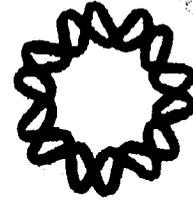




Instituto de Biotecnología  
Universidad Nacional Autónoma de México



03072  
2  
29/03

---

---

**“RESPUESTA DE CELULAS T COOPERADORAS  
INDUCIDAS POR ROTAVIRUS EN RATONES ADULTOS  
BALB/c”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE**

**MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA**

**PRESENTA**

**MARIA DOLORES BAÑOS GONZALEZ**

Cuernavaca, Mor.

1996

**TESIS CON  
FALLA LE CRICEN**

**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 esta 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.

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Genética y Fisiología Molecular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de Dr. Fernando Esquivel Guadarrama. Durante la realización de este trabajo, se contó con el apoyo económico de Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología ( CONACyT))a través del proyecto M9212-1883 y

**A mis padres  
Por su amor y apoyo incondicional**

**A mis hermanos  
Eduardo, Teresa, Claudia, Angel y Miriam**

## **RECONOCIMIENTOS**

A los Dr. Carlos Arias y a la Dra. Susana López por aceptarme en su grupo de trabajo y por el apoyo que recibí para la realización de esta tesis.

Al Dr. Fernando Esquivel Guadarrama por su apoyo y por todas sus enseñanzas que me transmitió a lo largo de mi formación.

A los miembros del Jurado por la revisión del manuscrito de la tesis y sus valiosas aportaciones en la discusión de la misma.

Dr. Carlos Arias Ortiz  
Dr. Fernando Esquivel Guadarrama  
Dra. Yvonne Rosenstein Azoulay  
Dr. Vianney Ortiz Navarrete  
Dr. Gustavo Pedraza Alva

A quienes me apoyaron en el desarrollo de este trabajo

Biol. Susana García  
Sr. Rubén Blancas  
Sr. Pedro Romero  
Dra. Elizabeth Mata  
Dr. Fernando Romero

A mis amigos Betty, Rocío, Gaby, Toño, Froylán, Francisco, Martha, Humberto y Ernesto por todos los momentos que vivimos juntos.

## ABREVIATURAS

<b>Th</b>	Células T cooperadoras
<b>Tc</b>	Células T citotóxicas
<b>MHC</b>	Mayor histocompatibility complex
<b>HLA</b>	Human leukocyte antigens
<b>β2m</b>	Beta 2 microglobulina
<b>IL's</b>	Interleucinas
<b>Ii</b>	Cadena invariante
<b>CPA's</b>	Células presentadoras de Antígeno
<b>TCR</b>	Receptor de células T
<b>CPM</b>	Cuentas por minuto
<b>I.E.</b>	Índice de estimulación
<b>[<sup>3</sup>H-Tdr]</b>	Timidina tritiada
<b>HOMOTÍPICA</b>	Serotipo específica
<b>HETEROTÍPICA</b>	Entre diferentes cepas virales
<b>HA</b>	Hemaglutinina de Influenza
<b>NP</b>	Nucleoproteína de Influenza
<b>MTT</b>	Triazolyl blue
<b>HEPES</b>	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico
<b>HAT</b>	Hipoxantina Timidina Aminopterina
<b>2-ME</b>	2 - Mercapto etanol
<b>EDTA</b>	Ac. etilendiamino tetracético
<b>aa</b>	Aminoácidos
<b>A</b>	Alanina
<b>R</b>	Arginina
<b>N</b>	Asparagina
<b>D</b>	Ácido aspártico
<b>C</b>	Cisteína
<b>Q</b>	Glutamina
<b>F</b>	Fenilalanina
<b>L</b>	Leucina
<b>P</b>	Prolina
<b>T</b>	Treonina
<b>I</b>	Isoleucina

## RESUMEN

La infección por rotavirus es una de las mayores causas de gastroenteritis en infantes y un gran número de animales neonatos tanto en países desarrollados como subdesarrollados.

En este trabajo se evaluó la respuesta de las células Th CD4<sup>+</sup> contra rotavirus por medio de la secreción de interleucinas (IL's) de células de bazo cultivadas en masa y de hibridomas de células Th procedentes de ratones BALB/c (H-2<sup>d</sup>) inmunizados i.p. con rotavirus YM (G11;porcino). Ante la estimulación antigénica, se encontró a nivel policlonal que células Th pueden reconocer al rotavirus tanto de manera homotípica como heterotípica y que VP6 es un blanco importante de esta respuesta. La mejor activación de las células Th se indujo con el fragmento de VP6 que comprende la región 171-397. El análisis de la especificidad a nivel clonal se realizó generando hibridomas de células Th específicas para VP6 de YM. De esta manera, se encontró que la región 171-397 es reconocida por al menos 4 clonas. Al analizar una clona representativa (3G5.7) se localizó un epítotope de células Th en la región 289-302 de VP6 con la secuencia 289-RLSFQLVRPPNMTP-302. Este epítotope fue localizado usando una batería de péptidos sintéticos de 14 aminoácidos de longitud sobrelapados por 8 aa que cubren la región de VP6 181-397. La presencia de este epítotope está restringido por la molécula del MHC clase II IE<sup>d</sup> y se encuentra altamente conservado entre las cepas de rotavirus YM, SA11, Ch2, UK, TS1090, CU-1 y OSU analizadas, lo que resulta en una respuesta heterotípica. Finalmente al evaluar la respuesta clonal ante la cepa de rotavirus H-2 (G3;equina), ésta se ve totalmente abatida por la presencia de dos prolinas adicionales en las posiciones 299 y 300 dentro del epítotope.

