



61
2ej.

RECIBO EN
BIBLIOTECA
AL 30
ATZ

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ANÁLISIS DE VARIANTES ANTIGÉNICAS DE LA
CEPA PORCINA YM UTILIZANDO ANTICUERPOS
MONOCLONALES NEUTRALIZANTES.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIOLOGO

P R E S E N T A

SUSANA GARCIA MENDEZ

DIRECTOR DE TESIS: Dr. ERNESTO MENDEZ SALINAS

MEXICO D.F.

1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE

Jefe de la División de Estudios Profesionales

Facultad de Ciencias

Presente

Los abajo firmantes, comunicamos a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Tesis que realiz(ó)ron la pasante(s) García Méndez Susana.

con número de cuenta 8431918-4 con el Título: _____

"Análisis de variantes antigénicas de la cepa porcina YM utilizando anticuerpos monoclonales neutralizantes".

Otorgamos nuestro **Voto Aprobatorio** y consideramos que a la brevedad deberá presentar su Examen Profesional para obtener el título de Bióloga.

GRADO	NOMBRE(S)	APELLIDOS COMPLETOS	FIRMA
DOCTOR	Ernesto Méndez Salinas		
Director de Tesis			
DOCTOR	Luis Medrano González		
DOCTOR	René de Jesús Cárdenas Vázquez		
M. EN C.	Victor Manuel Valdés López		
Suplente			
M. EN C.	Juan Carlos Gaytán Oyarzun		
Suplente			

Dedico este trabajo....

A mis padres Ruth Méndez y Fidel García

A mi abuelita Dolores Salazar

A mis hermanos Alejandro y Patricia

A Iván y Omar por su amor y comprensión

A mis sobrinos Yuneili, Adair y Giovanni

A mis amigos

AGRADECIMIENTOS

En estas líneas deseo manifestar mi sincero agradecimiento a todas las personas que de manera directa ó indirecta me ayudaron en este trabajo, muy especialmente a:

El Dr. Ernesto Méndez S., por depositar en mi su confianza al hacerse cargo de la dirección de este trabajo. Por el gran apoyo que siempre me ha brindado.

El M en C. Luis Padilla N., por las sugerencias hechas al mejoramiento de este trabajo.

A los Drs. Carlos Arias y Susana López, jefes del laboratorio donde se realizó este trabajo, por las facilidades otorgadas para la realización del mismo.

Los miembros del jurado: Dr. René J. Cardenas V., Dr. Luis Medrano G., M. en C. Victor M. Valdés y M. en C. Juan C. Gaytan O., quienes aceptaron revisar y corregir este trabajo, gracias por sus sugerencias y comentarios a todos ellos.

A todos los compañeros de mi laboratorio que de una u otra forma me brindaron su ayuda.

Reiterando mi agradecimiento, a todos ellos...

GRACIAS.

INDICE

RESUMEN.....	1
ABREVIATURAS.....	3
INTRODUCCION.....	4
ANTECEDENTES.....	14
OBJETIVOS.....	17
METODOS.....	18
RESULTADOS.....	30
DISCUSION.....	38
CONCLUSIONES.....	43
BIBLIOGRAFIA.....	44

RESUMEN

Los rotavirus son la causa más frecuente de gastroenteritis viral en niños menores de 2 años y en cachorros de varias especies animales. El virión se encuentra formado por un genoma compuesto de 11 segmentos de RNA de doble cadena (dcRNA), rodeado por tres capas concéntricas de proteínas. La capa externa del virión esta formada por las proteínas VP4 y VP7, que están involucradas en las primeras interacciones del virus con su célula huésped, aunque el papel exacto de cada una de ellas durante la adsorción y penetración del virus no es muy claro.

Recientemente, se aisló una cepa de rotavirus a partir de heces de cerditos con diarrea y se le denominó YM. Debido a que el virus YM adaptado a replicarse en cultivos celulares produce diarreas en cerditos, esta cepa tiene un uso potencial en experimentos para evaluar protección contra los rotavirus. Así, la cepa YM fue adoptada como modelo de estudio en el laboratorio de los Dres. C. Arias y S. López. Como parte de la caracterización del virus YM, en este laboratorio se produjeron anticuerpos monoclonales que neutralizan la infectividad del virus y que, por lo tanto, podrían estar dirigidos contra cualquiera de las proteínas de capa externa.

Este trabajo consistió en seleccionar variantes antigénicas que escapan a la neutralización con los anticuerpos monoclonales

previamente producidos contra la cepa YM de rotavirus. Las variantes antigénicas seleccionadas podrían tener modificada(s) alguna(s) función (es) de las proteínas de capa externa, de manera que fueran capaces de infectar a la célula huésped en presencia del anticuerpo monoclonal, a diferencia del virus silvestre. Durante este trabajo se analizaron algunas funciones del virus asociadas a la proteína VP4, lo cual podría ser de utilidad para reconocer regiones de esta proteína directamente involucradas en alguna de esas funciones. No se encontró diferencia entre el virus silvestre y las variantes antigénicas en cuanto a su capacidad para hemaglutinar, para formar placas de lisis, su sensibilidad a tripsina y su replicación; sin embargo, existió una ligera diferencia en cuanto a los requerimientos para adsorberse e infectar células con menor contenido de ácidos siálicos, que ha sido reconocido como el principal componente de la molécula receptora para rotavirus de origen animal en cultivos celulares.

En base a la reactividad de los anticuerpos monoclonales con el virus silvestre y las variantes seleccionadas, se determinó que varios anticuerpos monoclonales pueden reconocer epítopes relacionados, lo cual deberá confirmarse por secuencia del gene que codifica para VP4 en las variantes.

ABREVIATURAS

ELISA: Ensayo inmuno enzimático.

gph: Glicoforina A.

HA: Hemaglutinación.

HI: Inhibición de la hemaglutinación.

MAbs: Anticuerpos monoclonales.

NA: Neuraminidasa.

INTRODUCCION

GENERALIDADES

Los rotavirus son los agentes virales más comunes que producen gastroenteritis aguda en niños menores de 2 años de edad, ocasionando en algunos casos la muerte por deshidratación; de igual manera, estos virus infectan crías de muchas especies animales de interés económico, por lo que resultan de gran importancia médica y veterinaria, tanto en países desarrollados como en subdesarrollados (9).

Los rotavirus se descubrieron en 1973 por Bishop a partir de biopsias duodenales de niños hospitalizados por gastroenteritis aguda no bacteriana (3). Previamente, varios autores habían reportado que algunas enfermedades diarreicas en animales se debían a la infección por virus.

En 1974 fue sugerido el nombre de rotavirus (del latín rota=rueda), con base en la forma de rueda de carreta que presentaban las partículas virales al microscopio electrónico (11) y en 1979 se aceptó a los rotavirus como género, dentro de la

familia *Reoviridae*.

La estructura tridimensional de las partículas de rotavirus se determinó por estudios de microscopía electrónica y técnicas de procesamiento de imágenes (35). Estos virus poseen una cápside proteica de estructura icosaédrica compleja de aproximadamente 75 nm. de diámetro. El virus maduro está compuesto por tres capas concéntricas de proteínas dentro de las cuales se encuentra el genoma viral, constituido, a su vez, por 11 segmentos de RNA de doble cadena; a cada segmento se le ha asignado un número de acuerdo al orden de migración en geles de poliacrilamida, siendo el segmento 1 el de mayor peso molecular (3302 pares de bases) y el segmento 11 el de menor peso molecular (667 pares de bases). Cada cepa de rotavirus posee un genoma con un patrón de migración característico (9).

Cada segmento de RNA representa un gene que codifica para una sola proteína. El peso de las proteínas virales varía entre 20 y 125 Kd. Las proteínas estructurales son aquellas que conforman al virión maduro y son VP1, VP2 y VP3 que forman la nucleocápside, VP6 que se encuentra formando la capa intermedia y las proteínas VP4 y VP7 que forman la capa externa (Figura 1).

Durante la infección con rotavirus se producen, además de las proteínas estructurales, proteínas virales que se localizan solamente en células infectadas, por lo que se les ha llamado "no

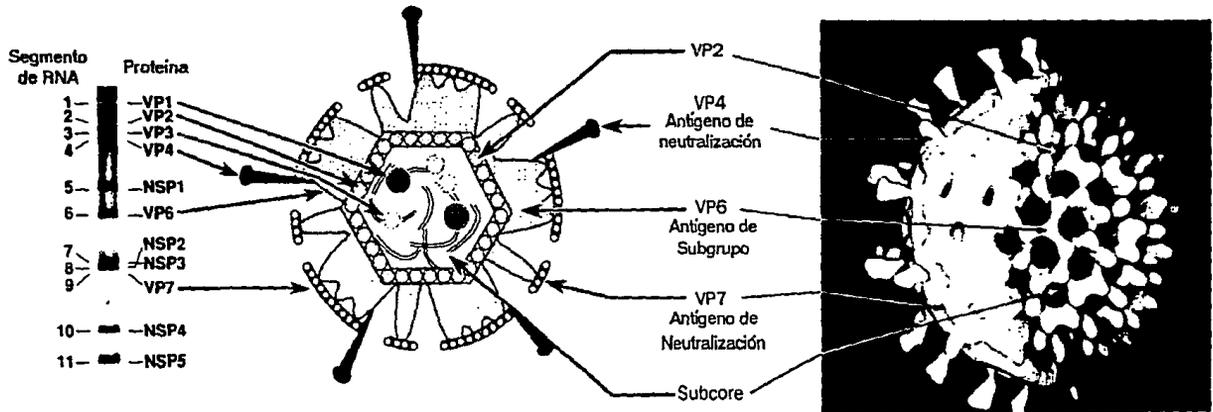


FIGURA 1. Representación esquemática de rotavirus, genoma y proteínas estructurales. En el lado izquierdo de la figura se representan los 11 segmentos de dsRNA que forman el genoma de rotavirus, así como las proteínas codificadas por estos. Al centro se esquematizan las tres capas concéntricas que forman la partícula viral; la capa exterior la forman las proteínas VP4 y VP7, la intermedia la proteína VP6, y la interna VP2 (M. K. Estes. Fourth International Symposium on Double-Stranded RNA Viruses. 1992.).

estructurales"; de acuerdo al peso molecular aparente de cada una de ellas se han denominado NSP1 (producto del gene 5), NSP2 y NSP3 (productos de los genes 7,8 ó 9, dependiendo de la cepa), NSP4 (gene 10) y NSP5 (gene 11). Las proteínas no estructurales tienen una función importante en los procesos de replicación del genoma viral y el ensamblaje de las partículas virales durante la infección (9).

In vivo, los rotavirus infectan células epiteliales localizadas en las puntas de las microvellosidades del intestino delgado; sin embargo, los rotavirus pueden infectar varias líneas celulares de origen epitelial provenientes de diferentes tejidos (21). La mayoría de los avances en el conocimiento de los rotavirus se han realizado utilizando estas líneas celulares.

