10-14 hrs a 4°C , los lisados se centrifugaron a 8000 rpm durante 30 minutos a 4°C . La pastilla que contenía el virus, se resuspendió en 0.5 ml de MEM y con éste se infectó la monocapa celular. Este procedimiento fue repetido consecutivamente durante varios pases.

Titulación de partículas infecciosas. Las células se infectaron de la misma manera que la que se describió anteriormente, solo que en este caso, se utilizaron diferentes diluciones de los lisados y la infección se realizó en cajas de cultivo de 96 pozos, utilizando 50 μl de la dilución respectiva en cada pozo. Las células se lavaron 2 veces con PBS 14-16 hrs postinfección y se fijaron con acetona al 80% en PBS durante 20 minutos.

Posteriormente las células se lavaron 2 veces con PBS y se agregaron 50 μl de suero antirotavirus (1:1000 o 1:2000) a cada pozo. Se incubó 1 hr a 37°C .

Las células se lavaron 2 veces con PBS y se agregaron 50 μl de proteína A-peroxidasa (Amersham) (1:2500). Se incubó a 37°C durante 2 hrs.

Las células se lavaron 2 veces con PBS y se agregaron 50 μ l de sustrato (1.5 ml de carbazole (4 mg/ml en dimetilformamida), 4 ml de buffer acetatos 0.05 M pH 5 y 10 μ l de peróxido de hidrógeno al 30%, filtrado a través de una membrana millipore de 0.45 micras). Se incubó a 37°C hasta que las células infectadas se tiñeron y se lavó varias veces con agua destilada.

La cuantificación de partículas infecciosas se determinó observando al microscopio las células infectadas que tenían el precipitado colorido y relacionando con el volumen y dilución del lisado utilizados.

Ensayo en placa. El virus se activó con tripsina, como se describió anteriormente y, se hicieron diluciones decimales del lisado en MEM sin suero. La monocapa celular, en pozos de 6 cm de diámetro, se inoculó con 0.4 ml de las diluciones respectivas por pozo y se incubó 1 hr a 37°C agitando suavemente cada 15 minutos. Posteriormente se retiró el inóculo y se lavó la monocapa con PBS una vez. Se agregaron 2 ml de la siguiente mezcla a cada uno de los pozos:

MEM 2x sin rojo de fenol GIBCO	10.5 ml.
HEPES 1M	0.8 ml.
NaHCO ₃ 4.4%	0.8 ml.
Tripsina 1% (DIFCO 1:250)	30 μ l.
Agarosa 2% en agua estéril	9.0 ml.

La temperatura de esta mezcla fue de 45°C y después que solidificó la agarosa, se incubó 37°C durante 2 o 3 días. Las células se tiñeron con rojo neutro, agregando una segunda capa de agarosa a 45°C, preparada de la siguiente manera:

MEM 2% sin rojo de fenol GIBCO	10.5 ml
HEPES 1M	0.8 ml
NaHCO3 4.4%	0.8 ml
Rojo neutro 0.3%	0.4 ml
Agarosa 2%	9.0 ml

Se deja solidificar la agarosa y se incuba a 37°C, protegiendo la caja de la luz con papel aluminio hasta la aparición de las placas.

Purificación de partículas virales con actividad de transcriptasa. El lisado de células infectadas con rotavirus se extrajo con un volumen igual de freón, agitando violentamente hasta formar una emulsión.

Se centrifugó en un rotor JS7.5 a 7000 rpm por 30 minutos a 4°C.

La fase acuosa se mezcló con PEG 6000 (0.19 ml al 50% por ml de fase acuosa), y se incubó toda la noche a 4°C.

Se centrifugó a 8000 rpm durante 30 minutos a 4°C en el rotor JS13.

La pastilla se resuspendió en 0.5 ml de TSM (Tris 20 mM pH 8.2, cloruro de sodio 150 mM y cloruro de magnesio 1 mM). La suspensión de virus se depositó sobre un gradiente discontinuo de CsCl formado por 1.8 ml con una densidad de 1.4 g/cm³ y 2.3 ml con una densidad de 1.3 g/cm³ en TM (TSM sin cloruro de sodio).

Se centrifugó 2 hr a 35000 rpm a 4°C en un rotor SW 50.1.

La banda opalescente de virus formada en la interfase del gradiente de CsCl se recuperó por punción con una jeringa.

El virus recuperado se diluyó con TSM y se centrifugó durante 2 hr a 40 000 rpm a 4°C en un rotor SW 50.1.

La pastilla se resuspendió en el mismo tubo con 0.2 ml de Tris-EDTA (20 mM-15 mM pH 8.1), y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Se agregó cloruro de cesio con densidad de 1.36 g/cm³ y se centrifugó a equilibrio a 35 000 rpm durante 17 hr a 4°C en el rotor SW 50.1 .

El virus se recuperó del gradiente por punción de la banda opalescente y se concentró, centrifugando durante 2 hr a 40 000 rpm a 4°C en el rotor SW 50.1 .

La pastilla se resuspendió en 30-100 µl de agua destilada estéril, dependiendo de la intensidad de la banda observada sobre el gradiente de cloruro de cesio.

Transcripción in vitro. Para este ensayo se utilizaron las partículas virales de una sola cápside purificadas, de acuerdo al siguiente protocolo:

25 µl de partículas con una sola cápside purificadas

30 µl de bentonita al 3%

45 µl de agua bidestilada estéril

100 µl de buffer de transcripción 2x (**)

Esta mezcla se agitó y se incubó 6 hr a 42°C, agitando ocasionalmente.

Se centrifugó a 12000 xg durante 5 minutos a 4°C .

El sobrenadante se extrajo rápidamente con un volumen igual de fenol destilado saturado con Tris-EDTA (10-0.1 mM pH 8.1) .

Se extrajo con un volumen igual de cloroformo.

Se separó la fase acuosa y el mRNA se precipitó, agregando un volumen igual de LiCl 4 M e incubando durante toda la noche a 4°C.

El mRNA se recuperó por centrifugación a 14 000 rpm durante 15 min.

El precipitado se lavó con etanol frío al 70%, se secó y se resuspendió en agua bidestilada estéril.

La concentración del mRNA se calculó sobre un gel de agarosa al 1% en buffer TBE (Tris 100 mM, EDTA 20 mM, ajustando el pH con ácido bórico a 8.3), teñido con bromuro de etidio.

(**) El buffer de transcripción 2X contiene: Tris 70 mM pH 8, acetato de sodio 100 mM, acetato de magnesio 20 mM, rATP 8 mM, 2.5 mM de cada uno de los nucleótidos rGTP, rCTP y UTP y, S-adenosilmetionina 0.5 mM.

Cuando se produjo mRNA marcado radiactivamente, se utilizó una solución de transcripción que contenía 1/5 de la concentración normal de rCTP y se agregó además 10 μ Ci de rCTP-P32 (DUPONT, 800 Ci/mmol, 370MBq/ml, 10 mCi/ml).

Hibridización RNA-RNA. Las hibridaciones de RNA se realizaron en base al protocolo descrito por Flores, et al. (23), de la siguiente manera:

1 μ g de dcRNA

1 μ l de EDTA 0.5 M pH 7.6 y,

10 000 cpm de mRNA marcado con rCTP-P32

se mezclaron en un volumen final de 100 μ l de agua bidestilada estéril, y esta mezcla se incubó a 95°C durante 4 min; se pasó inmediatamente a hielo, en el cual se mantuvo durante 5 minutos. Se agregó un volumen igual de una solución de Tris 0.1 M pH 8.1, cloruro de sodio 0.4 M y SDS 0.2%.

Se incubó a 65°C durante toda la noche y posteriormente el RNA se precipitó con 3 volúmenes de etanol absoluto

El RNA se resuspendió en 10 μ l de agua bidestilada estéril.

Los híbridos de RNA se separaron en un gel de poliacrilamida al 5%, utilizando tris-glicina como buffer de corrida a 100 volts durante 5.5 hr.

El gel se tiñó con bromuro de etidio, se tomó una fotografía y posteriormente se secó y se expuso sobre una película KODAK X-OMAT.

Electroforesis en geles de poliacrilamida. El análisis del dcRNA viral se llevo a cabo en geles de poliacrilamida al 5 y 10% siguiendo el protocolo de Laemmli modificado por Ruiz (67a), sin SDS y sin gel concentrador. Los geles se corrieron a 100 volts durante 5.5 horas (geles al 5%) o a 12 mAmp durante 14 horas (geles al 10%). Estos geles se tiñeron con nitrato de plata.

Los geles utilizados para el análisis de secuencia fueron geles de poliacrilamida al 8% con urea 7 M y se corrieron en buffer TBE a 55 Wats. Estos geles se expusieron en películas KODAK X-OMAT.

Purificación de Oligonucleótidos. Los oligonucleótidos se sintetizaron en la Unidad de Síntesis de Macromoléculas del CIIGB, UNAM, en un sintetizador automático Modelo Microsyn 1450-A Sytec Inc. Los oligonucleótidos se purificaron por gel, utilizando geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 20%-bisacrilamida 1% con Urea 7 M. La banda correspondiente al oligonucleótido se detectó por iluminación con luz UV de onda larga sobre una placa de cromatografía KC18F reversed-phase TLC Millipore. El oligonucleótido se eluyó con agua destilada, se liofilizó y se hicieron extracciones sucesivas con

etanol. La cuantificación y pureza de los oligonucleótidos se evaluó por tinción con bromuro de etidio sobre geles de poliacrilamida al 20%-bisacrilamida 1% con Urea 7 M.

Electroforesis en geles de agarosa para la separación de los mRNAs. Se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Lizardi (46a), utilizando geles horizontales de agarosa al 2% con formamida y formaldehído. Estos geles se corrieron a 60 volts durante 23 horas utilizando una solución de trietanolamina-EDTA como buffer de corrida. Las muestras de mRNA se precipitaron y se desnaturalizaron, incubando a 68°C antes de cargar en el gel.

Secuenciación del RNA viral. Se realizó por el método de terminación con dideoxinucleótidos utilizando transcriptasa reversa del virus AMV y mRNA o dcRNA viral como templado, según el caso. El protocolo realizado fue básicamente el mismo que aquel descrito por Ruiz (67a).

RESULTADOS

Previamente se había reportado la generación de variantes genómicas de rotavirus in vitro, a través de pases consecutivos de un lisado viral a altas multiplicidades de infección (moi) (37). Basados en este estudio, nosotros quisimos obtener variantes genómicas de rotavirus que contuvieran genes rearrreglados producidos in vitro y caracterizarlos. Inicialmente, elegimos dos cepas de rotavirus: una cepa aislada de humano (cepa Wa), que sabíamos (por reportes previos) que era capaz de formar rearrreglos genómicos; y, una cepa de rotavirus porcino (YM) que ha sido empleada como modelo de estudio en nuestro laboratorio.