Estos resultados indican que las células Th específicas para rotavirus pueden reaccionar ante diferentes serotipos virales y que VP6 específicamente la región 171-397 es un blanco importante de esta respuesta.

## Indice

### **INDICE**

### **RESUMEN**

<b>I. INTRODUCCION</b>	<b>4</b>
<b>A. ROTAVIRUS</b>	<b>4</b>
1. Importancia	4
2. Estructura y función	4
<b>B. RESPUESTA DE CELULAS T</b>	<b>5</b>
1. Generalidades	5
2. Organización del MHC	6
3. Procesamiento y presentación de antígeno	7
4. Función efectora de células T	8
<b>C. RESPUESTA INMUNE EN LA INFECCION POR ROTAVIRUS</b>	<b>9</b>
1. Respuesta de Anticuerpos	9
2. Respuesta de células T citotóxicas (Tc)	10
3. Respuesta de células T cooperadoras (Th)	11
<b>II. JUSTIFICACION</b>	<b>12</b>
<b>III. OBJETIVOS</b>	<b>12</b>
<b>A. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>12</b>
<b>B. OBJETIVOS ESPECIFICOS</b>	<b>12</b>
<b>IV. MATERIALES Y METODOS</b>	<b>13</b>
<b>A. RATONES E INMUNIZACIONES</b>	<b>13</b>
<b>B. MEDIOS DE CULTIVO Y LINEAS CELULARES</b>	<b>13</b>
<b>C. ROTAVIRUS</b>	<b>14</b>
1. Crecimiento	14
2. Semi-purificación por colchón de sacarosa	15
3. Purificación por Cloruro de Cesio	15
<b>D. DETERMINACION DE PROTEINA</b>	<b>15</b>
<b>E. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)</b>	<b>16</b>
<b>F. WESTERN - BLOT</b>	<b>16</b>

## Indice

<b>G. TRATAMIENTO DE LAS PREPARACIONES VIRALES</b>	<b>16</b>
<b>H. PEPTIDOS SINTETICOS</b>	<b>17</b>
<b>I. EXPRESION DE VP6 Y SUS FRAGMENTOS</b>	<b>17</b>
1. Clonación de los fragmentos de DNA que codifican para VP6 y los extremos amino y carboxilo terminal en PGEX	18
2. Expresión y tratamiento de bacterias	18
3. Preparación de los extractos proteicos para cultivo <i>in vitro</i>	21
<b>J. FUENTES DE INTERLEUCINAS</b>	<b>21</b>
<b>K. ESTIMULACION DE LAS CELULAS Th AISLADAS DE BAZO</b>	<b>21</b>
<b>L. GENERACION DE HIBRIDOMAS DE CELULAS Th</b>	<b>21</b>
<b>M. TRATAMIENTO DE LAS CELULAS DE BAZO CON MITOMICINA C</b>	<b>22</b>
<b>N. ESTIMULACION DE HIBRIDOMAS</b>	<b>23</b>
<b>O. EVALUACION DE INTERLEUCINAS DE LOS SOBRENADANTES DE CULTIVO</b>	<b>23</b>
1. Incorporación de [ <sup>3</sup> H]-Tdr	23
2. MTT	24
<b>P. ENSAYOS DE RESTRICCION POR EL MHC CLASE II</b>	<b>24</b>
1. Presentación de antígeno por células L transfectadas	24
2. Bloqueo de las moléculas del MHC clase II con anticuerpos monoclonales.	24
<b>V. RESULTADOS</b>	<b>25</b>
<b>A. RESPUESTA ANTI-VIRAL DE CELULAS Th A NIVEL POLICLONAL</b>	<b>25</b>
1. Estandarización del sistema de detección de interleucinas	26
2. Dosis óptima de antígeno necesario para la inducción de células Th anti-rotavirus	28
3. Respuesta heterotípica	29
4. Respuesta de células Th hacia VP6 de YM	30
<b>B. RESPUESTA CLONAL DE CELULAS Th</b>	<b>33</b>
1. Generación de hibridomas de celulas Th anti-rotavirus	34
2. Clonación limitante de las líneas 3G5 y 3A12	35
3. Especificidad de las clonas procedentes de 3G5	39
4. Región de VP8 que reconoce la clona 3G5.7	41
5. Localización del epítope reconocido por la clona 3G5.7	43