Las proteínas de la nucleocápside VP1, VP2 y VP3, parecen tener una función importante durante la transcripción del genoma viral. Algunas regiones de aminoácidos de VP1 presentan similitud con regiones que se encuentran conservados en RNA polimerasas dependientes de RNA; por lo que se piensa que VP1 pudiera ser la polimerasa viral (30, 47). Recientemente se ha demostrado que la proteína VP3 une GTP, por lo que se ha propuesto que ésta podría tener la función de guanililtransferasa, responsable de añadir 7-metil guanosina (cap) al extremo 5' del RNA (25). Aunque VP2 no se ha asociado hasta ahora con alguna actividad enzimática, se piensa

que las tres proteínas están involucradas en procesos de replicación y transcripción del genoma viral, por encontrarse presentes en partículas subvirales que presentan esta actividad (14).

La proteína VP6, codificada por el gene 6, es la más abundante en el virión, representando aproximadamente el 51% de la masa total de éste; VP6 tiene un peso molecular aproximado de 45 Kd y está en forma de trímeros en el virus; la función de esta proteína no es muy clara pero se ha visto que es indispensable para que las partículas que carecen de la capa externa produzcan las moléculas de mRNA, por lo que se le ha asociado con la actividad de transcriptasa (9). VP6 contiene el(los) epítipo(s) que definen los grupos entre rotavirus (A al F). Cabe mencionar que los rotavirus del grupo "A" (los más estudiados hasta ahora por ser de mayor importancia epidemiológica), se han clasificado en 14 serotipos (denominados por la letra G), en base a ensayos de neutralización de la infectividad de virus adaptados a crecer en cultivos celulares con sueros hiperinmunes producidos contra estos virus (9).

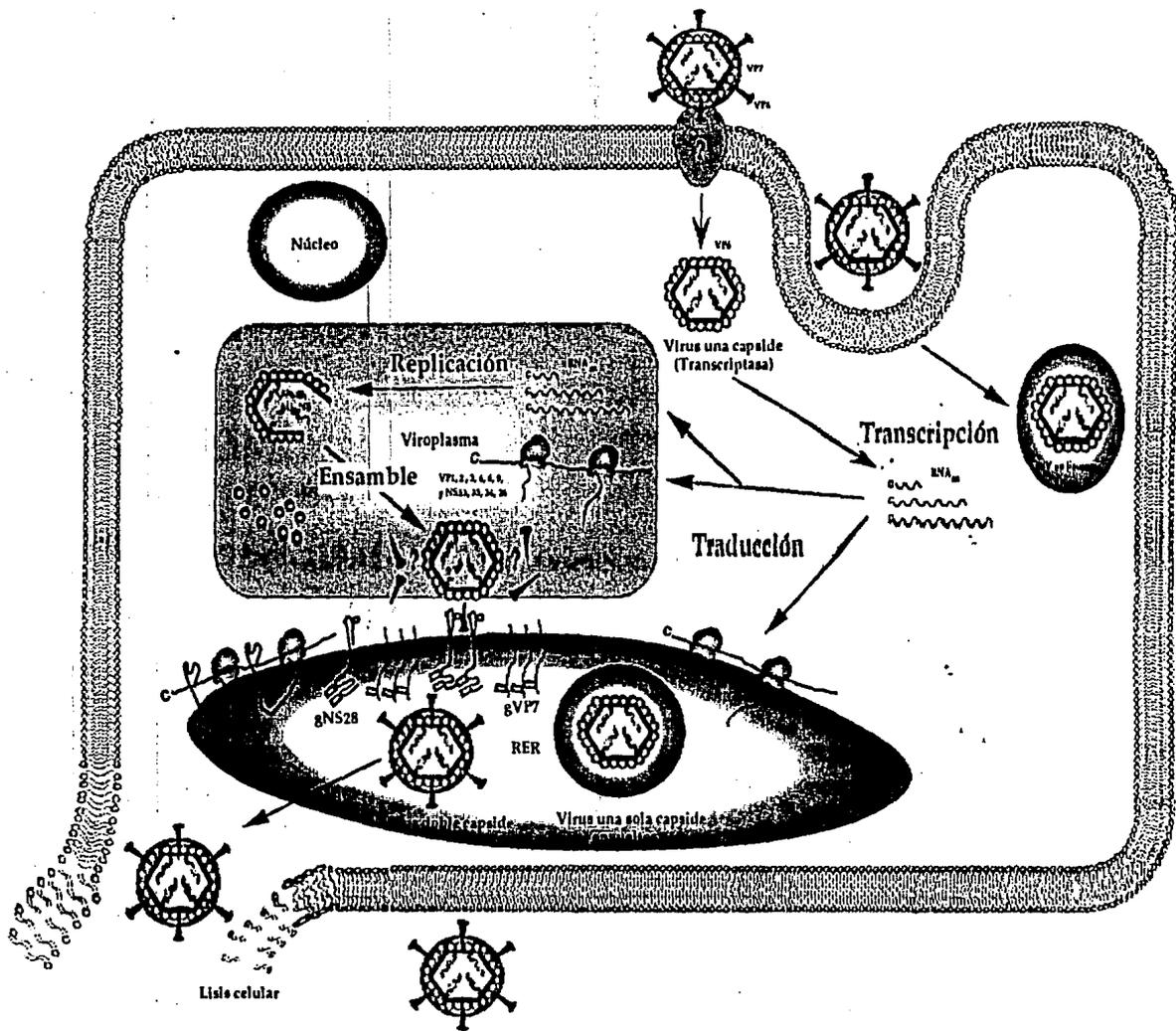
Las proteínas de capa externa VP4 y VP7 son necesarias para una infección productiva, ya que las partículas que carecen de ésta no son infecciosas. Las características de estas proteínas y las funciones que han sido asociadas con ellas se describirán más adelante.

CICLO DE REPLICACION

La replicación de los rotavirus se lleva a cabo en el citoplasma de las células infectadas. El primer paso durante la infección productiva es la adsorción del virus a la célula huésped a través del reconocimiento entre una proteína presente en la partícula viral y una molécula receptora localizada sobre la membrana celular. Se sabe que la molécula receptora para rotavirus de origen animal contiene residuos de ácido siálico; sin embargo todavía no es claro cual de las dos proteínas de capa externa está involucrada en el pegado a la célula (13, 37, 39).

El siguiente paso de la infección es la penetración y desencapsidación del virus. Se ha propuesto que los rotavirus penetran a través de dos mecanismos: 1) cuando el virus es cortado con tripsina, entra por penetración directa y se produce una infección productiva y 2) cuando los viriones no son cortados con tripsina, el virus entra a la célula por endocitosis y no se produce progenie viral (9, 20) (Figura 2).

Una vez infectada la célula, comienza el proceso de transcripción (dcRNA \longrightarrow mRNA). La síntesis de mRNA viral es ocasionada por las partículas virales que carecen de capa externa (14). Las moléculas de mRNA (cadena+) virales sirven como templatado tanto para la traducción de proteínas como para la producción de la



Virus maduros Infectivos

cadena negativa del RNA genómico.

Después de la transcripción y de la traducción, comienzan dos procesos simultáneamente: el ensamblado de la partícula viral y la replicación del genoma (mRNA \longrightarrow dcRNA) (33,34). Estos procesos se llevan a cabo en una región densa que se observa en el citoplasma de las células infectadas, denominada viroplasma. Una vez que el proceso de replicación del genoma viral ha terminado, las partículas aún en formación migran hacia la membrana del retículo endoplásmico, a través de la cual geman a su interior; durante este tránsito, adquieren una cubierta membranal que pierden posteriormente, adquiriendo las proteínas de la cápside externa y completando el proceso de maduración. Las partículas virales maduras son liberadas por lisis celular (9).

La infección simultánea de una célula con dos cepas de rotavirus diferentes, resulta en la producción de virus rearreglantes o reasociantes, que contienen una mezcla de genes de ambos padres. La generación de virus reasociantes ha sido una herramienta de gran utilidad en el estudio de los rotavirus para el asignamiento génico y, cuando los virus padres poseen características diferentes, para definir funciones de ciertas proteínas.

El interés en el estudio de las propiedades biológicas e inmunológicas de las proteínas de la capa externa VP7 y VP4 de los

rotavirus se debe principalmente a su intervención durante las primeras interacciones del virus con la célula huésped.

VP7 es la proteína más abundante de la cápside externa; tiene un peso aproximado de 37 Kd y es codificada por los genes 7, 8 ó 9, dependiendo de la cepa de rotavirus. VP7 es una proteína glicosilada con residuos de "alta manosa", capaz de inducir anticuerpos que neutralizan la infectividad viral e inhiben la hemaglutinación (5, 9, 18). No es muy claro el papel que desempeña esta proteína en la interacción con la célula huésped pero hay datos que sugieren que podría ser responsable de la unión del virus a la célula. Experimentos con rotavirus de origen bovino y humano indican que VP7 es la proteína del pegado a la célula huésped, ya que anticuerpos policlonales específicos contra esta proteína bloquean la adsorción de virus marcado a la célula (13, 39). VP7 es responsable de la clasificación por serotipos (tipo G) de los rotavirus del grupo "A". Se ha encontrado que las VP7's provenientes de cepas de un mismo serotipo son más similares entre sí (encontrándose una similitud del 91 al 100%), que las VP7's provenientes de cepas de cualquier otro serotipo (con similitudes menores de 86%) independientemente del origen del virus (38).

Se ha encontrado que en la capa externa de los rotavirus se encuentran 60 proyecciones o espículas de 5-6 nm formadas por dímeros de la proteína VP4 (35). A esta proteína se le han asignado

varias funciones: restricción al crecimiento del virus en cultivos celulares (16), tamaño y formación de placas (19), inducción de anticuerpos que neutralizan la infectividad viral en cultivos celulares (4, 5, 16, 17, 22, 46), hemaglutinación (19) e incremento de la infectividad viral provocado por el tratamiento del virus con tripsina (8, 9), entre otras. La tripsina corta a VP4 en dos segmentos denominados VP8 (28 Kd) y VP5 (60 Kd) que corresponden a los extremos amino y carboxilo de VP4, respectivamente. El corte por tripsina promueve la penetración del virus a la célula, pero no su unión (13, 20); este corte ocurre en los aminoácidos 241 y 247 de VP4 (24, 24a). Se ha observado recientemente que las VP4 de rotavirus aislados de un mismo origen son similares entre sí y diferentes a las cepas aisladas de distinto origen (24).

Los rotavirus de origen animal tienen la capacidad de aglutinar eritrocitos de diferentes especies, incluyendo eritrocitos humanos. Por análisis genéticos con virus reasociantes, se observó que la función de hemaglutinación cosegrega con el gene que codifica para VP4 (19); mas aún, la actividad de hemaglutinación ha sido demostrada en moléculas de VP4 expresadas en baculovirus recombinante (26), y en porciones de VP4 que comprenden los aminoácidos de 42 a 247 de la proteína, que corresponde a la región de VP8 (10,23).