En el reporte antes mencionado, se utilizaron altas multiplicidades de infección (más de 100 partículas virales infecciosas por célula). En nuestro caso, hicimos varios pases consecutivos (entre 9 y 13 pases) de las preparaciones virales concentrando, en cada pase, el virus obtenido, con polietilenglicol (PEG). Debido a que estas cepas no crecieron tan bien en el laboratorio, nunca pudimos obtener las moi que reportaron como necesarias (>100) para la generación de este tipo de variantes genómicas in vitro (37). Las moi utilizadas, en el caso del virus YM siempre fueron menores de 0.4, con excepción de los pases 8 y 10 que fueron de 2.6 y 0.87, respectivamente; en el caso de la cepa Wa, las moi no sobrepasaron de 0.3. Aunque

utilizamos mol menores de 2.6, al analizar el RNA viral de los lisados de células infectadas provenientes de cada pase, encontramos algunos genes rearrreglados.

En la figura 4 se muestra el patrón electroforético de dcRNA de los pases 8 y 9 de la cepa YM, y de los pases 11 y 12 de la cepa Wa comparados con el dcRNA de la cepa original respectiva, en los cuales se puede observar la aparición de segmentos de dcRNA adicionales, generados en los pases 8 y 11 de las cepas YM y Wa respectivamente y que no se encontraban presentes en el virus parental con el que se partió (silvestre). En el caso de la cepa YM se puede observar desde el pase 8 la aparición de tres segmentos adicionales denominados A, B y C. Por otro lado también se observa una disminución de intensidad del segmento 9. En esta figura no se observa el segmento 11 de la cepa YM ya que el gel se corrió en condiciones que nos permitieron separar claramente los segmentos de mayor peso molecular, pero en ningún caso notamos alteraciones en este segmento.

En la cepa Wa, a partir del pase 11 se observó la aparición de un segmento adicional (D) y al mismo tiempo se notó la disminución del segmento 6 de RNA.

Como se ha mencionado, se observó que los segmentos 6 de Wa y 9 de YM fueron disminuyendo en concentración, concomitante a la aparición de segmentos adicionales de mayor peso molecular,

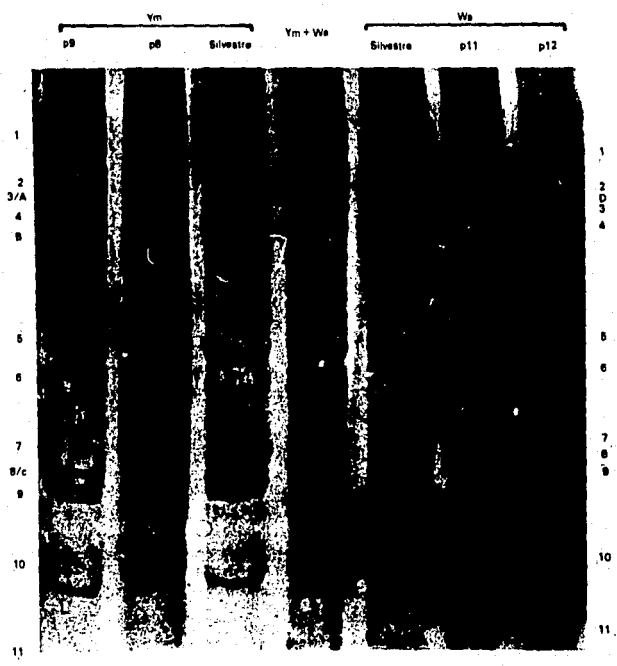


Figura 4.

Electroferotipos de distintos pases de Ym y Wa en geles de poliacrilamida. Los segmentos normales de dcRNA se enumeran del 1 al 11 y los segmentos adicionales se denotan por las letras A, B, C y D.

lo que sugería fuertemente que los segmentos 6 y 9 estaban siendo sustituidos por los segmentos de mayor tamaño. Los segmentos 6 y 9 codifican para las proteínas estructurales VP6 y VP7, respectivamente.

El lisado de los pases 9 y 11 de YM y Wa, respectivamente, fueron pasados por cultivos celulares cuatro veces más con el virus concentrado y sin concentrar, sin embargo, aparentemente las variantes genómicas que contenían los rearrreglos observados no fueron estables ya que el rendimiento de partículas virales infecciosas fué disminuyendo poco a poco hasta que no se pudieron detectar; lo mismo ocurrió con la cantidad de dcRNA presente en el lisado.

A partir del pase 11 de la cepa YM, en donde el segmento 9 había desaparecido totalmente del patrón electroforético y la cantidad de dcRNA total era escasa, intentamos aislar por ensayo en placa, variantes virales que contuvieran los genes rearrreglados pero no pudimos recuperarlas.

Paralelamente al intento de obtener en el laboratorio variantes genómicas de los rotavirus Wa y YM, al analizar el electroferotipo de una colección de cepas de rotavirus humanos que obtuvimos del Dr Y. Hoshino de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos, encontramos una cepa de rotavirus humano (Wa) que contenía un electroferotipo anormal, ya que se observaban al menos 4 segmentos de dcRNA adicionales a los 11

encontrados normalmente (Figura 5, carril WaH p0, en este gel solo se observan dos de estos: A y B, los otros dos segmentos eran aparentes en geles en los que se sobrecargaba dcRNA extraído del lisado viral). Además, la proporción relativa de los segmentos de RNA 5 y 7 (figura 5, carriles p0 y p1, respectivamente), estaba muy disminuida con respecto a los otros segmentos. Cabe mencionar, que esta cepa nos fue enviada como silvestre, es decir que, hasta donde nosotros sabemos, nunca fué pasada a altas moi, por lo que pensamos que los rearrreglos observados en esta preparación se generaron espontáneamente. Dado que esta cepa de rotavirus humano Wa (que llamamos WaH) parecía tener las características propias de las variantes genómicas previamente descritas, decidimos caracterizarla.

Inicialmente, pensando que las variantes que contenían los genes rearrreglados pudieran ser inestables como aquellas que fueron generadas en nuestro laboratorio a partir de las cepas Wa y YM, se hicieron varios pases consecutivos de esta preparación de virus WaH a moi menores de 0.1.

Al analizar el dcRNA resultante de cada uno de estos pases (Figura 5-A) encontramos que el segmento 5 empezaba a desaparecer a partir del pase cero (p0), y que el segmento 7 no se veía en el patrón electroforético a partir del primer pase; en su lugar, se encontraban los segmentos señalados como A y B en la misma figura, que eran de mayor peso molecular, (los otros segmentos adicionales también se dejaron de observar). Este patrón se

mantuvo constante durante los dos pases subsecuentes (p2 y p3, Figura 5), de manera que los segmentos adicionales A y B predominaron sobre los segmentos 5 y 7 en la población de virus.

La caracterización de la cepa WaH se inició con un lisado de células infectadas no clonado, es decir que partimos de una población de virus que podría contener varias especies de variantes.

Ya que, como se mencionó, los genes rearrreglados se mantuvieron constantes y el rendimiento de partículas infecciosas también se mantuvo sin disminuir después de varios pases, pensamos que la o las variantes que contenían estos rearrreglos eran lo suficientemente estables para intentar purificarlas. Decidimos aislar, por un ensayo en placa, la o las variantes de esta cepa de rotavirus que contuvieran los genes rearrreglados observados en el patrón electroforético, partiendo de la preparación de virus correspondiente al pase 3 de la Figura 5.A.

Se aislaron un total de 20 placas de virus, de las cuales al analizar su patrón electroforético, el 90% (18/20) tenía los genes 5 y 7 rearrreglados, ya que estos genes estaban ausentes y en su lugar se encontraban los segmentos A y B; el 5% (1/20) de las clonas contenía el segmento A en sustitución del gene 5 y la clona restante contenía un electroferotipo "normal" idéntico a la cepa Wa silvestre.

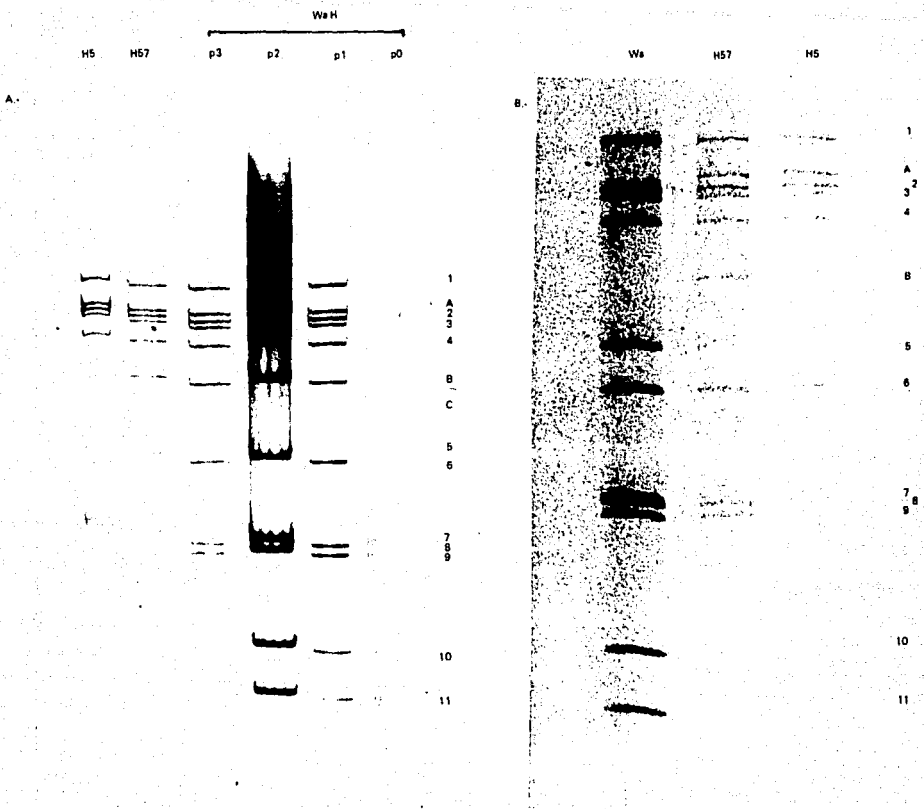


Figura 5

A: Patrón electroforético de la cepa Wa H en distintos pases, así como de las variantes H5 y H57 aisladas a partir del pase 3 de WaH.

B: Patrón electroforético de la Cepa Wa y de las variantes H5 y H57.

Para continuar la caracterización se eligieron dos de las variantes de la cepa WAH de rotavirus humano aisladas a partir de la preparación del virus original: una, denominada H57 en la que los genes 5 y 7 no se observaban y en su lugar estaban los segmentos A y B y, la otra, denominada H5, en la que el gene 5 estaba sustituido por el segmento A (Figura 5.B).

Estas variantes se purificaron tres veces más en placa para asegurar que no estuvieran contaminadas con otras variantes o con virus silvestre. Además, se pasaron 10 veces consecutivas para asegurar que continuaban siendo estables. En la figura 5-B se muestran los patrones electroforéticos obtenidos finalmente de estas variantes, en los que se puede observar que se conservaron las características de cada patrón.

Aunque no se realizó un estudio detallado de la cinética de crecimiento de las variantes H5 y H57 y, de la cepa silvestre en cultivos celulares, encontramos que tenían un comportamiento similar, en lo que respecta a su crecimiento, es decir, inoculando la misma cantidad de células con el mismo volumen de lisado de las variantes y de la cepa silvestre, obteníamos efecto citopático en el mismo tiempo y el rendimiento de partículas infecciosas era similar (entre 10^5 y 10^6 unidades formadoras de focos / ml). En base a ésto, concluimos que las variantes eran capaces de crecer tan bien como la cepa silvestre y sin la necesidad de un virus ayudador.