## Indice

6. Restricción por el MHC clase II de 3G5.7	46
7. Reacción cruzada de la clona 3G5.7 ante distintas cepas virales	48
8. Comparación de la secuencia de aminoácidos de la región 289-302 de VP6 de cuatro cepas de rotavirus	52
<b>VI. DISCUSION</b>	<b>53</b>
<b>VII. CONCLUSIONES</b>	<b>58</b>
<b>VIII. PERSPECTIVAS</b>	<b>59</b>
<b>IX. INDICE DE TABLAS Y FIGURAS</b>	<b>60</b>
<b>X. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>61</b>

## I. INTRODUCCION

### A. ROTAVIRUS

#### 1. Importancia

La infección por rotavirus es una de las mayores causas de gastroenteritis en infantes y un gran número de animales neonatos tanto en países desarrollados como subdesarrollados. Este virus infecta y destruye a los enterocitos del intestino delgado lo que conduce a un cuadro de diarrea agudo que de no ser bien atendido puede conducir a la muerte del paciente. El mayor nivel de mortalidad provocado por esta infección se da en los países subdesarrollados donde existe una deficiente atención médica y donde se han reportado hasta 1 millón de muertes al año<sup>1</sup>. Esto convierte a la infección por rotavirus en un serio problema de salud pública.

Por ello, desde hace tiempo se ha intentado crear una vacuna como una medida de prevención ante la infección por rotavirus. Sin embargo, las vacunas hasta ahora evaluadas sólo han conferido una protección parcial<sup>2,3</sup>. Con la finalidad de desarrollar una vacuna eficaz y que pueda proteger contra la mayorías de las cepas de rotavirus circulantes, es importante estudiar en detalle a los elementos del sistema inmune involucrados en protección, así como las proteínas rotavirales blanco de esta respuesta.

#### 2. Estructura y función

Los Rotavirus son virus icosaédricos sin membrana compuestos de un genoma de 11 segmentos de RNA de doble cadena. Presentan tres capas concéntricas de proteínas llamadas capa externa, capa intermedia y capa interna ó core<sup>4,5</sup>. El core del virión está constituido predominantemente por VP2 (102kDa), la cual rodea al genoma viral así como a la RNA polimerasa VP1 (125kDa) y a la guanidiltransferasa VP3 (98kDa)<sup>6,7</sup>. Al parecer VP2 puede estar asociada al genoma a través de zippers de leucina que junto con otras proteínas estructurales y no estructurales pueden inducir el plegamiento del RNA y su empaquetamiento dentro de partículas de capa sencilla<sup>8</sup>. La capa intermedia está constituida por VP6 (44kDa); es la proteína más abundante del virión (51% en peso total del virión), la cual rodea al core. Esta proteína posee determinantes antigénicos conservados con los que se han clasificado a los rotavirus en 7 grupos (A-G) y en 4 subgrupos (SG). El grupo A de rotavirus es el más

## Introducción

importante epidemiológicamente y dependiendo de la presencia ó ausencia de antígenos tipo I ó II a estos virus se les ha clasificado en los siguientes subgrupos: SGI, SGII, SGI/II ó SG no I/II<sup>9</sup>. La capa externa esta formada por las proteínas VP4 (88kDa) y VP7 (37kDa), las cuales son blanco de anticuerpos neutralizantes<sup>10</sup> y presentan una alta variabilidad antigénica entre distintas cepas virales. En el virión VP4 y VP7 se encuentran estrechamente relacionadas ya que VP7 constituye la superficie sobre la cual VP4 se encuentra insertada<sup>11</sup>. VP4 cumple funciones biológicas preponderantes para el virus tales como virulencia, hemaglutinación, unión y penetración del virus a la célula huésped. El rompimiento proteolítico de VP4 da lugar a los polipéptidos VP5 (60KDa) y VP8 (28KDa) lo cual conduce a un incremento drástico en la infectividad del virus<sup>12</sup>. Finalmente, en la células infectadas se presentan 5 proteínas no estructurales (NS) las cuales juegan un papel importante tanto en la replicación como en el ensamblaje del virus<sup>10</sup>