En muchos sistemas virales, las proteínas de adsorción son también responsables de la aglutinación de eritrocitos, por lo que

se ha considerado que la unión virus-célula huésped y virus eritrocito son equivalentes. La hemaglutinación y el pegado de rotavirus de origen animal a células en cultivo están mediados, como ya se mencionó, por componentes celulares que contienen residuos de ácido siálico, ya que el tratamiento de las células con sialidasas, que eliminan estos residuos, abaten la hemaglutinación y reducen considerablemente la unión del virus a la superficie de la célula blanco. La proteína VP4 es responsable de la unión a los residuos de ácido siálico del eritrocito a través de la glicoforina A (gph A) (12, 26), que es la glicoproteína más abundante en la membrana de los eritrocitos. La gph A y otras sialoglicoproteínas, así como lectinas derivadas de *Limulus polyphemus*, que interaccionan específicamente con ácido siálico, inhiben la infectividad de los rotavirus de origen animal en cultivos celulares (12, 49), lo cual confirma la importancia de los residuos de ácido siálico durante la infección con rotavirus de origen animal.

Anticuerpos monoclonales neutralizantes (MAbs) contra VP8 parecen inhibir la unión del virus a células en cultivo por lo que se ha sugerido que la proteína VP4 es la responsable del pegado del virus a la célula. Cabe mencionar que anticuerpos neutralizantes que reconocen epítopes en VP5 no inhiben la adsorción del virus a las células en cultivo (37). La mayoría de anticuerpos monoclonales neutralizantes contra VP4 de rotavirus de origen animal están dirigidos contra el fragmento de VP8 (3, 27 y 28). Por el

contrario, los MAb's neutralizantes producidos contra VP4 de cepas humanas reconocen VP5 de manera preferencial (24, 44, 46).

En muchos sistemas virales el uso de variantes de escape a la neutralización han sido de utilidad para el reconocimiento de sitios de importancia funcional sobre la superficie viral. Como se ha descrito con varios virus de RNA, algunos cambios que están presentes en variantes antigénicas que escapan a la neutralización con MAb's provocan una alteración en alguna función biológica. Por ejemplo, el crecimiento de reovirus tipo 3 en presencia de MAb's dirigidos contra la hemaglutinina, que además es la proteína de adsorción a la célula huésped, provocó la selección de variantes que sufrieron un cambio en el sitio de unión al receptor provocando que la neurovirulencia de éstas se viera afectada (32, 42 y 43).

Similares conclusiones han sido hechas con bunbdovirus y con variantes del virus de rabia en el que una alteración en la glicoproteína G (proteína de adsorción) correlaciona con cambios en la patogenicidad del virus (6, 15). Una cepa de influenza A tiene restringido su crecimiento en células MDBK; al seleccionar variantes de este virus en presencia de un MAb contra la HA, el virus adquiere la capacidad de unirse y crecer en células MDBK (2). Algunos MAb's contra el virus de influenza han sido de utilidad para aislar variantes antigénicas que tienen modificada su interacción con ácidos siálicos, reconociendo diferentes formas anómericas de éste como receptor (36, 41 y 48).

ANTECEDENTES

La cepa de rotavirus porcino YM se aisló en Sonora, México en 1983 a partir de heces de lechones con diarrea; esta cepa fue adaptada a crecer en cultivos celulares por el doctor Romilio Espejo. Este virus pertenece al grupo "A" de rotavirus, que ha sido reconocido como el principal causante de diarreas en niños y en crías animales (38).

Por ensayos de neutralización con sueros hiperinmunes, se determinó que YM no pertenecía a serotipo alguno reportado hasta entonces y se le clasificó como un nuevo serotipo (G11) (1, 38). Estas características y el hecho de que el virus adaptado a crecer en cultivos celulares es capaz de inducir diarrea en lechones, hicieron de YM un buen modelo para su estudio.

Los anticuerpos monoclonales son una valiosa herramienta para el estudio bioquímico y funcional de diversos sistemas virales. Desde este punto de vista, en el laboratorio de DR. H.Greenberg se produjeron MAbs contra la cepa YM (usando como antígeno viriones purificados de YM por CsCl) seleccionándolos por su capacidad para inhibir la hemaglutinación del virus; de esta manera se esperaba seleccionar MAbs dirigidos contra cualquiera de las 2 proteínas de capa externa, VP4 ó VP7. Estos MAbs serían utilizados en el laboratorio como una herramienta para estudiar y localizar

funciones asociadas a estas proteínas.

Como un paso en la caracterización de estos MAbS, previamente a este trabajo, se estudió su reactividad por ELISA e inhibición de la hemaglutinación (HI) con distintas cepas de rotavirus y virus rearreglantes (Tabla I resultados no publicados). De estos datos cabe destacar que todos los MAbS inhiben la hemaglutinación provocada por cepas de origen porcino independientemente de su serotipo; el MAYM13 reacciona además con otras cepas de diferente origen y distinto serotipo.

Por el patrón de reactividad de estos monoclonales, se pensó que los anticuerpos estaban dirigidos contra la proteína VP4, lo cual fue confirmado, por Ezequiel Fuentes (11a), mediante experimentos de inmunoprecipitación y tinción de células de insecto infectadas con baculovirus recombinantes que expresan VP4 de YM.

En el presente proyecto, se utilizaron algunos MAbS contra YM como una herramienta para seleccionar variantes antigénicas que escaparan a la neutralización con estos MAbS. La idea es que estas variantes tendrían modificadas algunas regiones en VP4 o VP7, que les permitiría infectar en presencia del MAb y, por lo tanto, de una manera diferente a como lo hace el virus silvestre; asimismo, estas variantes podrían tener modificada alguna función específica asociada con cualquiera de las dos proteínas de capa externa y consecuentemente podrían servir para estudiar estas funciones.

Como se ha descrito anteriormente, algunas variantes

antigénicas a MAbs neutralizantes de los virus de influenza, reovirus, rhabdovirus y bunbdovirus, que presentan cambios en una proteína de superficie, tienen modificada alguna función asociada a ella.

REACTIVIDAD DE LOS MAbS. CONTRA YM CON OTRAS CEPAS POR HI Y ELISA

MAb.	HI	ELISA
MAYM 1	YM(G11) ^a , OSU(G5) ^a , CRW(G3) ^a .	YM(G11) ^a , CRW(G3) ^a , 4-YM(VP4YM/RRV)(G3) ^g ,
MAYM4	YM(G11) ^a , OSU(G5) ^a , CRW(G3) ^a .	YM(G11) ^a , 4-YM(VP4YM/RRV)(G3) ^g .
MAYM6	YM(G11) ^a , OSU(G5) ^a , CRW(G3) ^a .	YM(G11) ^a , OSU(G5) ^a , TFR(G5) ^a , 4-YM(VP4YM/RRV)(G3) ^g , Y NCDV(G6) ^c .
MAYM12	YM(G11) ^a , OSU(G5) ^a , CRW(G3) ^a .	YM(G11) ^a , 4-YM(VP4YM/RRV)(G3) ^g .
MAYM13	YM(G11) ^a , OSU(G5) ^a , CRW(G3) ^a , CU-1(G3) ^d , NCDV(G6) ^c , RRV(G3) ^b , D x RRV(G1) ^f Y DS-1 x RRV(G3) ^f .	YM(G11) ^a , RRV(G3) ^b , CRW(G3) ^a , 4-YM(VP4YM/RRV)(G3) ^g , SA114FM(G3) ^b , CU-1(G3) ^d , NCDV(G6) ^c Y MONT(G1) ^e .

TABLA I. a) cepas porcinas, b) cepas de simio, c) cepa bovina, d) cepa canina, e) cepa humana, f) reareglo de una cepa humana con una animal (VP7 de D ó DS1 y todos los demas genes de RRV), g) reareglo de una cepa animal con otra animal (VP4 de YM y todos los demas genes de RRV).

OBJETIVOS

--- Obtención de variantes antigénicas del rotavirus porcino YM utilizando anticuerpos monoclonales neutralizantes.

--- Análisis de algunas características biológicas de las variantes antigénicas de YM, involucradas con la proteína VP4 (neutralizaciones, formación de placas liticas, hemaglutinación, efecto de la infectividad del virus en células tratadas con neuraminidasa y presencia de glicoforina).

MÉTODOS

VIRUS Y CELULAS:

El lisado de células infectadas con rotavirus YM se propagó en células MA104, que es una línea celular de riñón de mono rhesus (38). Esta línea celular fue utilizada para el aislamiento y caracterización de las variantes de YM obtenidas en este trabajo. Las células se cultivaron en Medio Mínimo Escencial Eagle (MEM) con 8% de suero bovino fetal (45).

PROPAGACION DEL VIRUS (38):

Todas las técnicas que involucran cultivos celulares se realizaron en campanas de flujo laminar para evitar la contaminación.

- Se activó el lisado de células infectadas con el virus YM con 10 µg de tripsina/ml de lisado 30 min. a 37 °C, se lavaron las células 2 veces con amortiguador de fosfato salino (PBS).
- Se adsorbió el virus a las células 1 hr. a 37 °C.
- Se agregó MEM sin suero y se incubó a 37 °C hasta observar el efecto citopático producido por el virus al microscopio.

SELECCION DE VARIANTES (45):

Con este método se pretende seleccionar, y enriquecer después de tres pases en presencia del MAb, virus cuya replicación no se vea afectada por el MAb.

- Se activó el virus YM (500 μ l) con 10 μ g de tripsina/ml lisado, 30 min. a 37 °C
- Se incubó al virus 1 hr. a 37 °C con el anticuerpo monoclonal diluido 1:100 en MEM
- Se adsorbió la mezcla de virus-anticuerpo 1 hr. 37 °C a células que fueron crecidas en tubos de cultivo, lavadas 2 veces con PBS
- Se retiró el inóculo y se lavo las células una vez con MEM
- Se agrego MEM con el anticuerpo a una concentración final 1:500 y 1 μ g de tripsina/ml
- Las células se incubaron a 37 °C hasta que se observo efecto citopático
- Se congeló y descongeló una vez el lisado
- Se clonó por formación de placa de lisis después del 3^{er} pase del lisado crecido en presencia del MAb en células MA104
- Se repitió tres veces el paso anterior.

ENSAYO EN PLACA (40):

Con esta técnica se obtienen placas de lisis, que representan diferentes clonas de virus. Cada clona viral se purifica por formación de placas de lisis, dos veces más para asegurar la homogeneidad de la progenie viral.

- Se activó el lisado crecido en presencia del MAb (500 μ l) con 10 μ g de tripsina/ml 30 min. a 37 °C
- Se hicieron diluciones decimales del lisado activado
- Se inocularon 500 μ l de cada dilución a las células que fueron previamente lavadas con PBS
- Se adsorbió el inóculo, 1 hr. a 37 °C
- Se removió el inóculo y se lavaron las células una vez con MEM
- Se cubrieron las células con 3 ml de MEM con 0.6% de agarosa y 3 μ g de tripsina/ml. Después de tres días de incubación a 37 °C, las células se tiñeron con rojo neutro a una concentración final de 16.5 mg/100 ml. Después de 3 hrs de incubación a 37 °C se rescataron las clonas extrayendo la agarosa en donde se observaron placas de lisis; la agarosa se resuspendió en 1 ml. de MEM y el virus contenido en ésta, se amplificó.