Inicialmente, decidimos estudiar los productos de transcripción de estas variantes para ver si los mRNA's sintetizados correspondían en tamaño a los genes rearrreglados o si eran del tamaño correspondiente a los genes que sustituían (5 y 7), ó como otra posibilidad si se sintetizaban tanto mRNA's rearrreglados como mRNA's del tamaño original.

Para ésto, purificamos partículas virales con una sola cápside de las variantes H5 y H57, que tienen la propiedad de sintetizar mRNA's utilizando como templado el dcRNA endógeno (actividad de transcriptasa), y sintetizamos mRNAs en presencia de rCTP-P32. Los mRNAs marcados con P-32 resultantes fueron separados en geles desnaturalizantes de agarosa. En la figura 6, se muestra la autorradiografía de uno de estos geles en donde encontramos que los mRNAs producidos por las variantes corresponden en tamaño a los dcRNAs respectivos, y que no se producen mRNAs adicionales como resultado de un defecto en la transcripción, que podría haberse originado durante el rearrreglo.

Como se conoce el tamaño de todos los genes de rotavirus, en base a la migración relativa de cada uno de ellos en geles de poliacrilamida, determinamos el tamaño de los segmentos A y B. De esta manera, encontramos que los viriones de la variante H57 contienen aproximadamente 2200 pb de dcRNA adicional al del virus silvestre, lo que indica que los rotavirus tienen la capacidad para encapsidar aproximadamente 12% más del material genético necesario para su replicación y continúan siendo estables.

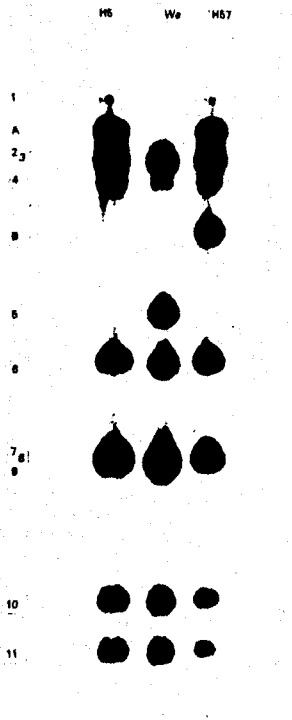


Figura 6

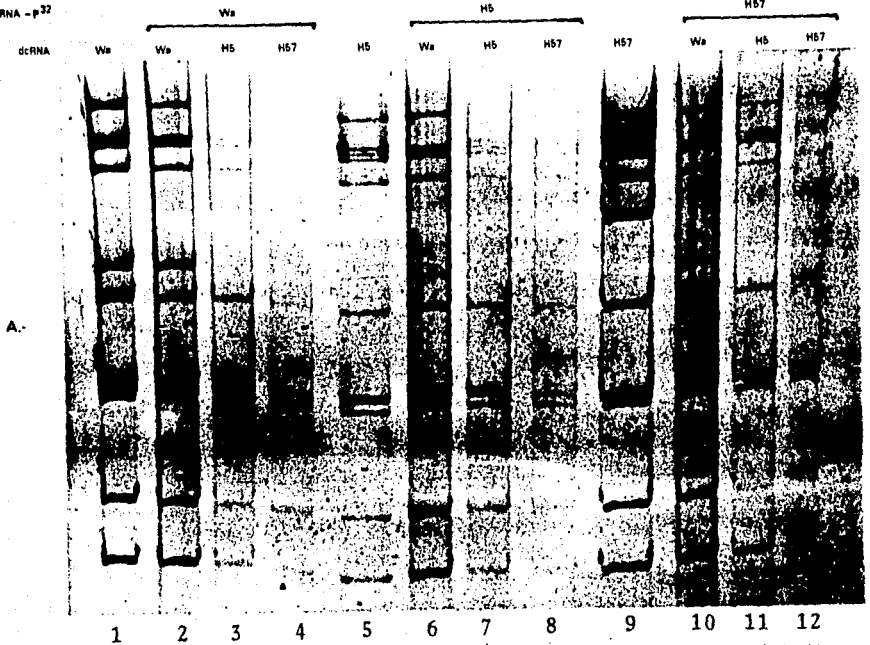
mRNAs obtenidos in vitro a partir de la caps Wc y de las variantes H5 y H57. La separación de los mRNAs se hizo en geles desnaturizantes de agarosa como se describió en materiales y métodos.

Para caracterizar más profundamente a los genes rearrreglados A y B, decidimos estudiar si éstos estaban constituidos exclusivamente por secuencias del gene que sustituían o si eran estructuras tipo mosaico, como las observadas con RNAs defectivos (DI) del virus de influenza (35a), constituidas por secuencias de dos o más genes. Para explorar estas posibilidades se realizaron experimentos de hibridación en solución, utilizando dcRNA genómico y mRNA-P32 provenientes de las variantes H5, H57 y de la cepa Wa. En este tipo de hibridaciones, el dcRNA es desnaturalizado y posteriormente se renaturaliza en presencia de mRNA marcado, los híbridos marcados resultantes son analizados en un gel de poliacrilamida.

La metodología utilizada en estos experimentos es la misma que han utilizado otros investigadores (22, 23, 39), para agrupar a los rotavirus en familias, de acuerdo a las homologías de sus genes. En este tipo de hibridaciones, un cambio en la migración o la desaparición de uno de los segmentos indica que la homología entre dos genes no es total.

Los resultados de estos experimentos de hibridación se muestran en la figura 7. Observamos que el patrón electroforético del dcRNA se conservaba solamente cuando la hibridación era entre el mRNA-P32 y el dcRNA homólogos (carriles 2,7, y 12); cuando se hibridizó el dcRNA de la cepa silvestre con mRNA-P32 de la variante H5, se observó un cambio en la migración del segmento

mRNA - p32



B.

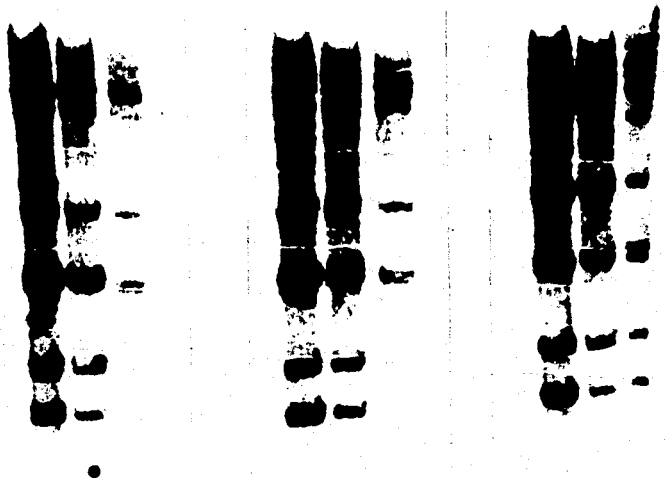


Figura 7

Hibridación de dcrRNA de Wa, H5 y H57 con mRNA - P³² de Wa, H5 y H57. Después de la hibridación, los híbridos se precipitaron y se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida. A.- Tinción con bromuro de etidio. B.- Autoradiografía.

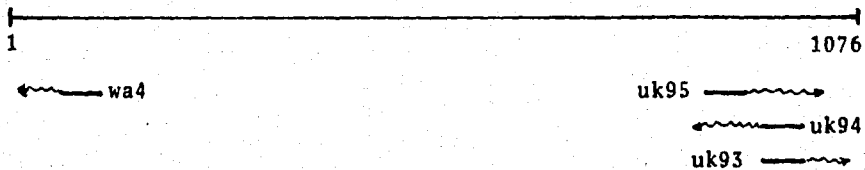
5 (carril 6) y, también se observó un cambio en la migración de los segmentos 5 y 7, cuando la hibridación se realizó con mRNA-P32 de la variante H57 (carril 10). Por otro lado, cuando la hibridación era entre el RNA de H5 y el de H57, en los que la única diferencia es que el segmento B está sustituyendo al gene 7 (Figura 5B), encontramos que solamente se modificaba el segmento 7 (carriles 8 y 11). Ya que en estos experimentos de hibridación no se modificó la movilidad, ni se observó la desaparición de ningún otro gene (diferente a los segmentos 5 y 7) en el electroferotipo, consideramos que los segmentos A y B contenían secuencias provenientes exclusivamente de los genes 5 y 7, respectivamente.

En base al tamaño de los genes rearrreglados, calculamos que contenían aproximadamente un 80% de RNA adicional; por otro lado, los experimentos de hibridación sugerían fuertemente que los genes rearrreglados contenían exclusivamente secuencias del gene al que sustituían sin embargo aun no sabíamos cómo estaban estructurados dichos genes. Para corroborar si en efecto contenían una porción adicional del mismo gene al que sustituían, cómo se encontraban organizados estos genes rearrreglados y definir si éstos eran concatámeros (como se había sugerido en estudios previos con rotavirus (63)), o si se trataba de estructuras mosaico como las descritas en RNAs BI del virus de Influenza (35a), decidimos determinar la secuencia nucleotídica de algunas regiones de estos genes.

Las regiones 5' y 3' no codificadoras y especialmente las regiones consenso de todos los genes de rotavirus son muy conservadas, por lo que algunos autores las han propuesto como regiones regulatorias en la transcripción y replicación del RNA viral. Desde este punto de vista, decidimos determinar si los segmentos rearrreglados también las poseían, si éstas se encontraban en la misma posición y si estaban o no duplicadas.

La secuencia nucleotídica se determinó por el método de Sanger (modificado para transcriptasa reversa), utilizando RNA viral como templado y los oligonucleótidos apropiados que nos permitieran definir la secuencia de los extremos 3' y 5'. Para determinar la secuencia del extremo 3' del gene 7 y del segmento B (gene 7 rearrreglado), se eligieron los oligonucleótidos uk93 y uk94 señalados en la Figura 8. Estos se diseñaron tomando como base las secuencias de los genes homólogos en las cepas UK (bovina) (76) y SA11 (simio) (8), en las que los últimos 86 nt están muy conservados, ya que se desconoce la secuencia del gene 7 de la cepa Wa. Con respecto al gene 5, utilizamos la única secuencia disponible del segmento 5 (cepa bovina RF, 9a), como base para diseñar varios oligonucleótidos utilizados en el ensayo de secuencia pero, en este caso, ninguno funcionó.

La secuencia del extremo 3' de los genes 7 de Wa y H57 resultó ser muy similar a la secuencia de genes homólogos previamente reportadas (8, 76). En la Figura 9-B se encuentran las secuencias determinadas de los genes de Wa, H57 y de los



uk93 (1004-1018)	ATGACCCTCTATGAGCAC
uk94 (1018-1004)	GTGCTCATAGAGGGTCAT
uk95 (926-943)	GGACTTTTGAAGCAATGC
wa4 (90-71)	GCAGCTTCAAAAGAAGTGT

5'

3'

Figura 8

Secuencia y localización relativa de los oligonucleótidos utilizados, sobre el gene 9 de la cepa de rotavirus bovino UK.

genes homólogos de las cepas UK y SA11; en esta figura, está como base la secuencia de Wa y se anotan solamente las diferencias de los genes de las otras cepas. La homología en la región 3' analizada (nt 855-1076), del gene 7 de Wa con respecto al segmento B de la variante H57 y a los genes homólogos de las cepas UK y SA11 es de 90%, 85% y 72.8%, respectivamente. Si consideramos exclusivamente los últimos 86 nt del gene, la homología se incrementa a 94.2%, 96.5% y 94%, respectivamente. La homología con el gene de SA11 se evaluó sin considerar un total de 28 nucleótidos extra que se encuentran insertados en este gene en particular (Figura 9-B).