Una vez que el rotavirus se une a las células susceptibles este sigue dos caminos al interior de la célula. El primero es a través de penetración directa, tripsina dependiente y el segundo, a través de endocitosis mediada por un receptor. Existen evidencias que la penetración directa es el mecanismo por el cual el rotavirus lleva a cabo una infección productiva<sup>13</sup>. Cuando el virus es internalizado, el desnudamiento del virus se lleva a cabo, se activa la transcriptasa viral y consecuentemente se generan transcritos de RNA<sup>14</sup>. La traducción de estos produce las proteínas virales dentro de las cuales VP1,VP2,VP3 y VP6 son ensambladas en el cuerpos de inclusión viroplásmica situados en el citoplasma de las células. Estas partículas encierran el genoma viral compuesto de 11 segmentos de doble cadena del RNA. De esta manera una vez ensambladas las partículas geman al interior del retículo endoplásmico (RE) donde adquieren una membrana lipídica procedente del RE y la capa externa formada de VP4 y VP7. El proceso de gemación es mediado por la interacción de VP6 con el dominio citoplásmico de una proteína noestructural llamada NSP4 presente en la membrana del RE. Finalmente, en la formación de viriones maduros la membrana lipídica adquirida se pierde y los viriones son entonces liberados al medio circundante al morir la célula infectada. El ciclo completo dura alrededor de 8 hrs<sup>14</sup>.

## **B. RESPUESTA DE CELULAS T**

### **1. Generalidades**

Las células T son un subgrupo de linfocitos derivados de la médula ósea que llevan a cabo su maduración completa en el timo. En base a su función y a su fenotipo estas células se han

## Introducción

subdividido en células T citotóxicas (Tc) (CD4<sup>-</sup>, CD8<sup>+</sup>) y células T cooperadoras (Th) (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>-</sup>). Como su nombre lo indica las células Tc atacan y destruyen principalmente células infectadas con virus, células alogénicas implicadas en el rechazo de tejidos y células tumorales. Esta función es mediada por la liberación de factores solubles (perforinas) ó por la inducción de muerte celular programada a través de Fas. Por otro lado, las células Th proveen ayuda, a través de la secreción de interleucinas (IL's) a células B y células Tc. Además, se ha demostrado que pueden tener una función efectora directa tal como la citotoxicidad<sup>15,16</sup>. Cabe mencionar que las células Tc pueden también liberar algunas interleucinas cuando son sobreestimuladas<sup>17</sup>.

La respuesta inmune celular en contra de antígenos extraños es la determinada por la capacidad de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC en el ratón, HLA en el humano) de las células presentadoras de antígeno (CPA) de presentar fragmentos peptídicos a las células T. A este nivel también existe una dicotomía ya que las células Tc reconocen péptidos de 8-10 aminoácidos en asociación con las moléculas del MHC clase I y las células Th reconocen péptidos de 12-25 aminoácidos en asociación con las moléculas del MHC clase II<sup>15</sup>. Con la excepción de algunas células tales como las neuronas, la mayoría de las células del organismo presentan de manera constitutiva moléculas de clase I en su superficie. Por otro lado, las moléculas de clase II sólo se presentan en algunas células especializadas tales como células dendríticas, macrófagos y células B. Estas son capaces de procesar y presentar antígeno a las células T por lo que son llamadas células presentadoras de antígeno.

## 2. Organización del MHC

Las proteínas que componen el MHC son glicoproteínas de superficie que unen péptidos dentro de la célula y las presentan sobre su superficie a las células T. Los genes que lo componen son los más polimórficos del genoma. Tanto en el ratón como en el humano los que codifican para las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad se encuentran ubicados en un sólo cromosoma a excepción del gene que codifica para la beta<sub>2</sub>microglobulina ( $\beta$ 2m). En el ratón se encuentran ubicados dentro de la región H-2 en el cromosoma 17 y el gene de la  $\beta$ 2m en el cromosoma 2. En el humano, todas las moléculas del HLA son codificadas en el cromosoma 6 y la  $\beta$ 2m se codifica en el cromosoma 15. Los dominios proteicos que conforman tanto las moléculas clase I como las clase II son diferentes pero similares en estructura. Estos tienen dos dominios proximales a la membrana semejante a los que poseen las Inmunoglobulinas y un dominio distal de unión para el péptido formado

## Introducción

por una región de  $\beta$ -plegadas y dos regiones de  $\alpha$ -hélices<sup>18,19</sup>. Dentro del marco de esta redacción hablaremos únicamente de los genes del ratón. En la región H-2 se han identificado al menos cinco locus independientes involucrados en el rechazo de tejidos. Entre estos, H-2 K, D y L codifican para la cadena  $\alpha$  del MHC clase I (46KDa) la cual, se encuentra asociada a través del tercero y último de sus dominios extracelulares a la molécula  $\beta_2m$  (12 KDa). Por otro lado, las cadenas  $\alpha$  (33–35 KDa) y  $\beta$  (25–30 KDa) que conforman el MHC clase II son codificadas en el ratón en los locus IA e IE. En ambas moléculas se han identificado motivos de unión a péptidos. Sin embargo, en las moléculas del MHC clase II éstos han sido difíciles de caracterizar debido a las diferentes longitudes de los péptidos y a la flexibilidad del sitio de unión. La porción de las moléculas del MHC clase I que interactúan con los péptidos antigénicos consiste de aproximadamente 180 aa y esta conformada de los dos dominios extracelulares de la cadena  $\alpha$ . Estas proteínas interactúan a través de puentes de hidrógeno con péptidos pequeños usando residuos conservados presentes en los extremos del sitio de unión formando un arco de flecha<sup>20</sup>. En las moléculas del MHC clase II ambas cadenas se han subdividido en dos segmentos de 90 aa llamadas  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  ó  $\beta_1$  y  $\beta_2$  respectivamente constituyendo los segmentos  $\alpha_1$  y  $\beta_1$ <sup>15</sup>, la región que interactúa con el péptido. Las proteínas clase II unen péptidos de longitud arbitraria usando residuos conservados distribuidos a lo largo del sitio de unión formando una estructura extendida<sup>18</sup>. En ambas regiones clase I y clase II involucradas en la unión de péptidos se encuentran agregados residuos polimórficos, los cuales proporcionan la base para la preferencia de diferentes alelos por diferentes motivos en la secuencia de los péptidos.