AMPLIFICACION DE LA PLACA DE LISIS (40):

La amplificación es con el fin de aumentar la cantidad de partículas virales infecciosas para realizar un análisis adecuado. En este paso de amplificación se mantiene la presión de selección.

- Se activaron 500 μ l del MEM en que se resuspendió la agarosa con 10 μ g de tripsina/ml 30 min. a 37 °C
- Se agregaron 3 ml de MEM
- Se incubó a 37 °C hasta observar efecto citopático
- Se congeló y descongeló una vez el lisado
- Se tituló el lisado.

TITULACION DEL LISADO DE CELULAS INFECTADAS (46):

Al poner un volumen conocido de virus y hacer diluciones seriadas de éste, se puede determinar la cantidad de partículas infecciosas presentes en el lisado. La cuantificación se realiza por tinción de las células infectadas con inmunoperoxidasa; el título de un lisado se expresa en unidades formadoras de focos infecciosos por mililitro (uff/ml).

- Se activó el lisado (120 μ l) con 10 μ g de tripsina/ml 30 min. a

37 °C

- Se pusieron 50 μ l de MEM a una caja de 96 pozos a partir del pozo 1
- Se agregaron 50 μ l de lisado activado al pozo 1 por duplicado y se hicieron diluciones seriadas 1:2 (50 μ l) a partir del pozo 2
- Se agregaron las diluciones a las células crecidas en una caja de 96 pozos, que se lavaron una vez con MEM sin suero y se incubaron 1 hr. a 37 °C
- Se retiró el inóculo de las células y se lavaron una vez con MEM sin suero
- Se agregaron 200 μ l de MEM a las células y se incubaron a 37 °C de 12-14 hrs.
- Se tificaron las células por la técnica de inmunoperoxidasa (ver adelante)
- Se contaron las células teñidas al microscopio
- El resultado de la titulación del lisado se expresó en uff/ml.

TINCION POR INMUNOPEROXIDASA:

- Se retiró el medio de las células infectadas y se lavaron una vez con PBS
- Se agregaron 50 μ l de acetona al 80% en PBS por pozo
- Se incubó 30 min. a temperatura ambiente
- Se lavaron las células dos veces con PBS (50 μ l/pozo)
- Se agregó 50 μ l de suero de conejo antirotavirus a una dilución

de 1:1500 en PBS por pozo

- Se incubó 1 hr. a 37 °C
- Se lavaron las células dos veces con PBS (50 µl/pozo)
- Se agregó 50 µl de proteína A acoplada a peroxidasa, diluída 1:2500 en PBS por pozo
- Se incubó 2 hrs. a 37 °C
- Se lavaron las células dos veces con PBS (50 µl/pozo)
- Se agregó 50 µl de sustrato (4 ml. de amortiguador de acetatos 0.05 M pH 5 con 1.5 ml. de carbazole 4 µg/ml en dimetil formamida y 10 µl de H₂O₂ 30% y se filtró) por pozo
- Se enjuago con agua corriente una vez que se tiñeron las células.

ENSAYO DE NEUTRALIZACION (46):

Esta técnica nos indica la capacidad de un suero para neutralizar la infectividad causada por un virus. Esta técnica fué de gran importancia para seleccionar y elegir las clonas que escapan a la neutralización con el MAb.

- Se activó el virus a una dilución en que estén contenidos aproximadamente 6×10^4 uff/ml con 10 µg de tripsina/ml 30 min. a 37 °C
- Se puso en el carril 1 de una caja de 96 pozos 100 µl de MAb diluído 1:200 en MEM por duplicado y del pozo 2 al 12 poner 50 µl de MEM. Se hicieron diluciones seriadas de MAb hasta el pozo 11. El

pozo 12 se queda como control (sin MAb)

- Se agregó 50 μ l de lisado por pozo en la caja donde se hicieron las diluciones del MAb y se incubó 1 hr. a 37 °C
- Se adsorbió la mezcla de virus-MAb a las células (que se crecieron en cajas de 96 pozos y se lavaron una vez con PBS) 1hr. a 37 °C
- Se retiró el inóculo y se lavaron las células dos veces con MEM sin suero
- Se agregó 200 μ l de MEM por pozo y se incubó de 12-14 hrs. a 37 °C. Después de este tiempo las células se fijaron y tiñeron usando la técnica de inmunoperoxidasa
- El título de neutralización se reportó como la dilución de suero en donde se encuentre el 40% de focos con respecto al control, como se ha establecido por diversos autores (3, 40, 44, 45 y 46).

ENSAYOS DE HEMAGLUTINACION (HA) (29):

Con esta técnica se observa la capacidad de un virus para unirse a los eritrocitos de manera polivalente.

Para estos ensayos se utilizó sangre humana tipo O.

- Se pusieron 50 μ l de una solución de PBS con albúmina al 0.125% (PBS-Alb.) por pozo, en una caja de 96 pozos de fondo cónico
- Se pusieron 50 μ l del lisado de células infectadas con YM o alguna variante y se hicieron diluciones seriadas de virus hasta el

pozo 11; se dejó como control negativo el pozo 12

- Se agregaron 50 μ l de una solución de eritrocitos al 0.4% en PBS-Alb. en todos los pozos y se incubó 1 hr. a temperatura ambiente
- El resultado se reportó como unidades hemaglutinantes (UHA) de acuerdo a la última dilución en donde se observa hemaglutinación.

INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION (HI) (29):

En este ensayo se determinó la capacidad de un suero para inhibir la hemaglutinación causada por un virus; ésto ocurre porque el anticuerpo bloquea los sitios con que el virus se une a los eritrocitos.

- Se pusieron 50 μ l del MAb diluido 1:100 en PBS-Alb. en el pozo 1 de una caja de 96 pozos para hemaglutinación por duplicado; en los demás pozos se colocaron 25 μ l de PBS-Alb., y se hicieron diluciones seriadas del MAb de manera que todos los pozos contengan 25 μ l de la dilución respectiva
- Se agregaron 8 unidades hemaglutinantes de virus (25 μ l/pozo) y se incubaron 1 hr. a temperatura ambiente
- Se dejaron dos pozos como control: uno sin MAb y otro sin virus
- El resultado se reportó como la última dilución del anticuerpo donde se detectó inhibición de hemaglutinación.

ADSORCION A ERITROCITOS:

Con este método se determina si un virus es capaz de adsorberse a los eritrocitos cuando se mantienen en contacto, cuantificando las partículas infecciosas antes y después de la incubación virus-eritrocito.

- Se incubaron 250 μ l de virus con 250 μ l de una suspensión de eritrocitos a diferentes concentraciones (1% y 4%) en PBS-Alb. durante 1 hr a temperatura ambiente con agitación constante
- Se centrifugó 2 min. 2000 x g; se rescató el sobrenadante
- Se lavó el pellet con 250 μ l de PBS-Alb
- Se centrifugó 2 min 2000 x g; se rescató el sobrenadante
- Se juntaron los sobrenadates y se titularon por uff/ml.

ENSAYO DE INFECTIVIDAD SOBRE CELULAS TRATADAS CON NEURAMINIDASA (29):

Con esta técnica se determinó cómo se afectó la infectividad del virus por la ausencia de ácidos siálico sobre la membrana celular.

- Se activó el virus a una dilución en que estén contenidos aproximadamente 3×10^4 uff/ml 30 min. a 37 °C con 10 μ g de

tripsina/ml

- Las células se trataron con diluciones seriadas 1:2 de neuraminidasa (provenientes de *Artrobacter ureafaciens*) a partir de 40 mU/ml hasta el pozo 10 dejando como control negativo los pozos 11 y 12, durante 1 hr. 37 °C
- Se retiró la neuraminidasa (NA) de las células y se lavaron dos veces con MEM sin suero
- Se agregaron 50 µl del virus activado a la células tratadas y se incubó 1 hr. a 37 °C, se retiró el inóculo y se lavaron dos veces las células con MEM sin suero
- Se agregaron 200 µl de MEM por pozo y se incubó a 37 °C de 12-14 hrs.
- Después de este tiempo las células se lavaron, fijaronn y tñieron mediante la técnica de inmunoperoxidasa
- Los resultados se reportaron como porcentajes de infectividad con respecto a células que no fueron tratadas con neuraminidasa.

ENSAYO DE INFECTIVIDAD EN PRESENCIA DE GLICOFORINA:

Este ensayo tiene como objeto ver cómo se afecta la infectividad del virus en presencia de glicoforina, afectando por competencia la unión del virus a la célula a través de residuos de ácido siálicos.

- Se activó el virus a una dilución en que estén contenidos aproximadamente 6×10^4 uff/ml, 30 min. a 37 °C con 10 µg de

tripsina/ml

-Se hicieron diluciones seriadas de glicoforina A (gph) en MEM en una caja de 96 pozos, partiendo de 200 $\mu\text{g/ml}$ (50 $\mu\text{l/pozo}$), se agregó el virus (50 $\mu\text{l/pozo}$) y se incubó 1 hr. a 4 °C, en el pozo 12 no se añade gph, solo MEM

- Se lavaron las células dos veces con MEM y se agregó la mezcla virus-gph a las células se incubaron 1 hr. a 4 °C

- Se retiró el inóculo y se lavaron las células una vez con MEM, se agregaron 200 μl de MEM por pozo y se incubaron de 12-14 hrs. a 37 °C

- Las células se fijaron y teñieron por la técnica de inmunoperoxidasa

- Los resultados se reportaron como porcentaje de infectividad con respecto a la infección en ausencia de glicoforina A.

EXTRACCION DE RNA VIRAL Y SEPARACION POR ELECTROFORESIS (29):

Esta técnica es con el propósito de verificar el patrón electroforético característico de rotavirus; además, nos sirve para verificar que una cepa no se encuentre contaminada con algún otro rotavirus.

- A 200 μl de lisado de células infectadas se agregaron 20 μl de

una solución disruptora 5 X (SDS 5%, NaCl 50mM, amortiguador Tris 50 mM pH 6.8, EDTA 50 mM)

- Se agitó 1 min.
- Se agregaron 200 μ l de fenol (destilado y saturado con Tris Cl 0.1 M pH 8)
- Se agitó 2 min.
- Se añadieron 200 μ l de cloroformo y se agita 2 min.
- Se centrifugó 15 min.
- Se rescató la fase acuosa en que esta contenido el RNA, el cual se precipitó con etanol absoluto (2 1/2 volúmenes), se agitó y se incubó 15 min. a -70°C
- Se centrifugó, decantó y resuspendió en 20 μ l de agua
- Se centrifugó 1 min. y se agregaron 15 μ l de amortiguador de muestra que contiene azul de bromofenol en amortiguador de Tris glicina con 10% de glicerina
- Se cargó la muestra en un gel de poliacrilamida al 10%
- Las muestras de RNA se separaron en un gel de poliacrilamida al 10%, a 10 mA por 10 hrs. con amortiguador de Tris glicina
- Se fijó el gel en una solución de etanol al 10% y ácido acético al 0.5%
- Se tiñó con plata y se reveló con una solución de NaOH al 0.75 M y formaldehído al 0.28%

RESULTADOS

Nuestro trabajo consistió en seleccionar variantes antigénicas que escapan a la neutralización con anticuerpos monoclonales. Se utilizó un lisado de células infectadas con el rotavirus porcino YM, previamente clonado.