Para verificar y extender esta secuencia, se utilizó el oligonucleótido uk95, que fue diseñado en base a la secuencia previamente determinada con el oligo uk94 (ver figura 8). Cuando empleamos este oligo sobre el gene silvestre, la secuencia que se obtuvo fue la esperada, comparada con la secuencia conocida del gene homólogo de la cepa UK y se encuentra señalada en la figura 9-B.

Por otro lado, cuando se utilizó el oligo uk95 para determinar la secuencia del gene 7 de la variante H57, encontramos una secuencia diferente a la obtenida con el gene silvestre que no correspondía a la región ubicada hacia el extremo 3'; al comparar la secuencia obtenida con la del gene homólogo de la cepa UK, encontramos que había una gran homología con la región comprendida entre los nt 812 y 972 (incluyendo el

5'

Wa	GGCTTTTATNCTTTTCAGTTGTTG	ATG	CTC	AAG	ATG	GAT	TCT	ACN	NAG	CAG
H57				N				N		
UK		A		G					T	C
SA11	A	A	G	G					G	C

Wa	ATG	G....
H57	NN
UK	
SA11	

nt 56

Figura 9-A. Secuencia del extremo 5' del gene que codifica por la proteina NS34 de las cepas Wa, UK, SA11 y de la variante H57. Solamente se denotan las diferencias con respecto al gene de la cepa Wa. N=nt no determinado.

Wa CTA GTA TAT GAT ATC GAA TCG TTN ATT AGA AAT TTC ATT CAA
 H57 GC A T G C T NG G
 UK GC A T G C T ATT A C A T
 SA11 GCT T T G C T A A G A A C T G A TCT
 nt 855

Wa GAT TAT GAC AGA ACG TCT TTA ATG TTA AAA GGA CTT TTG AAG CAA
 H57 C C N
 UK C T A T T G A A CG
 SA11 A TTA TC C T C T A A A C A T
 AGATGT

Wa TGC AAC TAT GAA TAT GCA TNT GAG TAG TCACAT-NATNA--AAATATTAACC
 H57 N G N - G A
 UK A A T AAT C CC T T A
 SA11 AT C A TG T GT GC A A C TT, G A TC G T
 TGATACATGTT AGTGTG TTGT

Wa ATCTACACATGACCCTCTATGAGCACAATAGTTAAAAGCNAAC-ACNNTCAAAAACCTAAA
 H57 A ANN A A T C
 UK T - TG
 SA11 TG A T - TG

Wa TGGCTATAGGGCGTTATGTGACC
 H57
 UK
 SA11

G
 nt 1076
 3'

Figura 9-B. Secuencia del extremo 3' del gene que codifica por la proteina NS34 de las cepas Wa, UK, SA11 y de la variante H57. Solamente se denotan las diferencias con respecto al gene de la cepa Wa. Las secuencias marcadas, corresponden a inserciones en el gene de SA11. N=nt no determinado.

codón de terminación), por una parte y, entre los nt 50 y 196, por la otra (Figura 10-A). Este resultado sugería fuertemente que la secuencia obtenida correspondía al sitio adyacente a donde se daba el rearreglo.

En la figura 10-A se encuentra la secuencia del segmento B determinada con el oligonucleótido uk95 comparada con la secuencia del gene 7 de la cepa UK y en la figura 10-B, un esquema que interpreta los resultados obtenidos con los oligonucleótidos uk95 y wa4.

Como se puede observar en el esquema y en base a los datos de secuencia obtenidos suponemos que el gene 7 rearreglado consiste de una duplicación parcial del gene silvestre, en el que la primera porción comprende los primeros 972 nt del gene silvestre incluyendo el codón de terminación. Cinco nucleótidos despues de este codón, encontramos una secuencia que corresponde al extremo 5' a partir del nucleótido 50 del gene silvestre; en el sitio de la duplicación se han perdido los 103 nucleótidos 3' terminales (973-1076) y los primeros 50 nucleótidos 5' terminales con respecto al gene silvestre.

Para conocer la secuencia del extremo 5' del rearreglo y de la cepa silvestre, se diseñó el oligonucleótido wa4, a partir de la secuencia del segmento B determinada con uk95 y asumiendo que la secuencia complementaria a wa4 estaba tambien presente en el extremo 5'.

A.

5'

```
H57 ... AA CAA CAA CTG AAT TCA ATT GAC ACN ATT ATT GCC ATN TAT GCC
UK ...                               C     G     A     A     A
nt 812

H57 ATN GAT GAT ATC GAA TTG TTN ATT AGA AAT TTT ATT CAA GAT TTT GAC
UK   T           C T   A T   A   C           A           T   C   A   T

H57 AGA ACG TTT TTT ATG TTT --- GGA CTA TTA CGG CAA TGC AAC TAT GAA
UK           A           A           AAG

H57 TAT GCA TAT GAG TAG TCACA CAGA ANN GGA ACC TCC ATN ATT AAC ACT
UK           A           T   ...
nt 972 ...

UK           ....   TGG C   GT   T   T
nt 50

H57 TCT TTT GAA GCT GCA GTT GTT GCT GCC ACT TNA ACA TNA GAA TNA ATG
UK           G           CG   CT           T

H57 GGT ATT CAA TAC GAT TAC AAT GAA GCC ATT TAC -- NAN AGT TAA AAC
UK           T           ---   AC T G           G

H57 NAN NTT TNA TGT GAT TNA TNA CTC T
UK   T A G   G           GG   G T   ...
nt 196
```

3'

Figura 10-A. Comparación de la región adyacente al sitio del rearreglo en el gene 7 de la variante H57 con su homólogo de la cepa bovina UK. La secuencia nucleotídica, corresponde a la región marcada 812-196 del esquema (Fig. 10-B). Los números indican las posiciones en el gene de UK; el codón de terminación esta subrayado. N=nt no determinado.

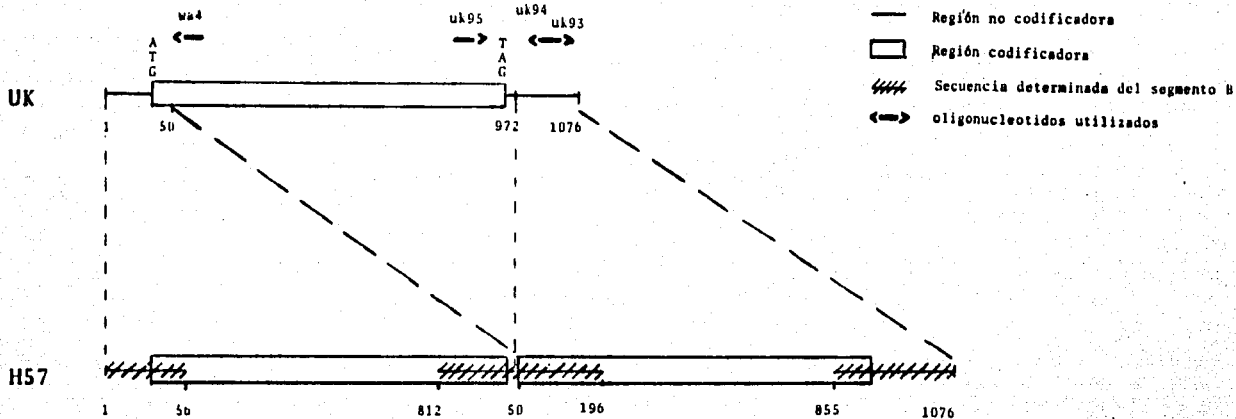


Figura 10-B. Esquema de la estructura del gene 7 de la variante HS7.

Al utilizar este oligo para primar la secuencia del gene 7 silvestre logramos obtener la secuencia que se muestra en la figura 9-A. Tambien en esta figura se muestra la secuencia obtenida a partir del gene rearrreglado o segmento B; sin embargo esta última se dedujo a partir de una mezcla de dos secuencias, una de las cuales ya conocíamos (aquella determinada con uk95 sobre H57). Esta mezcla de dos secuencias se produjo a lo largo de 50 nucleótidos ya que el oligonucleótido wa4 hibridizó con sus dos regiones complementarias, presentes en el gene rearrreglado, comprendidas en los nt 71-90 y 25 a 44 nt despues del codón de terminación. Estas regiones se esquematizan en la figura 10-B.

Al comparar la región de 56 nt del extremo 5' del gene 7 de Wa con respecto al segmento B de la variante H57 y a los genes homólogos de las cepas UK y SA11 (figura 9-A), resultó haber una homología de 96.5%, 94.6% y 92.8%, respectivamente.

La secuencia determinada con los oligonucleótidos uk94 (figura 9-B) y uk95/wa4 (figura 10-A), sobre el gene 7 rearrreglado nos permitió observar que la homología existente entre las secuencias duplicadas en el gene 7 rearrreglado (segmento B) (nt 855 a 972), es de 90%, similar a la existente entre genes homólogos de distintas cepas, que es de 84-92% (77).

En los ensayos en los que utilizamos el oligonucleótido uk95 para primar la secuencia del gene rearrreglado, este oligonucleótido solamente primó la síntesis a partir de la región adyacente al sitio del rearrreglo y no en la región ubicada hacia el extremo 3' (ver esquema, figura 10-B), que sabemos, es homóloga ya que, es precisamente de esa región de donde se derivó la secuencia de uk95. Para explicar este hecho, pensamos que la secuencia complementaria a este oligonucleótido en la región 3' del RNA podría estar formando parte de una estructura secundaria, de manera que no estaba accesible a hibridar con el oligonucleótido. Para corroborar esta hipótesis, utilizamos un programa desarrollado por Zuker (80), que predice la estructura secundaria mas estable en moléculas de RNA. El análisis de la estructura secundaria se realizó con la secuencia del gene completo (con las secuencias conocidas de los genes homólogos de SA11 y UK, 8, 76) y con diferentes regiones aisladas de dicha secuencia; tambien se utilizaron las secuencias del extremo 3' de los genes 7 de la cepa Wa y de la variante H57.

El resultado del análisis estructural no pareció indicar algo significativo puesto que, en base a este análisis, existen estructuras secundarias a lo largo de todo el gene, incluyendo aquéllas que involucran secuencias complementarias a los oligonucleótidos uk94 y uk93, que sí fueron capaces de hibridar con éstos. En base a este mismo análisis, en muchos

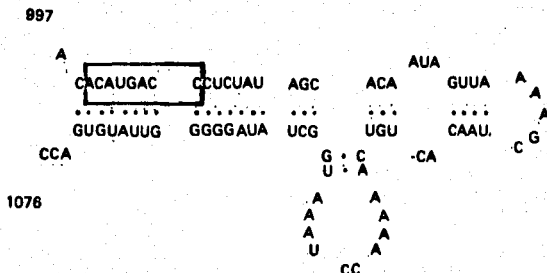


Figura II

Estructura secundaria en la región 3' no codificadora del gene que codifica por la proteína NS34 en los virus SA11, Wa, UK y H57. La secuencia del recuadro corresponde a una secuencia similar a la 3' consenso.

casos, se observó la formación de una estructura secundaria que involucra los nucleótidos 998 a 1076 del gene y que se ilustra en la figura 11.