### 3. Procesamiento y presentación de antígeno

En las CPA las vías intracelulares para la producción de los complejos antigénicos reconocidos por las dos subpoblaciones de células T también difieren entre sí. Los péptidos destinados a la asociación con las moléculas del MHC clase I son generados a partir de la degradación de proteínas sintetizadas ó introducidas directamente dentro del citosol celular, los cuales son trasladados al RE para poder ser ensamblados a las moléculas del MHC clase I<sup>21</sup> previamente asociadas a la molécula  $\beta_2$ -microbulina ( $\beta_2m$ ). El transporte de los péptidos al interior del RE esta mediado por las proteínas transportadoras asociadas a la presentación de antígeno (TAP) 1 y 2. Estas proteínas, que forman heterodímeros en la membrana del RE, son miembros de la familia de proteínas enlazadoras de ATP<sup>22</sup>. Solo cuando el complejo trimérico péptido-clase I- $\beta_2m$  se ha formado, es transportado a la superficie celular donde es reconocido por la células Tc.

## Introducción

Los péptidos destinados a asociarse con las moléculas del MHC clase II son producidos por la degradación de proteínas exógenas y endógenas transmembranales introducidas al sistema endosomal celular vía pinocitosis, fagocitosis o internalización mediada por receptor. Posteriormente el endosoma se fusiona con un lisosoma iniciándose la degradación de la proteína. Los péptidos así generados se asocian a la moléculas del MHC clase II en un compartimento endosomal/lisosomal llamado MIIC<sup>23,24</sup>. La asociación con el péptido estabiliza a la molécula clase II lo cual permite su transporte a la superficie celular. Aunque el conocimiento del camino preciso que siguen las moléculas del MHC clase II para poder encontrar al péptido es aún incompleto, recientemente se han hecho grandes avances al respecto. Una vez que las moléculas del MHC clase II son sintetizadas y transportadas al RE se asocian a la proteína llamada cadena invariante (Ii)<sup>25</sup>. Esto permite su transporte a través del aparato de Golgi y del sistema vesicular exocítico. En esta ruta, el complejo MHC clase II-Ii se estaciona transitoriamente en el compartimento MIIC, donde se lleva a cabo la degradación parcial de Ii hasta generarse un pequeño polipéptido llamado CLIP, fragmento que debe ser disociado para permitir el ensamblaje de los péptidos antigénicos. En este evento interviene una proteína estructuralmente semejante a la molécula clásica del MHC clase II llamada HLA-DM (humano) ó H-2M (ratón)<sup>26</sup> la cual es la directamente responsable de la disociación de CLIP.

### 4. Función efectora de células T

Como resultado del reconocimiento específico de los péptidos asociados a las moléculas del MHC por parte del TCR y de las interacciones de distintos coreceptores, los linfocitos T son activados llegando a adquirir distintas funciones efectoras<sup>27</sup>.

Las células Tc una vez que han sido diferenciadas pueden eliminar a su célula blanco preferencialmente mediante un mecanismo de citotoxicidad directa en el cual las células Tc liberan proteínas formadoras de poros en la membrana (perforinas)<sup>28</sup> ó alternativamente a través de un segundo mecanismo que implica la inducción de apoptosis mediada por la molécula de superficie celular llamada Fas (Apo-1)<sup>29</sup>. Sin embargo, también se ha visto que pueden mediar la lisis celular por un tercer mecanismo que implica la secreción de TNF- $\beta$ <sup>30</sup>.