El procedimiento para seleccionar las variantes de YM consistió en crecer a la cepa YM en presencia de cada uno de los diferentes MAb, denominados: MAYM1, MAYM4, MAYM6, MAYM12 y MAYM13, utilizados a una dilución final de 1:500. Después de tres pases consecutivos en estas condiciones, que servirían para enriquecer partículas virales cuya replicación no se viera afectada por la presencia del MAb, el lisado se clonó por ensayo en placa; cada clona fue plaqueada dos veces más para asegurar que la progenie de cada clona fuera homogénea y se amplificó. Cada clona se cuantificó por unidades formadoras de focos (métodos) y se utilizaron 3×10^4 uff/ml de cada lisado para verificar, por ensayos de neutralización, si estas clonas eran variantes antigénicas que escapaban a la neutralización con el MAb correspondiente.

Se consideraron variantes antigénicas que escapan a la neutralización aquellas clonas que tenían al menos una diferencia de 10 veces en el título de neutralización del MAb correspondiente

con respecto a la cepa YM original. Cada variante se designó arbitrariamente con la letra V, el número de la variante y el MAb con el que fue seleccionada.

En la Tabla II se observa el número de clonas que resultaron ser variantes y el número de clonas analizadas que fueron seleccionadas en presencia de cada MAb. En la Tabla III se muestra el título de neutralización de cada MAb contra el virus silvestre YM y contra los virus que se consideraron variantes, seleccionadas con el MAb correspondiente. Como se observa, todas las variantes son escasamente neutralizadas con el MAb correspondiente, cuando se compara con YM.

Aunque se seleccionaron clonas en presencia del MAYM1, éstas presentaban un patrón electroforético diferente a YM en varios genes por lo que se pensó que estaban contaminados con otro rotavirus; como se sabe cada cepa de rotavirus tiene un patrón de migración electroforético característico. Las clonas seleccionadas con el MAYM1 no se trabajaron más. Este hecho es frecuente en el laboratorio ya que se manejan muchas cepas de rotavirus que se replican fácilmente en cultivos celulares. En la Figura 3 se muestra el patrón electroforético de YM y cada una de las variantes con las que se siguió trabajando; en cada pase de YM y de las variantes se verificó su electroferotipo para asegurar que el lisado no estuviera contaminado con algún otro virus.

Como se observará, en los distintos experimentos realizados no

**NUMERO DE CLONAS SELECCIONADAS
CON LOS DIFERENTES MAbS**

MAbs	CLONAS/VARIANTE
MAYM4	4/1
MAYM6	3/1
MAYM12	10/2
MAYM13	6/2

TABLA II. En esta tabla se muestra el número de clonas obtenidas con cada MAb, así como las que resultaron ser variantes. Se consideró variante aquella clona que tuviera al menos una diferencia de diez veces en el título de neutralización con respecto a la cepa silvestre.

**TITULO DE NEUTRALIZACION DE LAS VARIANTES
ANTIGENICAS CON LOS MAbs HOMOLOGOS**

VIRUS	M A b s			
	MAYM4	MAYM6	MAYM12	MAYM13
V1-MAYM4	200			
V1-MAYM6		<100		
V1-MAYM12			800	
V1-MAYM13				800
V2-MAYM13				400
YM	51200	51200	25600	51200

TABLA III. En esta tabla se muestran los títulos de neutralización de cada variante con el monoclonal que fueron seleccionadas, comparando el resultado con YM.

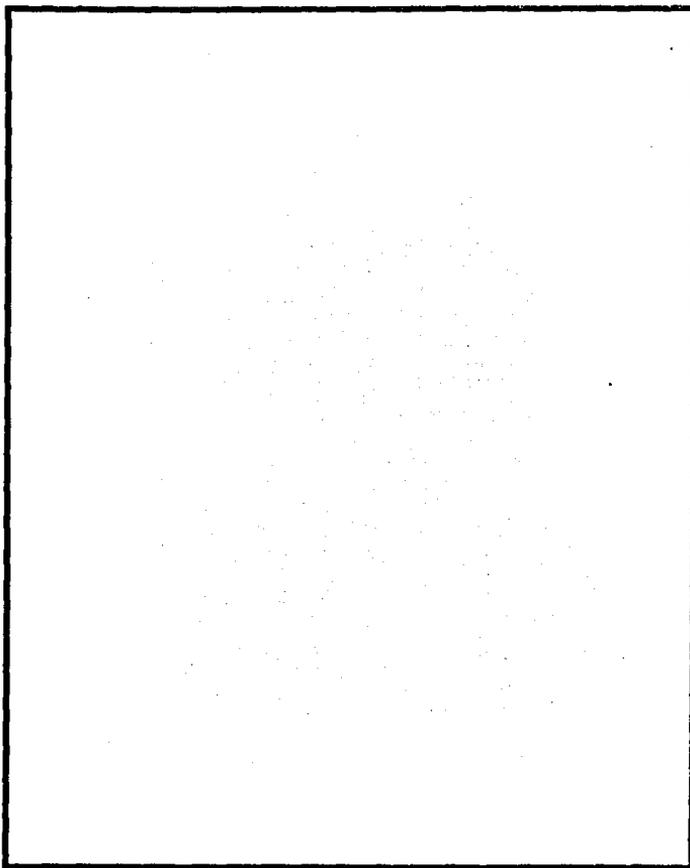


Figura 3. Electroferotipo de YM y de las variantes de YM. El RNA genómico se extrajo, a partir de lisados de células infectadas con los virus mencionados, utilizando fenol, cloroformo y precipitando con etanol. El dcrRNA se separó por electroforesis en geles de poliacrilamida con el sistema de Laemmli sin SDS y se tiñó con nitrato de plata. Los segmentos de dcrRNA están indicados en orden progresivo de acuerdo a su migración.

aparecen resultados de todas las variantes que fueron seleccionadas, ya que algunas variantes después de varios pases habían perdido su resistencia al MAb, por lo cual se descartaron. De estas variantes se trabajaron solamente pases iniciales. Los resultados presentados en este trabajo incluyen sólo aquellos datos en que se confirmó la resistencia de los virus a los MABs correspondientes y el electroferotipo característico de la cepa YM.

Para saber si los anticuerpos utilizados en este trabajo reconocían epítopes relacionados, se hicieron ensayos de neutralización utilizando todos los MABs contra YM y todas las variantes seleccionadas. Si dos diferentes MABs reconocieran epítopes relacionados, las variantes seleccionadas con éstos escaparían a la neutralización con ambos MABs, sugiriendo así su relación.

Como se observa en la Tabla IV, las variantes V1-MAYM4, V1-MAYM6 y V2-MAYM13 no son neutralizadas por los MABs 1, 4, 6 y 12. Así, de acuerdo a estos resultados los MABs 1, 4, 6 y 12 parecen estar relacionados; asimismo, las dos variantes seleccionadas con el MAYM13 parecen ser diferentes ya que son neutralizadas en distinto grado por los otros MAYM's; la variante V2-MAYM13 se comporta similar a las variantes seleccionadas con el MAYM4 y el MAYM6. Esto puede indicar que el MAYM13 es capaz de seleccionar variantes con diferentes cambios, que provocan un comportamiento distinto; además este MAb parece estar relacionado parcialmente a los otros MABs, ya que una variante seleccionada con él (V2) escapa

TITULO DE NEUTRALIZACION DE LOS MAYMs CONTRA LAS VARIANTES ANTIGENICAS DE YM

VIRUS *	M A b s ***				
	MAYM1	MAYM4	MAYM6	MAYM12	MAYM13
V1-MAYM4	<200	<200	<200	<200	51200
YM	3200	25600	25600	25600	25600
V1-MAYM6	<200	<200	ND	<200	6400
YM	---	12800	25600	51200	12800
V1-MAYM6 **	<200	<200	<200	ND	ND
YM	25600	204800	204800	>204800	25600
V1-MAYM13	400	1600	800	1600	ND
V2-MAYM13	<200	<200	<200	<200	ND
YM	51200	204800	204800	>204800	ND
V2-MAYM13 **	<200	<200	<200	<200	ND
YM	ND	12800	25600	51200	12800

TABLA IV. *En esta columna estan las diferentes variantes seleccionadas para este ensayo, utilizando a YM como control con las distintas variantes.

** Repetición del ensayo

*** MABs utilizados para neutralizar a las variantes.

ND. No determinado

a la neutralización con los otros MABs.

En distintos ensayos de neutralización realizados con el mismo lisado de células infectadas, se observó que el título de neutralización del MAYM13 contra el virus silvestre YM variaba; estas diferencias podrían deberse a que el lisado pudo haber estado sujeto a distintas condiciones que de alguna manera pudieron afectar la estabilidad de partículas infecciosas presentes en el mismo, de manera que la cantidad de partículas infecciosas que interactúan con el MAB fuera diferente cada vez, aunque la cantidad de partículas virales (infecciosas más no infecciosas) fuera la misma (en este ensayo sólo se detectan las partículas infecciosas); así, aunque la cantidad de MAB que reacciona con el virus era la misma, la cantidad de partículas infecciosas detectadas era diferente, afectando por lo tanto el título de neutralización. Con base en este razonamiento y para determinar si la cantidad total de partículas influía en el título de neutralización de un Ab, hicimos un ensayo utilizando distintas diluciones de un mismo lisado de YM (recién producido y titulado), y una preparación reciente del MAYM13. Como se observa en la Tabla V, el título de neutralización del MAYM13 es diferente para cada cantidad de virus utilizada en el experimento; lo cual demuestra que la variación en la cantidad total de partículas virales, incluyendo partículas no infecciosas puede ser la causa en las variaciones en el título de neutralización de los MABs. De esta manera, en experimentos posteriores se controló la cantidad de partículas utilizadas para

**TITULO DE NEUTRALIZACION DEL MAYM13 CONTRA LA
CEPA YM USANDO DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL VIRUS**

uff/50 μ l +	TITULO DE NEUTRALIZACION	TITULO DE YM (uff/ml) *
1067	19000	6.4x10 ⁸
2629	51200	8.4x10 ⁸
3135	102400	7.5x10 ⁸
4180	102400	5x10 ⁸

TABLA V. En esta tabla se indican las diferentes unidades formadoras de focos de YM utilizadas para determinar el título de neutralización del MAYM13.

* en esta columna se presenta el título de YM, determinado en base a las uff/50 μ l utilizadas en el ensayo. Se puede observar que el título del virus (uff/ml) es muy similar independientemente de la cantidad utilizada para neutralizar.

+ Cantidad de virus utilizada para neutralizar con el monoclonal

evitar posibles variaciones.

Como se mencionó previamente, los MAYM's utilizados para este trabajo reconocen la proteína VP4. Así, se decidió evaluar algunas funciones asociadas a VP4 de las variantes seleccionadas con los MAb's y YM.