En algunos virus de RNA (poliovirus y coronavirus) se ha encontrado que la formación de estructuras secundarias está correlacionada con sitios en donde existe una alta frecuencia de recombinación (S, 44a). Nosotros quisimos explorar si en el caso del gene 7 rearrreglado era válida esta observación, para lo cual utilizamos el mismo programa. No encontramos ninguna estructura secundaria que fuera obviamente responsable de un rearrreglo como el del segmento B en la variante H57.

Las secuencias consenso de todos los genes de rotavirus en los extremos 5' y 3' (GGCTTTTAA...ATGTGACC, respectivamente), se han relacionado como posibles sitios de reconocimiento para la polimerasa viral en el inicio de la transcripción y la replicación. Nosotros buscamos estas secuencias en regiones cercanas al sitio del rearrreglo para explorar la posibilidad de que la polimerasa viral los reconociera en una parte interna del gene, reiniciando ahí la síntesis del RNA viral, y originando la duplicación parcial del gene. Solamente encontramos que existe un sitio con una secuencia muy parecida a la secuencia 3' consenso (5' ACATGACC 3') entre los nucleótidos 999 y 1006, que está ubicada a 27 nt del sitio en donde ocurre el rearrreglo, y forma parte de la estructura secundaria mencionada anteriormente.

DISCUSION.

Se ha reportado la existencia de variantes de rotavirus que poseen genes rearrreglados en aislados naturales de distintas especies (31, 53, 74, 75) incluyendo humanos (19, 38, 63) y como resultado de pases consecutivos de un rotavirus bovino a altas multiplicidades de infección en cultivos celulares (37). Este trabajo describe la generación de variantes genómicas de rotavirus *in vitro* y el aislamiento de 2 variantes de la cepa Wa de rotavirus humano cuyos genes 5 y 7 están rearrreglados. A pesar de obtener estas variantes, solamente se determinó la secuencia parcial del gene 7 rearrreglado, con la cual se hizo un análisis de la estructura del rearrreglo.

Previamente, se había descrito que los rearrreglos genómicos de rotavirus se producían *in vitro* por pases consecutivos del virus a altas multiplicidades de infección ($moi=100-1000$) (37). Nosotros quisimos generar rearrreglos genómicos de rotavirus siguiendo el mismo procedimiento con las cepas Wa (humana) y YM (porcina). Sin embargo, debido a que éstas cepas no crecieron tan bien en cultivos celulares, no pudimos obtener las moi que se habían utilizado en el estudio mencionado para generar los rearrreglos (en nuestro caso, siempre fueron menores de 2.6); a pesar de lo anterior, observamos que después de varios pases, comenzaron a aparecer segmentos de dcRNA adicionales en los electroferotipos de las cepas Wa y YM, desapareciendo, a su vez, en pases posteriores, los segmentos 6 y

9, respectivamente. Los lisados correspondientes a los pases 9 y 11 de YM y Wa respectivamente, se pasaron varias veces más con el virus concentrado y sin concentrar, pero se observó que el rendimiento de partículas infecciosas y la cantidad de RNA presente en el lisado disminuyeron gradualmente hasta que no se pudo detectar mas virus infeccioso.

Los resultados del presente trabajo no concuerdan con el reporte de Hundley (37), ya que las moi necesarias para obtener los genes rearrreglados de las cepas YM y Wa nunca fueron mayores de 2.6 y, sin embargo, éstos se produjeron. De acuerdo a lo anterior, aunque la moi no parece ser la responsable directa en la generación de los rearrreglos, podría contribuir junto con otro u otros factores, a su formación. Por otro lado, la cantidad total de partículas virales presentes durante la infección sí parece influir en la formación de los rearrreglos genómicos, ya que, muchas cepas de rotavirus que han sido pasadas por cultivos celulares en el laboratorio por mucho tiempo, no han sufrido modificaciones en sus genes, y la diferencia con este trabajo es que estas cepas, en ningún caso son concentradas para la infección. Durante una infección por rotavirus, alrededor del 80% de las partículas virales producidas son no infecciosas (40), por lo que el inóculo concentrado utilizado en la infección contiene una gran proporción de partículas no infecciosas y defectivas, que pueden estar interviniendo en la generación de los rearrreglos.

Las variantes genómicas que contenían genes rearrreglados producidos a partir de las cepas Wa y YM (genes 6 y 9 respectivamente) fueron inestables ya que, después de varios pases, disminuyó el rendimiento de partículas infecciosas virales hasta que no se pudieron detectar. Existe la posibilidad de que estos genes rearrreglados hubieran perdido la capacidad de encapsidarse o que, como resultado del rearrreglo, se haya modificado su marco de lectura (como ha sido descrito para otras variantes genómicas, 37) afectando la funcionalidad y/o la estructura de la proteína. En particular, en las variantes obtenidas a partir de YM y Wa, los genes rearrreglados sustituían a genes que codifican para proteínas estructurales, lo cual es importante porque, en este caso, una modificación en la proteína puede afectar la estructura del virus y su viabilidad.

Contrariamente a lo que ocurrió con las variantes de las cepas Wa y YM que obtuvimos inicialmente, con la cepa WaH no se perdió la infectividad y el rendimiento de virus se mantuvo durante varios pases consecutivos aún cuando la concentración de los genes 5 y 7 disminuyó paulatinamente, mientras que los segmentos A y B predominaron en la población. Algunos segmentos adicionales se observaron solamente en algunos pases pero después desaparecieron del patrón electroforético.

En un estudio realizado con variantes virales que poseían genes rearrreglados se observó una mayor frecuencia de aislamiento de virus reasociantes (resultantes de una coinfección con dos

cepas de rotavirus) que contenían genes rearrreglados (32), además se observó que los genes que codifican para las proteínas NS53 y NS54 (homólogos a los genes 5 y 7 de Wa), de los cuales sólo el último estaba rearrreglado, segregaron juntos en una alta proporción (32); esta observación coincide con el hecho de que el 90% de las clonas de WaH que se recuperaron en este trabajo tienen el electroferotipo de H57.

Tomando juntos estos datos, parecería que algunos genes rearrreglados son más fácilmente encapsidables y que los genes normales son sustituidos y desplazados dentro de la población viral, porque aquellos, una vez que se generan, predominan sobre los genes normales. Sin embargo, en este trabajo, también se encontró que algunos segmentos rearrreglados de la cepa WaH, estuvieron presentes en la población de manera transitoria, lo cual pudo deberse a que estos segmentos contenían algún defecto que los hizo inestables en las condiciones de infección utilizadas en el laboratorio.

Para explicar la presencia de los segmentos A y B en el electroferotipo de la cepa WaH teníamos varias posibilidades: a) que estos segmentos representaran genes funcionales, a pesar de estar rearrreglados, y que sus marcos de lectura no estuvieran modificados; b) que los segmentos A y B tuvieran modificados sus marcos de lectura (como se ha observado en otros casos), pero que las proteínas codificadas por ellos fueran funcionales al no requerir una estructura muy rígida, ya que ambas son proteínas no

estructurales; y, c) que los segmentos A y B fueran defectivos y que requirieran proteínas funcionales para su replicación, por lo tanto los genes normales deberían estar presentes en la población en muy baja proporción, aún cuando no se detectaran, como ocurre con partículas defectivas (64).

El análisis de las dos primeras posibilidades requería de la obtención del RNA genómico viral y de las proteínas provenientes de células infectadas con variantes que contuvieran los segmentos anormales en sustitución de los genes silvestres. Para llevar a cabo ese análisis, debíamos purificar en placa dichas variantes, lo cual serviría, a su vez, para analizar si en efecto los segmentos A y B eran defectivos. En este trabajo, aislamos variantes de rotavirus a partir de la cepa WaH original no clonada, en la que se apreciaba un patrón electroforético con los segmentos A y B en sustitución de los genes 5 y 7; el aislamiento y purificación tres veces en placa de las variantes H5 y H57 confirmó que los segmentos A y B no requerían de un virus ayudador (silvestre) para replicarse, por lo que se concluyó que estas variantes no eran defectivas. El análisis posterior de los genes rearrreglados se realizó con estas variantes puras.

En los rotavirus, los mRNAs son colineares con la cadena de polaridad (+) del dcRNA y se producen a partir de partículas subvirales que contienen el dcRNA genómico y las proteínas VP1, VP2, VP3 y VP6 (14, 46, 49). Hasta ahora, no se sabe si existen

secuencias utilizadas como señales de inicio y/o terminación de la transcripción en la cadena (-) del RNA genómico, aunque se ha sugerido que las secuencias 5' y 3' consenso de todos los genes de rotavirus pudieran tener estas funciones (39).

Nosotros quisimos analizar si existía algún defecto en la transcripción, quizá por modificación de las secuencias importantes en el proceso, de los genes rearrreglados de las variantes H5 y H57, utilizando para ello partículas con actividad de transcriptasa. El hecho de encontrar especies de mRNAs de menor tamaño, podría haber indicado que las señales de inicio y/o terminación de la transcripción se encontraban duplicadas en la parte interna del gene. El tamaño de los mRNAs provenientes de los genes rearrreglados fue similar al de los segmentos de dcRNA de los que provenían y no se encontraron mRNAs de otros tamaños provenientes de los mismos segmentos A y B, ni siquiera en pequeñas proporciones.

Considerando los tamaños relativos de los segmentos A y B con respecto a los genes 5 y 7, se determinó que la variante H57 tenía 2200 pb extra, es decir, aproximadamente 12% más RNA que la cepa silvestre y sin embargo esta variante es viable y estable, lo que sugiere que existe cierto grado de flexibilidad en las partículas de rotavirus, que le permiten encapsidar más dcRNA del necesario a pesar de ser un virus icosaédrico. Este hecho parece

ser particular de los rotavirus ya que, generalmente en los virus icosaédricos existen restricciones en el tamaño del genoma para que pueda ser encapsidado (35a).

La hibridación RNA-RNA se ha utilizado en distintos estudios (22, 23, 59) para establecer homologías entre RNAs de distintas cepas de rotavirus. En este estudio, esta metodología se utilizó para determinar la homología de los segmentos A y B con el resto de genes de la cepa Wa con el objeto de verificar si los segmentos A y B contenían exclusivamente secuencias de los genes 5 y 7 respectivamente. Los resultados de estos experimentos sugirieron que el segmento A contenía exclusivamente secuencias del gene 5, ya que la hibridación entre los segmentos de RNA de la variante H5 con los de la cepa silvestre solamente afectaron la movilidad o la presencia de estos 2 segmentos; si el segmento A tuviera secuencias de otro segmento, diferente al 5, el segmento A hibridaría con ese otro segmento, modificando así la movilidad de este último, lo que no ocurrió. Una observación similar resultó cuando se hibridó RNA derivado de la cepa silvestre con RNA de la variante H57 y se comparó la movilidad y/o aparición del segmento B y del gene 7.