Las células Th activadas funcionan como reguladores de la respuesta inmune, ya que a través de la secreción de una serie de factores solubles llamados interleucinas (IL's) y de la expresión de distintas moléculas de superficie son las responsables de la diferenciación y de la proliferación de diversas poblaciones celulares, tales como células Tc y células B. En base al patrón de secreción de IL's, las células Th se han subdividido en células Th1 y Th2 implicadas en la inmunidad celular y en la respuesta inmune humoral respectivamente. Las

## Introducción

células Th1 tienden a producir principalmente IL2, linfotóxina, GM-CSF, IFN- $\gamma$  y TNF- $\beta$ , IL's involucradas en la diferenciación de las células Tc a células efectoras, en el aumento de la fagocitosis, citotoxicidad mediada por anticuerpo, en la expresión de receptores Fc, así como en la activación de macrófagos y en la generación de la reacción de hipersensibilidad de tipo tardío<sup>22</sup> además, al igual que las células Tc liberan TNF-  $\beta$  e IFN- $\gamma$  con lo que pueden atacar directamente células infectadas y controlar la infección, mientras que las células Th2 tiende a producir predominantemente IL-4, IL-5, IL-6 e IL10, factores importantes en la regulación de la síntesis de IgM, IgG1, IgA e IgE<sup>17</sup>. En la diferenciación de las células Th se ha observado que IL-4 e IL-10 promueven el desarrollo de las células Th2, mientras que IL-12 estimula el desarrollo de las células Th1<sup>31</sup>.

### **C. RESPUESTA INMUNE EN LA INFECCION POR ROTAVIRUS**

La respuesta humoral generada ante la infección por rotavirus fue considerada por mucho tiempo el principal mecanismo de protección por lo que, la estructura antigénica de las proteínas blanco de esta respuesta ha sido bien caracterizada. Posteriormente, se observó que también las células T participan de manera activa en la depuración viral. Sin embargo, aún no es clara su intervención en la resistencia a la infección tanto ante cepas homólogas (serotipo específicas) como heterólogas (pertenecientes a diferentes serotipos) y la especificidad de su respuesta ha sido poco estudiada.

#### **1. Respuesta de Anticuerpos**

Los rotavirus poseen tres especificidades antigénicas principales: de grupo, subgrupo y serotipo. Desde el punto de vista de protección, los epítopes que determinan el serotipo viral son los más importantes ya que inducen la generación de anticuerpos que neutralizan la infectividad viral. En esta respuesta están implicadas las proteínas VP4 y VP7 que por su alta variabilidad antigénica han permitido clasificar a los rotavirus en distintos serotipos.

Respecto a VP7, entre los rotavirus de humanos y de animales, han sido identificados 14 serotipos (G) por ensayos de neutralización de la infectividad viral, de los cuales sólo los serotipos G1, G2, G3, y G4 son epidemiológicamente relevantes<sup>32</sup>.

En base a VP4 se han identificado 5 serotipos (P) y un subtipo, de los cuales el serotipo P1A ha sido asociado con los serotipos G1, G3 y G4, mientras que G2 esta asociado al serotipo PIB<sup>33,34</sup>. Mapeando mutantes que escapan a la neutralización, se han localizado sobre VP7 varios epítopes que abarcan las regiones de aminoácidos 87-101, 142-152 y 208-221, en

## Introducción

VP8 los epítopes que involucran a los aminoácidos 72\*, 87, 89, 100, 114, 148, 150, 188, 217\* y sobre VP5 a los aminoácidos 305, 385\*, 388, 392, 393, 433, 439 y 458<sup>35,36\*</sup>.

Continuando con la caracterización de estos anticuerpos en protección, al realizar la transferencia pasiva por vía oral de anticuerpos monoclonales anti-VP7 ó anti-VP8 a ratones neonatos previo al desafío con cepas virulentas de rotavirus serotipos G3, G4 y G6, se observó que ambos eran capaces de proteger a los ratones ante una infección<sup>37</sup>. Posteriormente, se examinó el papel efector de los anticuerpos en la inmunidad activa. En función de esto, se inmunizaron ratones neonatos por vía oral con rotavirus murino EDIM y cepas heterólogas previo a un segundo desafío con EDIM. Esto permitió demostrar que solamente las cepas murinas EDIM, EB y la cepa SA11 de simio protegen a los ratones ante una infección subsecuente por este virus<sup>38</sup>. Sin embargo no en todos los casos se encontró una correlación clara entre la protección inducida y la presencia de anticuerpos neutralizantes en el fluido intestinal. Actualmente por los estudios realizados por Greenberg et al<sup>39</sup> sabemos que los anticuerpos del isotipo IgA son importantes en protección y que su papel es limitado en los casos de protección heterotípica.