Como se sabe, la proteína VP4 es responsable del tamaño y formación de placas (19). No se observó diferencia entre el virus YM y las variantes V1-MAYM4, V1-MAYM6, V1-MAYM12, V1-MAYM13 y V2-MAYM13 en la capacidad de formar placas; el tamaño de éstas fue similar en presencia de tripsina (1-3mm). En ausencia de tripsina, ningún virus incluyendo YM, fue capaz de formar placas líticas.

Los rotavirus animales son capaces de aglutinar eritrocitos de diversas especies a través de la proteína VP4 (12); por ser el virus YM de origen animal, se quiso determinar si las variantes derivadas de él tenían afectada esta función. La capacidad de las variantes para hemaglutinar se muestra en la Tabla VII. Tanto YM como las variantes V1-MAYM6, V1-MAYM12, V1-MAYM13 y V2-MAYM13 conservaron su capacidad para hemaglutinar.

La variante V1-MAYM4 no hemaglutinó en un primer ensayo; para verificar si la falta de hemaglutinación provocada por esta variante se debía a que no se pegaba a los eritrocitos o a que la cantidad de partículas capaces de unirse a los eritrocitos no era suficiente para detectar hemaglutinación, se realizó un ensayo para

**TITULO DE HEMAGLUTINACION
DE LAS VARIANTES DE YM**

VIRUS	TITULO (uff/ml)	TITULO HA (UHA/ml)
V1-MAYM4	1.7×10^7	2560
V1-MAYM6	3.2×10^7	2560
V1-MAYM12	6×10^6	640
V1-MAYM13	8.4×10^6	640
V2-MAYM13	2.1×10^6	640
YM	3×10^7	10240

TABLA VII. En esta tabla se presentan los títulos de hemaglutinación de YM y de cada una de las variantes así como el título de partículas infecciosas del lisado correspondiente.

evaluar la adsorción del virus a los eritrocitos; si la variante seguía uniéndose a los eritrocitos, el título (uff/ml) de partículas infecciosas disminuiría de acuerdo a la concentración de eritrocitos utilizada para adsorber; por el contrario, si la variante no se pegaba a los eritrocitos, el título no se afectaría por la preincubación con éstos. Como se observa en la Tabla VI, la variante V1-MAYM4 se sigue pegando a los eritrocitos, ya que la disminución en el título de partículas infecciosas está en relación directa con la concentración de eritrocitos usados para adsorber; ocurre lo mismo con YM y con la V1-MAYM6, mientras que el título de WA (cepa humana, no hemaglutinante) prácticamente no se ve afectado. Con los resultados anteriores, determinamos que el problema de la V1-MAYM4 para hemaglutinar era que la cantidad de partículas era muy bajo, ya que una vez que se incrementó el título, se observó hemaglutinación (Tabla VII). Así, el cambio que sufrieron y que les permite a las variantes escapar a la neutralización no afectó su capacidad para hemaglutinar.

Con base en los resultados de los experimentos de neutralización de YM y las variantes, no sabíamos si las variantes escapaban a la neutralización porque no unían al MAb o si lo seguían uniendo pero el sitio que reconoce el MAb ya no es necesario durante la infección de la variante. Una manera de determinar si los MAb continúan uniéndose a las variantes fue por su capacidad para inhibir la hemaglutinación. Así, si los MAb

TITULO DE VIRUS PREADSORBIDOS CON ERITROCITOS

VIRUS	TITULO (uff/ml)		
	0% ERITROCITOS	0.4% ERITROCITOS	1% ERITROCITOS
V1-MAYM4	2.6×10^6	2.7×10^5 (9.6)*	7×10^4 (37)*
V1-MAYM6	2.9×10^7	8.8×10^5 (32)	4.3×10^5 (67)
YM	1.8×10^7	2.2×10^5 (81)	2.4×10^5 (75)
WA	1×10^5	8.9×10^4 (1.12)	7×10^4 (1.4)

TABLA VI. En esta tabla se presentan los títulos de diferentes virus en unidades infecciosas antes y después de ser adsorbidos con las concentraciones indicadas de eritrocitos. * Los números entre parentesis indican la cantidad de veces en que se redujo el título con respecto al título del virus sin eritrocitos.

WA Cepa humana no hemaglutinante

segúan pegándose al virus, se inhibiría la hemaglutinación provocada por éstos. Como se observa en la Tabla VIII, la hemaglutinación provocada por las variantes V1-MAYM4, V1-MAYM6 y V2-MAYM13, no se inhibe con los MAb's 1, 4, 6 y 12; sugiriendo que los MAb's no se pegan al virus, ya que se requiere una alta cantidad de anticuerpo ó una dilución baja para inhibirla. Todo lo anterior nos sugiere que el cambio sufrido por las variantes puede localizarse en el sitio de unión del anticuerpo de manera que el Ab ya no se une al virus. La hemaglutinación provocada por la variante V1-MAYM12 continua siendo inhibida con todos los anticuerpos; sugiriendo que esta variante sufrió un cambio en el que el sitio de unión del MAb no se alteró y que le permite al virus infectar en presencia de éste; de esta manera el cambio seleccionado con el MAYM12 y que esta presente en la V1-MAYM12 parece ser diferente al del resto de las variantes. Por este mismo criterio, se observó que el MAYM13 se sigue uniendo a todas las variantes.

Como ya se ha mencionado, los rotavirus de origen animal requieren de una molécula receptora que contiene residuos de ácido siálico para poder infectar a la célula huésped; la proteína VP4 es responsable de esta unión (12, 26). Por antecedentes con mutantes de rotavirus animales, se determinó que la resistencia de un virus al tratamiento de las células con neuraminidasa y la presencia de glicoforina (mutantes nar y gpr), correlaciona con la resistencia a MAb's neutralizantes dirigidos contra VP8 (29). Para establecer una posible relación entre la resistencia de las variantes

**TITULO DE INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION
DE LOS MAYMs CONTRA LAS VARIANTES DE YM**

VIRUS	M A b s				
	MAYM1	MAYM4	MAYM6	MAYM12	MAYM13
V1-MAYM4	1000	<1000	1000	<1000	128000
YM	128000	>512000	256000	>512000	>512000
V1-MAYM6	<1000	<1000	1000	1000	16000
YM	>512000	>512000	>512000	>512000	256000
V1-MAYM12	128000	>512000	>512000	>512000	16000
YM	>512000	>512000	>512000	>512000	256000
V2-MAYM13	<5000	<5000	<5000	<5000	10000
YM	>160000	>160000	>160000	>160000	80000

TABLA VIII. En esta tabla se representan los títulos de inhibición de la hemaglutinación de los di MAbs contra cada variante; en cada ensayo se utilizó YM como control.

antigénicas de YM a los MAYM's, y la capacidad para infectar células en ausencia de siálicos, se realizaron ensayos de infectividad sobre células tratadas con neuraminidasa y en presencia de glicoforina (29). El virus YM, por ser de origen animal, requiere de residuos de ácido siálico para la infección, como se aprecia en la Figura 4; cuya infectividad se reduce hasta un 10% en células tratadas con 40 mU de neuraminidasa/ml. Por el contrario, la infectividad de las variantes V1-MAYM4, V1-MAYM6 y V1-MAYM12 no se ve tan afectada en ausencia de siálicos. Los experimentos en presencia de gph (Figura 5) confirmaron que la infectividad de las variantes V1-MAYM4 y V1-MAYM12 se afecta menos que el virus silvestre YM al interaccionar con residuos de ácido siálico presentes en la gph y, por lo tanto, la infección de éstas parece requerir menos siálicos sobre la célula huésped. Con estos resultados podemos concluir que el cambio sufrido por las variantes que les permite escapar a la neutralización, está relacionado con el requerimiento de residuos de ácido siálico durante la infección.

INFECTIVIDAD DE YM Y DE LAS VARIANTES DE ESCAPE A
MAbs CONTRA YM EN CELULAS TRATADAS CON NEURAMINIDASA

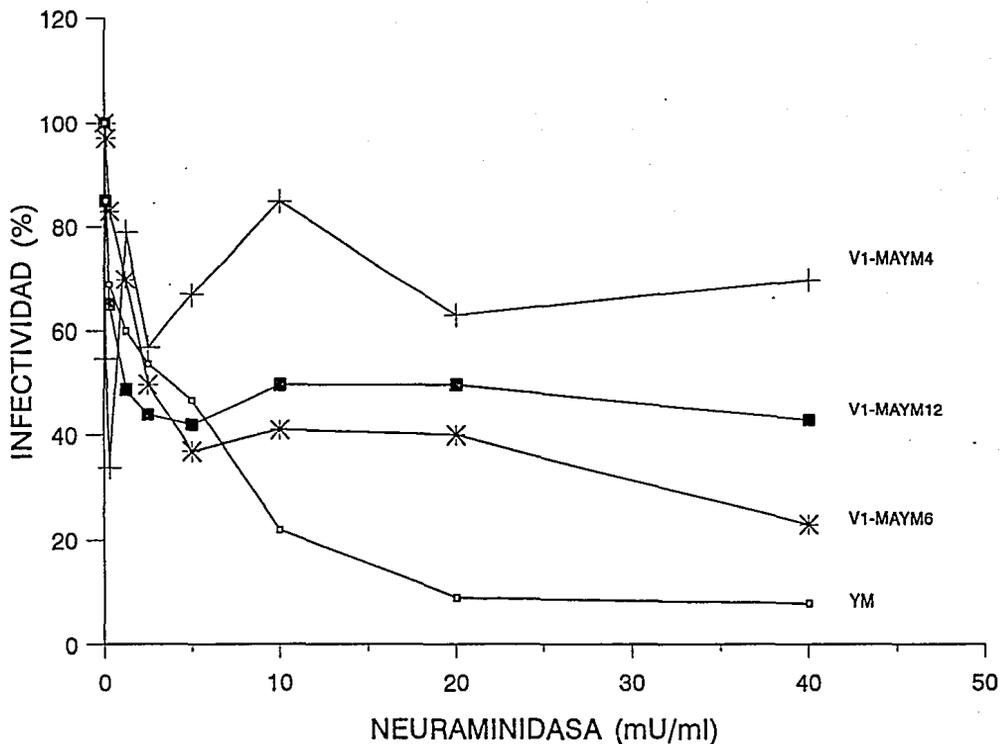


Figura 4. Se muestran los datos del porcentaje de infectividad de YM y de las variantes de YM obtenidas en células tratadas previamente con las concentraciones indicadas de neuraminidasa. El 100% representa la infectividad en células normales.