Con estos resultados concluimos; A) que las variantes H5 y H57 representan virus viables, no defectivos, ya que aún después de tres purificaciones en placa mantuvieron su infectividad y crecimiento. B) que los segmentos rearrreglantes A y B funcionaban como templados para la transcripción de mRNA's cuyo tamaño

1
correspondía al del RNA del que se derivaban y, C) por las hibridaciones sabíamos que estos genes rearrreglados contenían exclusivamente secuencias del gene al que sustituían y no parecían ser estructuras mosaico que contuviesen secuencias de otros genes virales.

Sin embargo, aún no conocíamos cual era el mecanismo por el cual estos genes rearrreglados son capaces de sustituir de una manera funcional al gene silvestre. Una de las formas en las que intentamos explicar este fenómeno, fue a través de estudiar las proteínas que sintetizaban estas variantes durante una infección de células en cultivo, comparándolas con las proteínas sintetizadas por el virus silvestre; en estos experimentos, intentamos identificar dichas proteínas por su migración en geles de poliacrilamida. Desafortunadamente no fuimos capaces de obtener una respuesta clara en este tipo de experimentos ya que aparentemente las variantes estudiadas no son eficientes en "apagar" la síntesis de proteínas de la célula (a diferencia de la cepa silvestre) y por lo tanto las proteínas celulares no permiten distinguir claramente a las proteínas virales. No sabemos si este efecto sobre la síntesis de proteínas tenga alguna relación con la virulencia de estas variantes pero, al menos en cultivos celulares, ambas se comportan de manera similar al virus silvestre.

Los resultados de las hibridaciones sugerían que los segmentos A y B contenían exclusivamente secuencias de los genes 5 y 7 respectivamente y, por otro lado, el tamaño de los mRNAs provenientes de estos genes sugerían que, en caso de que las secuencias de los extremos actuaran como señales de inicio o terminación de la transcripción (como se ha sugerido, 39), estas no se encontraban duplicadas o no eran funcionales en los genes A y B. De esta manera, decidimos determinar la secuencia de los extremos 5' y 3' y del sitio en donde se daba el rearreglo o "concatemerización" del segmento B y estudiar si las secuencias de los extremos estaban o no duplicadas.

Los oligonucleótidos utilizados para secuenciar el extremo 3' del gene B se eligieron considerando regiones muy conservadas (últimos 84 nt del gene), de los genes homólogos de las cepas UK (76) y SA11 (8), ya que la secuencia de los genes 5 y 7 de la cepa Wa se desconocen. Por otro lado, la secuencia del extremo 5' se determinó con un oligonucleótido que se eligió a partir de la secuencia que determinamos del sitio adyacente al sitio de concatemerización en el gene 7 de H57, y que fue deducida con el oligonucleótido uk95.

En lo que respecta al gene 5 rearreglado, se eligieron tres oligonucleótidos tomando como base una sola secuencia previamente reportada (9a), con los cuales se intento determinar la region 3' no codificadora del segmento A. Ninguno de los tres oligonucleótidos fueron capaces de primar la secuencia del gene 5

o de su rearrreglo; no sabemos si fue por presencia de estructuras secundarias similares a las descritas cuando se probó el oligonucleótido uk95 con el segmento B ó, porque no hay conservación en la región correspondiente a dichos oligonucleótidos entre las cepas RF y Wa . Debido a que en genes homólogos, las regiones no codificadoras se encuentran muy conservadas (51, 77), pensamos que la primera explicación es mas probable.

En el esquema de la figura 10-B presentamos un resumen de los resultados que obtuvimos al secuenciar ciertas regiones del rearrreglo B comparándolo con el gene al que sustituye. Aparentemente, en base a la secuencia determinada y al tamaño del gene, este rearrreglo es el resultado de la duplicación parcial del gene 7, en el que se han perdido los últimos 103 nucleótidos 3' terminales del primer gene y los primeros 50 nucleótidos 5' terminales de la segunda copia.

Aunque no pudimos analizar la proteína codificada por este gene en células infectadas con la variante H57, suponemos que codifica por una proteína similar a la silvestre porque el codón de terminación se conserva en la misma posición que en el gene silvestre de la cepa UK. Es poco probable que este gene codifique por una segunda proteína, derivada de la región codificadora duplicada hacia el extremo 3', porque solamente se produce un mRNA a partir de ese gene y el marco de lectura ubicado hacia el extremo 3' se encuentra alterado con respecto al silvestre.

Se encontró que la secuencia del extremo 3' (incluyendo los últimos 221 nt del gene), en el segmento 8 y en el gene 7 de la cepa Wa se encuentran conservados (90% homólogos), y a su vez difieren un poco más con respecto a los genes equivalentes de las cepas UK y SA11 (85 y 72.8%, respectivamente). Si tomamos en cuenta los primeros 50 y los últimos 86 nt del gene, la homología entre los genes de las distintas cepas varía de 93 a 96.5%.

En virus con genoma segmentado deben existir secuencias comunes en todos los genes que los caracterizan como genes virales en el proceso de encapsidación y, secuencias particulares de cada gene que lo hace diferente del resto, de manera que una partícula viral infecciosa contiene una sola molécula de cada segmento. Estas "características propias" de cada segmento, en el caso del gene 7 de rotavirus, podrían estar incluidas en las regiones 1-50 y 992-1076 puesto que en los genes analizados en este trabajo, estas regiones se encuentran altamente conservadas, principalmente la región 3' (94-96% de homología) y son distintos a su vez de las secuencias 5' y 3' terminales de otros genes, con excepción de las secuencias consenso de 10 y 8 nt (situadas en los extremos 5' y 3' respectivamente). En los genes 11 de distintas cepas de rotavirus existe una homología mayor de 88 y 94% en las regiones 5' y 3' terminales (1-32 y 634-667 nt), respectivamente (51) y son distintas a su vez de las regiones terminales del gene 7.

Recientemente, se ha realizado la caracterización de dARNAs defectivos de un virus de la familia Reoviridae que produce tumores en plantas (WTV) (2) y se ha establecido que las señales necesarias para que el RNA se encapside están localizadas dentro de los primeros 319 y los últimos 205 nt de la cadena (+) de una molécula de 2.6 Kb (2, 79). Podría ser posible que en rotavirus, las señales de encapsidación ó, como se ha sugerido en otros estudios, las señales necesarias en la replicación y/o transcripción (39) se encuentren en las regiones que están altamente conservadas en el gene.

La estructura del gene 7 de la variante H57, determinada en este trabajo, posee las características que tienen en común los genes rearrreglados estudiados hasta ahora, es decir, el sitio de inserción se encuentra a 5 nt despues del codón de terminación; también, es notable que las secuencias de los extremos no se repiten en el sitio de concatamerización de dichos genes; probablemente, la posición de estas secuencias en los genes de rotavirus sea muy importante en algún proceso durante la replicación viral.

En base a la secuencia deducida del segmento B, se sabe que el oligonucleótido uk95 tiene al menos 2 sitios complementarios a lo largo del gene, sin embargo, solamente uno de ellos estuvo accesible a hibridar con el oligonucleótido cuando se realizó la secuencia; aquél que corresponde al sitio

adyacente a donde ocurre el rearreglo. La región complementaria a uk95 localizada hacia el extremo 3' no hibridó con él, lo cual parecía indicar que dicha secuencia estaba involucrada en alguna estructura muy estable, que le impedía interaccionar con el oligonucleótido. Para buscar esta posible estructura secundaria, se utilizó un programa desarrollado por Zuker (80), que predice la estructura secundaria mas estable. Analizamos, las secuencias de los genes 7 de las cepas UK (76) y SA11 (8), así como las secuencias de los genes de Wa y de la variante HS7, reportadas en el presente trabajo. En la mayoría de los casos analizados, se encontró una estructura que incluye los nucleótidos 998-1076, en la que no esta incluida la secuencia complementaria a uk95, pero que podría estar interfiriendo con la elongación de la cadena cuando se utiliza este oligonucleótido en el ensayo de secuencia; otra posibilidad es que el oligo uk95 no haya hibridado porque se forme otra estructura que no es aparente con el programa empleado, pero que exista en solución por el equilibrio dinámico de la molécula de RNA.

Cabe mencionar que una secuencia similar a la 3' consenso de los genes de rotavirus (ACATGACC, Figura 11) esta formando parte de la estructura secundaria mencionada, entre los nucleótidos 999 y 1006, sin embargo, no entendemos cual es el significado de este hallazgo.

En el virus WTV (con genoma segmentado de dcRNA) existen estructuras secundarias en el extremo 3' de algunos de sus genes que parecen estar involucradas en la regulación de la traducción (79), mientras que en el virus L-A de levadura, la formación de una estructura secundaria que involucra las últimas 30 bases del extremo 3' parece ser importante para una replicación óptima (producción de dcRNA a partir de mRNA) del templado (21). La función que pudiera tener esta posible estructura secundaria en el gene 7 de rotavirus se desconoce.

El fenómeno por el que se producen genes rearrreglados podría estar sucediendo continuamente y de manera favorable en algunos genes, durante el ciclo de replicación del virus, y sin embargo no son detectados a menos que se produzca un rearrreglo que tenga ventajas selectivas en el medio ambiente en que se produce, por ejemplo, que resulte más fácilmente encapsidable y/o replicable, tal como ocurre con los RNAs defectivos (35a). El cambio en una de las condiciones que mantienen el equilibrio de la población viral puede influir en el sobrecrecimiento de los genes rearrreglados que normalmente no se detectan pero que pueden estar presentes en la población. El estado inmune del huésped y la cantidad total de partículas virales presentes durante la infección se han reconocido como factores que afectan el equilibrio de una población de virus de RNA para el surgimiento de rearrreglos genómicos y de nuevas variantes virales (35, 71a).

También se ha visto que estos dos factores intervienen en la generación de rearrreglos genómicos en rotavirus (19, 37, 38, 63);

Para que los genes rearrreglados sobrecrezcan a los genes normales, es necesario que tengan una ventaja selectiva en el medio en que se producen. Considerando que existen secuencias duplicadas en los genes rearrreglados, podría suceder que las señales necesarias en la encapsidación se encuentren a sitios distantes de los extremos, y por lo tanto estarían duplicadas en los genes rearrreglados, favoreciendo así la encapsidación de éstos. En un virus de levadura (virus LA) con genoma segmentado de dcRNA, se encontró que algunas secuencias necesarias en la encapsidación y en el inicio de la replicación se localizan aproximadamente a 400 pb del extremo 3' (2). La presencia de secuencia ricas en A+T en genes 11 de ciertas cepas de patrones corto y supercorto (51, 60), aisladas de infecciones naturales, puede ser una ventaja selectiva para estos rotavirus en esas condiciones.

A través del estudio de variantes de rotavirus que poseen genes rearrreglados, se ha encontrado que los genes 3 (37, Dr. Pereira, resultados no publicados), 11 (38, 53, 63, 75, 74, 67), y el que codifica para la proteína NS34 (63) son los que con más frecuencia se han detectado en variantes viables, pero también se han observado rearrreglos en los genes 8 y 10 (38), que codifican para proteínas no estructurales y los genes 6 (63, presente trabajo) y 9 (presente trabajo), que codifican para proteínas

estructurales; aunque en estos dos últimos casos, no se aislaron variantes viables que los contuvieran, por lo que se dedujo que los genes rearrreglados no eran funcionales.