## 2. Respuesta de células T citotóxicas (Tc)

Con la finalidad de estudiar otros elementos del sistema inmune involucrados en protección y dado que las células Tc tienen la capacidad de reconocer epítopes conservados entre distintas cepas virales, la funcionalidad de estas células ha sido también analizada. Por ensayos de citotoxicidad *in vitro* se ha demostrado que linfocitos Tc generados en ratones C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>) inoculados oralmente con cepas de rotavirus no murinas son capaces de lisar células blanco infectadas con diferentes serotipos de rotavirus humanos y animales<sup>40</sup>. Posteriormente, otros grupos observaron que al realizar una transferencia pasiva de las células de bazo de ratones C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>) previamente inmunizados con la cepa de rotavirus JMV ó RRV a ratones neonatos, estos últimos quedaban protegidos de contraer gastroenteritis ante un desafío subsecuente con JMV. En este trabajo se demostró que las células Tc constituyen uno de los efectores directos, ya que al depletarlas la protección previamente observada se veía abatida<sup>41</sup>. De igual manera, la importancia de estas células también fue analizada en ratones SCID (inmunodeficiencia severa combinada) crónicamente infectados con rotavirus, los cuales no tienen ni células T ni B funcionalmente activas. Así al realizar la transferencia pasiva de células Tc de ratones histocompatibles infectados con una cepa homóloga de rotavirus se observó que estas células podían mediar la depuración viral en ausencia de anticuerpos específicos de rotavirus e inducir la recuperación de los ratones<sup>42</sup>.

## Introducción

Con este modelo de ratón fue posible también demostrar que las proteínas VP1, VP4, VP6 y VP7 son blanco del reconocimiento de estas células cuyo papel efector puede llevar a la erradicación de la infección por rotavirus<sup>43</sup>. Finalmente cabe mencionar que sólo en VP6, VP3 y VP7 se han podido delimitar epítopes de células Tc; en VP6 está localizado en la región que comprende los aminoácidos 376-384, en VP3 la región 585-593<sup>44</sup> y en VP7 en la región del aminoácido 31 al 40<sup>45</sup>. Recientemente se han reportado resultados contradictorios respecto a la importancia de éstas células como medida de protección ante infecciones subsecuentes, ya que Franco et al<sup>46</sup>, han observado que ratones  $\beta 2m$  (knockout) deficientes en la presentación clase I para células Tc son resistentes a la infección ante cepas homólogas a pesar de la ausencia de citotoxicidad mediada por las células Tc. Sin embargo, aún cuando la protección se atribuye predominantemente a la presencia de IgA's, estos estudios son incompletos en el sentido de que no se probaron cepas heterólogas de rotavirus y la infección no es severa ya que fue realizada en adultos, donde el papel efector de las células Tc pudiera ser más significativa.

### 3. Respuesta de células T cooperadoras (Th)

En base a la respuesta observada de células Tc y anticuerpos neutralizantes en infección por rotavirus se infería que las células Th podían estar involucradas. La participación de éstas células fue inicialmente observada en ensayos de proliferación *in vitro* en sangre periférica de adultos sanos y neonatos contra rotavirus purificado<sup>47</sup>. Este ensayo se basa en la capacidad que tienen numerosas interleucinas de inducir la división celular, lo cual es cuantificable por varios métodos entre éstos la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina. Posteriormente se supo que células Th tenían una gran influencia sobre la producción de anticuerpos neutralizantes tipo IgA, cuyo principal papel efector era el abatimiento de la infección por rotavirus en becerros<sup>48</sup>. Ahora existen evidencia de que VP6 es blanco del reconocimiento de células Th en forma heterotípica, ya que se ha visto que una línea de células Th CD4<sup>+</sup> obtenida con reestimulaciones sucesivas con rotavirus puede reconocer VP6 de dos distintas cepas de rotavirus de bovino (heterotípica)<sup>49</sup>. Sin embargo, aún no se han reportados epítopes de células Th.

Objetivos

## II. JUSTIFICACION

Dado el escaso conocimiento de la especificidad de las células Th en la infección por rotavirus y su importancia en la inducción de anticuerpos neutralizantes así como en la generación de células Tc, se inició su estudio tomando como modelo a VP6, ya que esta proteína es capaz de inducir una respuesta de células Th de manera heterotípica. Por tanto, los epítopes que se localizan podrían ser relevantes en protección y por tanto utilizados como herramientas para el diseño de vacunas, así como en estudios básicos de inmunología en el sistema de rotavirus.

## III. OBJETIVOS

### A. OBJETIVO GENERAL

Establecer las condiciones experimentales para iniciar el estudio de la especificidad y función de las células Th en ratones BALB/c (H-2<sup>d</sup>) a nivel policlonal y clonal ante rotavirus y VP6.

### B. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- a) Determinar el patrón de reconocimiento a nivel policlonal de la respuesta secundaria de las células Th ante diferentes serotipos de rotavirus y VP6.
- b) Generar hibridomas de células Th para determinar a nivel clonal la especificidad de estas, con énfasis a aquellas dirigidas contra VP6.
- c) Determinar la naturaleza homotípica ó heterotípica de los hibridomas de células Th.
- d) Determinar por medio de péptidos sintéticos los epítopes reconocidos por los hibridomas de células Th.
- e) Estudiar algunas de las características funcionales *in vitro* de los hibridomas, tales como restricción por el MHC, curvas dosis-respuesta en el reconocimiento de antígeno, etc.