INFECTIVIDAD DE YM Y DE LAS VARIANTES DE ESCAPE A
Mabs CONTRA YM EN PRESENCIA DE GLICOFORINA (gph A)

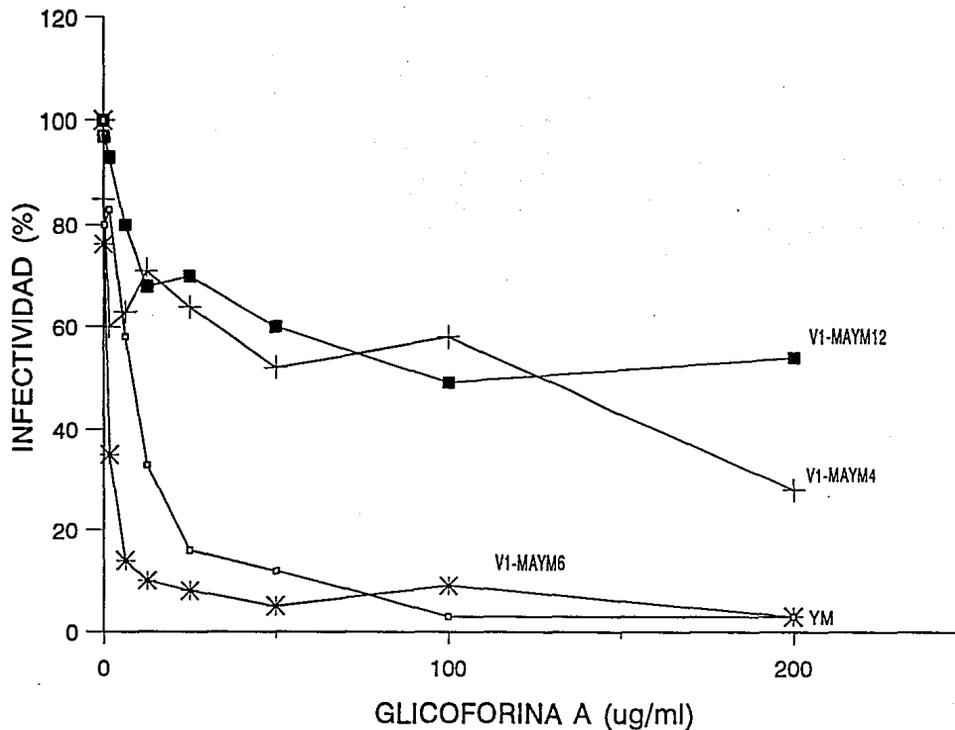


Figura 5. Se muestran los resultados del porcentaje de infectividad de YM y de variantes de YM en presencia de glicoforina. En células normales el 100% representa la infectividad en ausencia de gph.

DISCUSION

En este trabajo describimos el aislamiento de variantes de rotavirus de origen animal que escapan a la neutralización con anticuerpos monoclonales contra la proteína de capa externa VP4 del rotavirus porcino YM.

En la obtención de variantes antigénicas de rotavirus, se ha utilizado alguno de los métodos siguientes: 1) clonando directamente en presencia del monoclonal por formación de placas de lisis, 2) creciendo al virus en presencia del monoclonal y posteriormente plaqueando en ausencia del monoclonal (31, 40, 44, 45, 46). Las variantes obtenidas en presencia de MAb anti-VP4 se han obtenido solamente cuando se ha crecido el lisado en presencia del monoclonal durante varios pases; por el contrario, las variantes seleccionadas con MAb anti-VP7 se pueden obtener plaqueando directamente en presencia del monoclonal (40). Cuando nosotros aislamos las variantes no sabíamos contra que proteína estaban dirigidos los monoclonales, por lo tanto seguimos las dos metodologías descritas; sin embargo, solamente obtuvimos variantes antigénicas haciendo pases consecutivos en presencia del MAb; estos resultados concuerdan con los datos reportados sobre las variantes seleccionadas con MAb anti-VP4 (40).

Se considera variante aquella clona que tenga al menos una

diferencia de 10 veces en el título de neutralización con respecto al virus padre (40, 45 y 46). Las clonas de YM que se neutralizaron con los monoclonales MAYM4, MAYM6, MAYM12 y MAYM13, escaparon a la neutralización con el monoclonal correspondiente.

La resistencia de las variantes V1-MAYM4, V1-MAYM6 y V1-MAYM13 a los MABs MAYM1, MAYM4, MAYM6 y MAYM12; podría sugerir que los anticuerpos MAYM1, MAYM4, MAYM6 y MAYM12 reconocen epítopes relacionados, aunque podría ser el mismo epítope; existen varios ejemplos de este hecho (31, 40, 45, 46). Por otro lado, se ha reportado que un MAB neutralizante que reconoce VP7 puede seleccionar variantes de rotavirus humano con diferentes cambios (7); lo cual parece ocurrir con el MAB MAYM13, con el que se seleccionaron dos variantes que se comportan ligeramente diferentes por ensayos de neutralización con los distintos MABs. Para verificar si los MABs reconocen el mismo epítope o si las variantes V1-MAYM13 y V2-MAYM13 son diferentes es necesario determinar la secuencia del gene 4 de estas variantes.

Es muy probable que los MABs 4, 6 y 13 no neutralizen a las variantes porque ya no se unen a ellas, lo cual se manifestó porque tampoco son capaces de bloquear el pegado de éstas a los eritrocitos (no inhiben la HA) mientras que sí bloquean el pegado del virus silvestre. Sin embargo, cabe la posibilidad de que los MABs sí se unan a las variantes, pero los cambios presentes en éstas les permita unirse al eritrocito (a través de ácidos siálicos), aún en presencia del MAB de manera que no se bloquea esa

unión.

La variante V1-MAYM12 tiene un comportamiento diferente a las variantes V1-MAYM4, V1-MAYM6 y V2-MAYM13; ya que esta variante escapa a la neutralización con el MAYM12, pero este MAb se sigue uniendo al virus ya que es capaz de bloquear la unión a los eritrocitos (inhiben la HA), sugiriendo que el cambio sufrido por esta variante no está localizado en el sitio de unión del MAb, tal como se ha descrito con variantes antigénicas del virus de fiebre aftosa (32a).

Las variantes V1-MAYM4, V1-MAYM6, V1-MAYM12, V1-MAYM13 y V2-MAYM13 se plaquearon en presencia y ausencia de tripsina. Aparentemente no hubo diferencia en la replicación ni en la sensibilidad a tripsina entre las variantes y el virus silvestre ya que el tamaño de placa, en presencia de tripsina fue similar con todos ellos; en ausencia de tripsina ningún virus formó placas, incluyendo YM. Así, concluimos que la capacidad para formar placas, que está determinada por VP4 (19), no se encuentra alterada en estas variantes de YM, seleccionadas con los MABs anti-VP4.

Como se ha mencionado, los rotavirus de origen animal incluyendo a YM, tienen la capacidad de aglutinar eritrocitos a través de la interacción de VP4 con los ácidos siálicos de la glicoforina A (12, 26), que es la proteína más abundante en la superficie de los eritrocitos (12, 26). Se ha reportado que la

región de hemaglutinación de VP4 está localizada entre los aa 42 a 247 de VP4 que corresponde al 83% del fragmento VP8. Los cambios presentes en las variantes seleccionadas no afectan la interacción de éstas con los eritrocitos; sin embargo no se puede descartar que los cambios de las variantes con respecto al virus silvestre no se localizan entre los aa 42 a 247, ya que existen muchos ejemplos de variantes antigénicas con cambios en VP8 que mantienen su capacidad de hemaglutinación (4, 40). Sin embargo hay una variante de rotavirus animal seleccionada con un MAb anti-VP4 que no es capaz de hemaglutinar; ya que el cambio sufrido está localizado en un sitio crítico para la hemaglutinación (aminoácido 194 de VP8) (50).

A pesar de que no parece estar afectada la interacción de las variantes con los ácidos siálicos, las variantes V1-MAYM4 y V1-MAYM12 parecen requerir menos residuos de ácidos siálicos sobre la membrana de la célula huésped para infectarla ya que el tratamiento de las células con neuraminidasa o la presencia de glicoforina no afecta tanto la infectividad de las variantes como la del virus silvestre. Estas observaciones parecen sugerir que los cambios sufridos por el virus silvestre para generar las variantes antigénicas V1-MAYM4 y V1-MAYM12 han ocasionado que estas variantes puedan iniciar la infección de la célula huésped a través de un mecanismo parcialmente diferente al que involucra la interacción con siálicos.

Creciendo una cepa de rotavirus animal en células tratadas con neuraminidasa y presencia de glicoforina A, se seleccionaron

variantes que no requieren ácidos siálicos sobre la membrana de la célula para infectar, a pesar de que son capaces de interactuar con ellos. Estas mutantes (denominadas nar y gpr) resultaron resistentes a la neutralización con MAbs neutralizantes que reconocen VP8, a pesar de que reaccionan con ellos por ELISA; es decir su capacidad de replicarse en ausencia de siálicos correlacionó con la capacidad para infectar en presencia de los MAbs anti-VP8 (29). Tomando en consideración estos datos, podríamos plantear 2 posibilidades en cuanto a la localización del epítipo que reconocen estos MAbs:

- 1) Los MAbs reconocen un epítipo de VP8, de manera que las variantes seleccionadas con estos MAbs son menos susceptibles a la ausencia de siálicos (al igual que las mutantes nar y gpr) y,
- 2) Los MAbs reconocen un epítipo de VP5 de manera que las variantes poseen un cambio en esta región que facilita la infección en ausencia de siálicos (se han propuesto 2 sitios de interacción inicial entre VP4 presente en el virus y la célula huésped, uno a través de VP8-siálicos y otro a través de VP5 que conduce a la penetración viral).

CONCLUSIONES

- 1.- Se obtuvieron variantes antigénicas de la cepa de rotavirus porcino YM que escaparon a la neutralización con anticuerpos monoclonales neutralizantes.
- 2.- La capacidad de hemaglutinación de las variantes no se encuentra alterada.
- 3.- Los MAb's MAYM1, MAYM4 y MAYM6 reconocen epítopes relacionados.
- 4.- El MAYM13 y el MAYM12 reconocen epítopes diferentes pero están parcialmente relacionados con los otros MAb's.
- 5.- La actividad neutralizante del MAYM4 y MAYM12 está relacionada con la interacción de rotavirus YM con ácidos siálicos

BIBLIOGRAFIA

- 1.-Arias. F.C, A.M. Ruiz, y S. López. 1989. Further antigenic characterization of porcine rotavirus YM. J. Clin. Microb. 27:2871.
- 2.-Aytay,S, y I.T. Schulze. 1991. Single amino acid substitutions in the hemagglutinin can alter the host range and receptor binding properties of H1 strain of Influenza A virus. J.Virol. 65:3022.
- 3.-Bishop,R.F, G.P. Davidson, I.H. Holmes, y B.J.Ruck. 1973. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with viral gastroenteritis. Lancet. 2:1281.
- 4.-Burns,W.J, H.B. Greenberg, R.D. Shaw, y M. K. Estes. 1988. Functional and topographical analyses of epitopes on the hemagglutinin (VP4) of the simian rotavirus SA11. J. Virol. 62:2164.
- 5.-Coulson,B.S, K.J. Fowler, R.F. Bishop, y R.G.H. Cotton.1985. Neutralizing monoclonal antibodies to human rotavirus and indications of antigenic drift among strains from neonates. J. Virol. 54:14
- 6.-Dietzhold,B, W.H. Wunner, T.J. Wiktor, A.D. Lopes, M. Lafon, C.L. Smith, y H. Koprowski. 1983. Characterization of an antigenic determinant of the glycoproteins that correlates with pathogenicity

of rabies virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80:70

7.-Dunn, J., R.L. Ward, M.M. McNeal, T.L. Cross, and H.B. Greenberg. 1983. Identification of a new neutralization epitope on VP7 of human serotype 2 rotavirus and evidence for electroferotype differences caused by single nucleotide substitutions. Virology 37:156.