Durante los distintos pases de la cepa WAH, aparecieron algunos genes rearrreglados que desaparecieron posteriormente y, por la concentración relativa de los 11 segmentos de dcRNA, parecían provenir del gene 5; esto hace pensar que solamente algunos rearrreglos son estables, independientemente del gene del que provengan, codifique o no por una proteína estructural; pensamos que, mas bien, la presencia y el sobrecrecimiento de un gene rearrreglado en la población viral depende de su funcionalidad y no de la proteína por la que codifique. Sin embargo, cabe mencionar que, hasta ahora, no se ha reportado el aislamiento de variantes de rotavirus viables que posean genes de proteínas estructurales rearrreglados.

Johnson (40) ha reportado que los genes de rotavirus están sujetos a mecanismos de control a distintos niveles; así, ha demostrado que algunos genes se replican más que otros, lo cual es un indicio de su capacidad para encapsidarse. Entre los genes que se replican en mayor proporción se encuentran los que codifican para proteínas estructurales (excepto el que codifica para VP7), y los que codifican para las proteínas NS34 y NS26 (genes 7, 8 o 9, dependiendo de la cepa, y 11, respectivamente), infiriendo, por lo tanto, que éstos se encuentran de manera predominante en partículas virales no infecciosas. Como ya se

discutió, los genes rearrreglados podrían ser más fácilmente replicables y/o encapsidables y, por esa razón, son capaces de predominar en la población viral.

El mecanismo por el que se generan los rearrreglos genómicos en rotavirus no está claro, sin embargo, pudiera ser un mecanismo de "copy-choice" como el que se ha descrito para poliovirus (43) y coronavirus (5, 50) (ambos son virus con genoma de RNA), en el que la polimerasa viral detiene su síntesis en cierto momento, debido en algunos casos a estructuras secundarias (5), y cambia a otra molécula que también utiliza como templado, aunque no exista homología en ese sitio entre los dos templados (43). La formación de genes rearrreglados en rotavirus pudiera ser un defecto en la replicación del genoma en el que la polimerasa viral detiene su síntesis y "salta" para reiniciar sobre el mismo templado o pudiera ser el resultado de un evento de replicación en el que 2 moléculas de mRNA del mismo gene se encapsidan en una sola partícula con actividad de replicasa y de alguna manera se favorece que ambos sean utilizados parcialmente como templados. A pesar de que se han caracterizado varios genes rearrreglados funcionales de rotavirus y se conoce su estructura, no se ha podido deducir, en base a ella, el mecanismo de su formación, lo cual sería de gran utilidad para conocer cómo se replica el genoma de los rotavirus. De acuerdo al esquema de la figura 3-B, los rearrreglos de rotavirus podrían ser el resultado de un mecanismo tipo "copy choice" o de un rearrreglo genómico complejo que pudo ocurrir en varios pasos.

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

Comparando distintos genes 11 rearrreglados de cepas aisladas de la naturaleza, se observó que la homología entre las regiones "duplicadas" de estos genes variaba entre 80 y 91% (30, 31, 51). En la comparación de una región de 122 nucleótidos (855-972), que están "duplicados" en el segmento B de la variante H57, se observó una homología de 90%; este resultado hace pensar que la región duplicada ubicada hacia el extremo 3' soporta más cambios de nucleótidos porque puede ser no funcional, lo cual se ha observado en otros virus de RNA (35, 49). Sin embargo este hecho estaría en desacuerdo con reportes previos en los que se demostró, por estudios con los genes 4, 6 y 9, que los rotavirus son genéticamente estables tanto en cultivos celulares (3a), como en la naturaleza (23a). A pesar de los cambios mencionados, es notable que los últimos 86 nt conservan una homología muy alta (más de 94%), entre las cepas de rotavirus de distinto origen, por lo que pensamos que esta región puede tener una función muy importante durante la replicación del virus.

Recientemente, Nuttal (60) y Matsui (51) reportaron la secuencia de genes homólogos al gene 11 en cepas de patrón corto (RV5 y DS-1) y supercorto (B37 y 69M), en las cuales se observó una cosa no vista antes en ningún gene de rotavirus: existe una región 3' no codificadora muy extensa de 189 y 322 nt en cepas de patrón corto y supercorto, respectivamente. Estas secuencias podrían ser parte de otro gene de rotavirus; aunque también existe la posibilidad de que estos genes de rotavirus sean el

resultado de un proceso de recombinación entre los rotavirus y secuencias de un origen distinto; algunos ejemplos de este fenómeno son:

- 1). Una región del mRNA-2 del virus de hepatitis de ratón, que pertenece al grupo de coronavirus, contiene una gran homología con el gene HA-1 del virus de influenza C, por lo que se planteó un evento de recombinación no homóloga entre los dos virus, ya que ambos pueden infectar el mismo tipo de células en la naturaleza (49).
- 2). La homología existente entre algunas regiones del genoma del virus de Encefalitis Equina del Oeste (WEEV) con respecto al virus Sindbis y al virus de Encefalitis Equina del Este (EEEV), ambos de la misma familia pero que predominan en regiones geográficas diferentes, también ocasionó que se le considerara a WEEV como un virus recombinante (33) y, finalmente,
- 3). Se han encontrado RNAs defectivos del virus Sindbis que contienen secuencias casi idénticas al tRNA-Asp celular (58a).

La aparición de rearrreglos genómicos similares a los descritos en el presente trabajo, solamente ha sido reportada en los grupos de rotavirus y de orbivirus (18), que pertenecen a la misma familia. Existen muchas interrogantes respecto a los mecanismos de replicación y encapsidación de los rotavirus; el estudio y la caracterización molecular de los genes rearrreglados de rotavirus, incluyendo aquellos que no son estables, pudiera ser útil para contestar algunas de estas interrogantes.

Conclusiones.

- La generación de genes rearrreglados de rotavirus *in vitro* es independiente de la mo1 utilizada, sin embargo, sí parece ser importante la cantidad total de partículas virales.

- Los rotavirus tienen la capacidad para encapsidar y replicar por lo menos un 12% extra de su material genético.

- Aparentemente solo algunos genes rearrreglados tienen ventajas selectivas, bajo ciertas condiciones, sobre los genes silvestres.

- La estructura del gene 7 rearrreglado es similar a la de otros genes rearrreglados estudiados hasta ahora; consiste de una duplicación parcial en la que se ha perdido las regiones no codificadoras del extremo 3' de un gene y 5' del otro gene; aparentemente, sólo una copia es funcional.

- Las secuencias de los extremos 5' y 3' de los genes 7 de distintas cepas, incluyendo la variante H57, se encuentran muy conservados. Probablemente, en estas regiones se encuentren las señales necesarias para encapsidar estos genes.

- Con los datos obtenidos no es posible deducir el mecanismo de generación de los rearrreglos.

BIBLIOGRAFIA

1. Allen, A.M., U. Desselberger. Reassortment of Human rotaviruses carrying rearranged genomes with bovine rotavirus. *J. Gen. Virol.* 66: 2703-2714 (1985).
2. Anzola, J.B., et al. Segment-specific inverted repeats found adjacent to conserved terminal sequences in Wound Tumor Virus genome and defective interfering RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 8301-8305 (1987).
3. Arias, C.F., et al. Gene protein products of SA11 simian rotavirus genome. *J. Virol.* 41: 42-50 (1982).
- 3a. Arias, C.F., et al. Heterogeneity in base sequence among different DNA clones containing equivalent sequences of rotavirus double-stranded RNA. *J. Virol.* 57: 1207-1209 (1986).
4. Au, K.S., et al. Receptor Activity of Rotavirus Nonstructural Glycoprotein NS28. *J. Virol.* 63:4553-4562 (1989).
5. Baric, R.S., et al. Analysis of intracellular small RNAs of Mouse Hepatitis Virus. Evidence for discontinuous transcription. *Virology* 156: 342-354 (1987).
6. Bass, D., et al. NS35 and not VP7 is the soluble rotavirus protein wich bind to target cells. *J. Virol.* en prensa.
- 6a. Bellinzoni, R.C., et al. Isolation of Group A swine rotaviruses displaying atypical electropherotypes. *J. Clin. Microbiol.* 25: 952-954 (1987).
7. Biryahwaho, B., et al. Bovine rotavirus with rearranged genomes reassorts with human rotavirus. *Arch. Virol.* 96: 257-264 (1987).
8. Both, G.W., et al. Nucleotide sequence of the dsRNA genomic segment 7 of simian 11 rotavirus. *Nucl. Acid Res.* 12: 1621-1626 (1984).
9. Boyle, J.F., K.V. Holmes. RNA-Binding Proteins of Bovine Rotavirus. *J. Virol.* 58: 561-568 (1986).
- 9a. Bremont, M., et al. Nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding the nonstructural protein NCVP2 of bovine rotavirus. *Virology* 161: 138-144 (1987).
10. Burns, J.W., et al. Biological and Immunological Characterization of a Simian Rotavirus SA11 variant with an altered genome segment 4. *Virology* 169: 427-435. (1989).

11. Chasey, D. Different Particle types in Tissue Culture and Intestinal Epithelium Infected with Rotavirus. *J. Gen. Virol.* 37: 443-451 (1977).
12. Chen, D., et al. Phenotypes of rotavirus reassortants depend upon the recipient genetic background. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 3743-3747 (1989).
13. Christensen, M.L. Human Viral Gastroenteritis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2: 51-89 (1989).
- 13a. Clark, B., U. Desselberger. Myristilation of Rotavirus Proteins. *J. Gen. Virol.* 69: 2681-2686 (1988).
- 13b. Clark, H.F., et al., Rotavirus isolate WI61 representing a presumptive new human serotype. *J. Clin. Microbiol.* 25: 1757-1762 (1987).
14. Cohen, J., et al. Activation of Rotavirus RNA Polymerase by calcium chelation. *Arch. Virol.* 60: 177-186 (1979).
15. Cohen, J., et al. Nucleotide sequence of Bovine Rotavirus gene 1 and expression of the gene product in Baculovirus. *Virology* 171: 131-140 (1989).
16. Desselberger, U., et al. The 3' and 5' terminal sequences of influenza A, B and C virus RNA segments are highly conserved and show partial inverted complementary. *Gene* 8: 315-328 (1980).
17. De Zoysa, I., R.G. Feachen. Interventions for the control of Diarrhoeal diseases among young children: rotavirus and cholera immunization. *Bull. WHO* 63(3): 569-583 (1985).
18. Eaton, B.T., A.R. Gould. Isolation and characterization of orbivirus genotypic variants. *Virus Res.* 6: 363-382 (1987).
19. Eiden, I., et al. Rotavirus RNA variation during chronic infection of immunocompromised children. *Fed. Infect. Dis.* 4: 632-637 (1985).
- 19a. Enani, M., et al. A measles virus subgenomic RNA. Structure and generation mechanism. *Virology* 171: 427-433 (1989).
20. Espejo, R.T., et al. Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and the effect of trypsin. *J. Virol.* 37: 156-160 (1981).
21. Esteban, R., et al. Internal and terminal cis-acting sites are necessary for in vitro replication of the L-A double-stranded RNA virus of yeast. *EMBO* 8: 947-954 (1989).
22. Flores J., et al. Genetic relatedness among human rotaviruses as determined by RNA hybridization. *Infect. Immun.* 37: 648-655 (1982).

23. Flores J., et al. Genetic relatedness among human rotaviruses. *J. Med. Virol.* 17: 135-143 (1985).
- 23a. Flores, J., et al. Genetic stability of rotaviruses recovered from asymptomatic neonatal infections. *J. Virol.* 62: 4778-4781 (1988).
24. Fukudome, K., et al. Comparison of Human, Simian and Bovine Rotaviruses for Requirement of Sialic Acid in Hemagglutination and Cell Adsorption. *Virology* 172: 196-205 (1989).
25. Fukuhara, N., et al. Role of VP3 in human rotavirus internalization after target cell attachment via VP7. *J. Virol.* 62: 2209-2218 (1988).
26. Gallegos, C.O., J.T. Patton. Characterization of rotavirus replication intermediates: A model for the Assembly of single shelled particles. *Virology* 172: 616-627 (1989).
27. Gombold, J.L., R.F. Ramig. Analysis of Reassortment of Genome Segments in Mice Mixedly Infected with Rotaviruses SA11 and RRV. *J. Virol.* 57: 110-116 (1986).
28. Gombold, J.L., R.F. Ramig. Assignment of Simian Rotavirus SA11 Temperature-Sensitive Mutant Groups A, C, F and G to genome Segments. *Virology* 161: 463-473 (1987).
29. Gombold, J.L., R.F. Ramig. Passive immunity modulates genetic reassortment between rotaviruses in mixedly infected mice. *J. Virol.* 63: 4525-4532 (1989).
30. Gonzalez, S.A., et al. Structure of Rearranged Genome Segment 11 in two different rotavirus strains generated by a similar mechanism. *J. Gen. Virol.* 70: 1329-1336 (1989).
31. Gorziglia, M., et al. Evidence of Duplication and Deletion in supershort segment 11 of rabbit Rotavirus Alabama strain. *Virology* 170: 587-590 (1989).
32. Graham, A., et al. Reassortment of Human Rotavirus possessing Genome rearrangements with Bovine rotavirus. Evidence for Host selection. *J. Gen. Virol.* 68: 115-122 (1987).
33. Hann, C.S., et al. Western equine encephalitis virus is a recombinant virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5997-6001 (1988).
34. Helmberger-Jones, M., J.T. Patton. Characterization of Subviral particles in cells infected with Simian rotavirus SA11. *Virology* 135: 655-665 (1986).
35. Holland, J., et al. Rapid Evolution of RNA genomes. *Science* 215: 1577-15854 (1982).

35a. Holland, J., Generation and Replication of Defective viral Genomes, en *Virology*, B.N. Fields ed, Raven Press, N.Y., 1985, pp 77-99.

36. Hoshino, Y., et al. Independent segregation of two antigenic specification (VP3 and VP7) involved in neutralization of rotavirus infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 82: 8701-8704 (1985).

37. Hundley, F., et al. Genome rearrangements of bovine rotavirus after serial passage at high multiplicity of infection. *Virology* 143: 88-103 (1985).

38. Hundley, F., et al. Heterogeneity of Genome rearrangements in Rotaviruses isolated from a chronically infected immunodeficient child. *J. Virol.* 61: 3365-3372 (1987).

39. Imai, M., et al. Capped and conserved terminal structures in Human Rotavirus genome double-stranded RNA segments. *J. Virol.* 47: 125-136 (1983).

40. Johnson, M.A., M.A. McCrae. Molecular Biology of Rotaviruses VIII. Quantitative Analysis of Regulation of Gene expression during virus replication. *J. Virol.* 63: 2048-2055 (1989).

41. Kantharidis, P., et al. Nucleotide sequence of UK bovine rotavirus segment 4: Possible Host Restriction of VP3 genes. *Virology* 166: 308-315 (1988).

42. Kapikian, A.Z., R.M. Chanock, Rotaviruses pp 863-906 en B.N. Fields ed. *Virology*, Raven Press, N.Y. 1985.

43. Kirkegaard, K., D. Baltimore. The Mechanism of RNA Recombination in Poliovirus. *Cell* 47: 433-443 (1986).

44. Kruys, V., et al., Translational blockade imposed by cytokine-derived UA-rich sequences. *Science* 245: 852-855 (1989).

44a. Kuge, S., et al. Primary structure of poliovirus Defective interfering particle genomes and possible generation mechanisms of the particles. *J. Mol. Biol.* 192: 473-487 (1986).

45. Kumar, A., et al., Nucleotide sequence of the gene encoding for the RNA-binding protein (VP2) of RF bovine rotavirus. *Nucl. Acid Res.* 17: 2126 (1989).

46. Liu, M., et al. Identification of the Simian Rotavirus SA11 genome segment 3 product. *Virology* 163: 26-32 (1988).

46a. Lizardi, P., Methods for preparation of messenger RNA. en *Methods of Enzymology*, vol 96, Academic Press, 1983, pp 24-38.

47. Lopez, S., et al., Primary Structure of the cleavage site associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. *Virology* 144: 11-19 (1985).
48. Lopez S., et al. Conservation in rotaviruses of the protein region containing the two sites associates trypsin enhancement of Infectivity. *Virology* 154: 224-227. (1986).
49. Luytjes, W., et al. Sequences of Mouse hepatitis virus A59 mRNA2: Indications for RNA recombination between coronaviruses and influenza C virus. *Virology* 166: 415-422 (1988).
50. Makino, S., et al. High-frequency RNA recombination of murine coronavirus. *J. Virol.* 57: 729-737 (1986).
- 50a. Makino, S., et al., Primary structure and translation of a defective interfering RNA of murine coronavirus. *Virology* 166: 550-560 (1988).
51. Matsui, S.M., et al. Sequence analysis of gene 11 equivalents from short and supershort strains of rotavirus. *J. Virol* 64: en prensa (1990).
52. Matsui, S., et al. Molecular determinant of rotavirus neutralization and protection. *Adv. Virus Res.* 36: 181-214 (1989).
- 52a. Matsuno, S., et al., Characterization of a human rotavirus strain which is possibly a naturally-occurring reassortant virus. *Virus Res.* 10: 167-175 (1988).
53. Mattion, N., et al. Rearrangement of Genomic Segment 11 in two swine rotavirus strains. *J. Gen. Virol.* 69: 695-698 (1988).
54. McCrae, M., G.P. Faulkner-Valle. Molecular Biology of rotavirus I. Characterization of Basic Growth Parameters and Pattern of Macromolecular Synthesis. *J. Virol.* 39: 490-496 (1981).
55. McIntyre, M., et al. biophysical characterization of Rotavirus particles containing rearranged genomes. *J. Gen. Virol.* 68: 2961-2966 (1987).
56. McNulty, M.S. Rotaviruses. *J. Gen. Virol.* 40: 1 (1978).
57. Meyer, J.C., et al. Interaction of rotavirus cores with the Nonstructural Glycoprotein NS28. *Virology* 171: 98-107 (1989).
58. Midthun, K., et al. Reassortant Rotavirus as potential live rotavirus vaccine candidates. *J. Virol.* 53: 949-954 (1985).
- 58a. Monroe, S., S. Schlesinger, Common and distinct regions of defective interfering RNAs of Sindbis virus. *J. Virol.* 49: 865-872 (1984).

59. Nakagomi, O., Nakagomi T. RNA-RNA hybridization identifies a human rotavirus that is genetically related to feline rotavirus. *J. Virol.* 63: 1431-1434 (1989).
60. Nuttall, S.T., et al. Sequences of VP9 genes from short and supershort rotavirus strains. *Virology* 171: 453-457 (1989).
61. Patton, J.T., C.O. Gallegos. Structure and protein composition of the rotavirus replicase particle. *Virology* 166: 358-365 (1988).
62. Patton, J.T. Synthesis of simian rotavirus SA11 double-stranded RNA in a cell-free system. *Virus Res.* 6: 217-233 (1986).
63. Pedley, S., et al. The genomes of rotaviruses isolated from chronically infected immunodeficient children. *J. Gen. Virol.* 65: 1141-1150 (1984).
64. Perrault, J., Origin and replication of defective interfering particles. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 93: 151-207 (1981).
65. Petrie, B.L., et al. Effects of tunicamycin on rotavirus morphogenesis and infectivity. *J. Virol.* 46: 270-274 (1983).
66. Petrie, B.L., et al. Identification of Rotavirus Particle types. *Intervirology* 16: 20-28 (1981).
67. Pocock, D.H. Isolation and characterization of two group A rotaviruses with unusual genome profiles. *J. Gen. Virol.* 68: 653-660 (1987).
- 67a. Ruiz, A.M., Caracterización antigénica y molecular del rotavirus porcino YM, un posible nuevo serotipo de rotavirus. Tesis de Maestría, FES-C, UNAM, 1988.
68. Sabara, M., et al. Preliminary characterization of an epitope involved in neutralization and cell attachment that is located on the major bovine rotavirus glycoprotein. *J. Virol.* 59: 58-66 (1985).
69. Sandino, A.M., et al. Role of the Inner Protein capsid on in vitro human rotavirus transcription. *J. Virol.* 60: 797-802 (1986).
70. Sato, T., et al. Effect of trypsin and chymotrypsin on polypeptides of Human rotavirus KUN strain. *Med. Microbiol Immunol.* 176: 65-73 (1987).
71. Stacy-Phipps, S., J.T. Patton. Synthesis of Plus and Minus-Strand RNA in rotavirus-infected cells. *J. Virol.* 61: 3479-3484 (1987).

- 71a. Steinhauer, D.A., J.J. Holland. Rapid evolution of RNA viruses. *Ann. Rev. Microbiol.* 41: 409-433 (1987).
72. Stoeckle, M.Y., et al. Segment Specific and common nucleotide sequences in the noncoding regions of influenza B virus genome RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 2703-2707 (1987).
73. Suzuki, H., et al. Effect of tunicamycin on human rotavirus morphogenesis and infectivity. *Arch. Virol.* 81: 363-369 (1984).
74. Tanaka, T.N., et al. Molecular characterization of three rabbit rotavirus strains. *Arch. Virol.* 98: 253-265 (1988).
75. Thouless, M.E., et al. Isolation of two lapine rotaviruses: Characterization of their subgroup, serotype and RNA electropherotypes. *Arch. Virol.* 89: 161-170 (1986).
76. Ward, C.W., et al. Nucleotide sequence of gene segment 9 encoding a nonstructural protein of UK bovine rotavirus. *Virology* 134: 249-253 (1984).
77. Ward, C.W., et al. Structural homologies between RNA gene segments 10 and 11 from UK bovine, SA11 simian, and human Wa rotaviruses. *Virology* 144: 328-336 (1985).
78. Welch, S.K.W., et al. Rotavirus SA11 genome segment 11 protein is a Nonstructural phosphoprotein. *J. Virol.* 63: 3974-3982 (1989).
- 78a. Wyatt, R.G., et al., Direct isolation in cell culture of human rotaviruses and their characterization into four serotypes. *J. Clin. Microbiol.* 18: 310-317 (1983).
79. Xu, Z., et al. The 3' terminal sequence of a Wound Tumor virus transcript can influence conformational and Functional Properties Associated with the 5'-terminus. *Virology* 170: 511-522 (1989).
80. Zuker, M., F. Stiegler. Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. *Nucl. Acid Res.* 9: 133-148 (1981).