8.-Espejo, R.T, S. López, y C.F. Arias. 1981. Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and effect of trypsin. J. Virol. 37:156.

9.-Estes, M.K, y Cohen J. 1989. Rotavirus gene structure and function. Microb. Rev. 53:410.

10.-Fiore, L, H.B. Greenberg, y R.E. Mackow. 1990. The VP8 fragment of VP4 is the rhesus rotavirus hemagglutinin. Virology. 181:001.

11.-Flewett, T.H, A.S. Bryden, H. Davies, G.N. Woode, J.C. Bridger, y J.M. Derrick. 1974. Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. Lancet. 2:61.

11a.-Fuentes E. 1994. Tesis de Maestría en Investigación biomédica básica. UACPyP.CCH.UNAM.

12.-Fukudome, K, O. Yoshie, y T. Konno. 1989. Comparasion of human,

simian, and bovine rotaviruses for requirement of sialic acid hemagglutination and cell adsorption. *Virology*. 172:196.

13.-Fukuhara, N, O. Yoshie, S. Kitaoka, y T. Konno. 1988 Role of VP3 in human rotavirus internalization after target cell attachment via VP7. *J. Virol.* 62:2209

14.-Gallegos, C.O, y J.T. Patton. 1989. Characterization of rotavirus replication intermediates: a model for the assembly of single-shelled particles. *Virology*. 172:616.

15.-Gonzales-Scarano, F, R.S. Janssen, J.A. Najjar, N. Pobjecky, y N. Nathanson. 1985. An avirulent G1 glycoprotein variant of La Crosse bunyavirus with defective fusion function. *J. Virol.* 54:757.

16.-Greenberg, H.B, J. Flores, A.R. Kalica, R.G. Wyatt, y R. Jones. 1983. Gene coding assignments for growth restriction, neutralization and subgroup specificities of the Wa and DS-1 strain of human rotavirus. *J. Gen. Virol.* 64: 313.

17.-Greenberg, H.B, J. Valdesuso, K. van Wyke, K. Midthun, M. Walsh, V. McAuliffe, R.G. Wyatt, A.R. Kalica, J. Flores, y Y. Hoshino. 1983. Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies directed at two surface proteins of rhesus rotavirus. *J. Virol.* 47:267.

- 18.-Hoshino,Y, M.M. Serreno, K. Midthun, J. Flores, A.Z. Kapikian, y R.M. Chanock. 1985. Independent segregation of two antigenic specifites (VP4 and VP7) involved in neutralization of rotavirus infectivity. Proc. Natl. Acad. USA. 82:8701.
- 19.-Kalica,A.R, J. Flores, y H.B. Greenberg. 1983. Identification of rotaviral gene that codes for the hemagglutinin and protease-enhanced plaque formation. Virology. 125:194.
- 20.-Kaljot,K.T, R.D. Shaw, D.H. Rubin, y H.B. Greenberg. 1988. Infectious rotavirus enter cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis. J. Virol. 62:1136.
- 21.-Kapikian,A.Z, y R.M. Chanock. 1985. Rotavirus. 863-903. In B.N. Fields, D.N. Knipe, J.L. Melnick, R.M. Chanock, B. Roizman, and R.E. Shope (eds.), Rotavirus. Raven Press, New York.
- 22.-Kitaoka,S, N. Fukuhara, T. Tazawa, H. Suzuki, T. Sato, T. Konno, T. Ebino, y N. Ishida. 1986. Caharacterization of monoclonal antibodies against human rotavirus hemagglutinin. J. Med. Virol. 19:313.
- 23.-Lizano,M, S. López y C.F. Arias. 1990. The amino-terminal half of rotavirus SA114fM VP4 protein contains a hemagglutination domain and primes for neutralizing antibodies to the virus. J. Virol. 65:1383.

- 24.-López, S, I. López, P. Romero, E. Méndez, X. Soberon, y C.F. Arias. 1991. Rotavirus YM gene 4: analysis of its amino acid sequence and prediction of the secondary structure of VP4 protein. J. Virol. 65:3738.
- 24a.-López, S. C.F. Arias, J.R. Bell, J.H. Strauss, y R.T. Espejo. 1985. Primary structure of the cleavage site associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. Virology. 114:11
- 25.-Lui, M.N. Mattion, y M.K. Estes. 1992. Rotavirus VP3 expressed in insect cells possesses guanylyltransferase activity. Virology. 188:77.
- 26.-Mackow, E.R, J.W. Barnett, H. Chan, y H.B. Greenberg. 1989. The rhesus rotavirus outer capsid protein VP4 functions as a hemagglutinin and is antigenically conserved when expressed by a baculovirus recombinant. J. Virol. 63:1661.
- 27.-Mackow, E.R, R.D. Shaw, S.M. Matsui, P.T. Minh-Ngoc Dang, y H.B. Greenberg. 1988. The rhesus rotavirus gene encoding protein VP3: location of amino acids involved in homologous and heterologous rotavirus neutralization and identification of a putative fusion region. Proc. Natl. Acad. Sci. 85:645.
- 28.-Matsui, S.M, E.R. Mackow y H.B. Greenberg. 1989. Molecular determinant of rotavirus neutralization and protection. Adv. Virus

Res.

- 29.-Méndez, E, C.F. Arias, y S. López. 1993. Binding to sialic acids is not an essential step for the entry of animal rotaviruses to epithelial cells in culture. *J. Virol.* **67**:5253.
- 30.-Mitchell, D.B. y G.W. Both. 1990. Completion of the genomic sequence of the simian rotavirus SA11: nucleotide sequences of segments 1, 2, and 3. *Virology.* **177**:324.
- 31.-Morita, Y, K. Taniguchi, T. Urasawa, y S. Urasawa. 1988. Analysis of serotype-specific neutralization epitopes on VP7 of human rotavirus by the use of neutralizing monoclonal antibodies and antigenic variants. *J. Gen. Virol.* **69**:451.
- 32.-Nepom, J.T, R.L. Tardieu, R.L. Epstein, J. Noteworthy, H.L. Weiner, y M.I. Greene. 1982. Anti-idiotypic to a reovirus-binding site related idiotypic interacts with peripheral lymphocyte subsets. *Surv. Immunol. Res.* **11**:255.
- 32a.-Parry, N., Fox, G., Rowlands, D., Brown, F., Fry, E., Acharya, R., Logan, D. y Stuart, D. 1990. Structural and serological evidence for a novel mechanism of antigenic variation in foot-and-mouth disease virus. *Lett. of Nature* **347**:569
- 33.-Patton, J.T, y C.O. Gallegos. 1988. Structure and protein

composition of the rotavirus replicase particle. *Virology*. **166**:358.

34.-Patton, J.T, y C.O. Gallegos. 1990. Rotavirus RNA replication: single stranded RNA extends from the replicase particle. *J. Gen. Virol.* **71**:1087.

35.-Prasad,B.V. G.J. Wang, J.P. Clerx, y W. Chiu. 1988. Three-dimensional estructura of rotavirus. *J. Mol. Biol.* **199**:269.

36.-Rogers,G.N., J.C. Paulson, R.S. Daniels, J.J. Skehek, I.A. Wilson, y D.C. Wiley. 1983. Single amino acid substitution in influenza haemagglutinin change receptor binding specificity. *Nature*. **304**:76.

37.-Ruggeri,M.F, y H.B. greenberg. 1991. Antibodies to the trypsin cleavage peptide VP8 neutralize rotavirus by inhibiting binding of virions to target cells in culture. *J. Virol.* **65**:2211.

38.-Ruiz,M.A, I.V. López, S. López, R. T. Espejo, y C.F. Arias. 1988. Molecular and antigenic caracterizacion of porcine rotavirus YM, a possible new rotavirus serotype. *J.Virol.* **62**:4331.

39.-Sabara,M, J.E. Gilchrist, G.R. Hudson, y L.A. Babiuk. 1985. Preliminar characterization of an epitope involved in nautralization and cell attachment that is located on the major bovine rotavirus glycoprotein. *J. Virol.* **53**:58.

40.-Shaw,R.D, P.T. Vo, P.A. Offit, B.S. Coulson, y H.B. Greenberg.1986. Antigenic mapping of the surface proteins of rhesus rotavirus. Virology. 155:434.

41.-Sigrun S, H.J. Gross, R. Brossmer, H.D. Klenk, y G. Herrler. 1991. A single point mutation of the Influenza C virus glycoprotein (HEF) changes the viral receptor-Binding activity. Virology. 188:85.

42.-Spriggs,D.R, R.T. Bronson, y B.N. Fields. 1983. Hemagglutinin variants of reovirus type 3 have altered central nervous system tropis. Science. 220:505.

43.-Spriggs,D.R, y B.N. Fields.1982. Attenuated reovirus type3 strains generated by selection of hemagglutinin antigenic variants. Nature. 297:68.

44.-Taniguchi,K, W.L. Maloy, K. Nishikawa, K.Y. Green, Y. Oshino, S. Urasawa, A.Z. Kapikian, R.M. Chanock, y M. Gorziglia. 1988. Identification of cross-reactive and serotype 2-specific neutralization epitopes on VP3 of human rotavirus. J. Virol. 62:2421.

45.-Taniguchi,K, Y. Oshino, K. Nishikawa, K.Y. Green, W.L. Maloy, Y. Morita, S. Urasawa, A.Z. Kapikian, R.M. Chanock, y M. Gorziglia. 1988. Cross-reactive and serotype-specific neutralization epitopes

on VP7 of human rotavirus: nucleotide sequence analysis of antigenic mutants selected with monoclonal antibodies. J. Virol. 62:1870

46.-Taniguchi, K, S. Urasawa, y T. Urasawa. 1985. Preparation and characterization of neutralizing monoclonal antibodies with different reactivity patterns to human rotaviruses. J. Gen. Virol. 66:1045.

47.-Valenzuela, S, J. Pizarro, A.M. Sandini, M. Vazquez, J. Fernandez, O. Hernandez, J. Patton, y E. Spencer. 1991. Photaffinity labeling of rotavirus VP1 with 8-azido-ATP: identification of the viral RNA polimerase. J. Virol. 65:3964.

48.-Yewdell, W.J, A.Taylor, A. Yellen, A. Caton, W. Gerhard, y T. Bachi. 1993. Mutations in or near fusion peptide of the Influenza virus hemagglutinin affect an antigenic site in the globular region. J. Virol. 67:933.

49.-Yolken, H.R, R. Willoughby, S. Wee, R. Miskuff, y S. Vonderfecht. 1987. Sialic acid glycoproteins inhibit in vitro and vivo replication of rotaviruses. J. Clin. Invest. 79:148.

50.-Yong-Jie, Z, J.W. Burns, Y. Morita, T. Tanaka, y M.K. Estes. 1994. Localization of rotavirus VP4 neutralization epitopes involved in antibody-induced conformational changes of virus

structure. J. Virol. 68:3955.