#### IV. MATERIALES Y METODOS

##### A. RATONES E INMUNIZACIONES

Se usaron hembras de ratón de la cepa singénica BALB/c (H-2<sup>d</sup>) de 4 a 6 semanas de edad, mantenidas bajo condiciones libres de rotavirus en los bioterios del Instituto de Biotecnología y el Instituto Nacional de Salud Pública.

Los ratones fueron inoculados i.p. con rotavirus YM con diferentes grados de purificación como sigue: Los ratones se inmunizaron una ó dos veces con el virus activado con tripsina recibiendo un segundo reto a los 15 días.

##### B. MEDIOS DE CULTIVO Y LINEAS CELULARES

Los siguientes medios de cultivo se usaron para cultivar las diferentes líneas celulares:

- a) MEM suplementado con 8% de suero bovino fetal (Gibco), 2mM glutamina, 100U/ml de penicilina y 100 µg/ml estreptomina : (MEM<sup>+</sup>).
- b) MEM suplementado sin suero : (MEM<sup>-</sup>).
- c) RPMI 1640 suplementado con 9% de suero bovino fetal, 5x10<sup>-5</sup> M 2-mercaptoetanol (2-ME), 2mM glutamina, 10mM Hapes y 10 µg/ml de gentamicina: (RPMI<sup>+</sup>).
- d) RPMI suplementado sin suero: (RPMI<sup>-</sup>)
- e) DMEM suplementado con 9% de suero bovino fetal, 2mM glutamina, 100U/ml de penicilina y 100 µg/ml estreptomina ( DMEM<sup>+</sup> )

Las células se cultivaron a 37°C en una incubadora con atmósfera humidificada y 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire. Para esto las células fueron sembradas en frascos de 25 a 75 cm<sup>2</sup> (Costar). Cuando las células alcanzaban la confluencia, se subcultivaban cada 3-4 días a una dilución 1/10 ó 1/20. En caso de tratarse células adherentes, para desprenderlas se retiró el medio de los frascos, se lavaron con 0.5 mM EDTA y finalmente se incubaron en una solución al 0.025% tripsina 0.5 mM EDTA por 5 minutos a 37°C. Las diferentes células que se emplearon están descritas en la Tabla 1.

**Tabla 1: Resumen de las características más sobresalientes de las líneas celulares**

LÍNEA CELULAR	MEDIO DE CULTIVO	CARACTERÍSTICAS
Bw 5147 TCR <sup>+</sup>	RPMI <sup>+</sup>	H-2 <sup>k</sup> αβ TCR <sup>+</sup> 50
A.20.J.	RPMI <sup>+</sup>	Linfoma de células B (H-2 <sup>d</sup> ) Ia <sup>+</sup> 51
CTLL-2	RPMI <sup>+</sup> suplementado con 20% (v/v) de sobrenadante condicionado de XGL310 mL-2 como fuente de interleucina.	Tc - (H-2 <sup>b</sup> ) dependiente de IL-2, IL-4, IL-15 52,53
XGL310 mL-2	RPMI <sup>+</sup>	Línea productora de IL-2 de ratón. Donada por el Dr. <i>Melchers</i>
MA-104	MEM <sup>+</sup>	Células epiteliales de riñón de mono rhesus
Células L	DMEM <sup>+</sup>	Fibroblastos de ratón (H-2 <sup>k</sup> ) 54
Células L IA <sup>d</sup>	DMEM <sup>+</sup>	Células L transfectadas con IA <sup>d</sup> RT2.3.3H <sup>54</sup>
Células L IE <sup>d</sup>	DMEM <sup>+</sup>	Células L transfectadas con IE <sup>d</sup> RT 10.3H2 <sup>54</sup>

### C. ROTAVIRUS

#### 1. Crecimiento

Las siguientes cepas de rotavirus adaptadas a crecer en cultivo de células fueron usadas: YM (G11:porcino), SA11 (G3:simio), Ch2 (G7:aviar), TS1090 (G3:felino), UK (G6:bovino), CU-1 (G3:canino) y H-2 (G3:equino). Estos virus se trataron con 10 µg/ml de tripsina por 30 minutos 37°C antes de infectar las células MA-104 en MEM<sup>+</sup>. Una vez observado el efecto citopático entre las 18-24 horas, los lisados se colectaron y congelaron 55.

## 2. Semi-purificación por colchón de sacarosa

Los lisados de células infectadas con rotavirus, una vez congelados y descongelados dos veces, se mezclaron con un volumen equivalente de triclorotrifluoroetano (Freón Merck). Después de una vigorosa agitación y centrifugación en el rotor JS7.5 a 7000 rpm por 30 minutos a 4°C se logró la separación de las membranas y la liberación de las partículas virales aún atrapadas. Posteriormente, para la obtención de partículas virales semi-purificadas, al término de la centrifugación, el sobrenadante libre de los restos celulares más densos se colectó y concentró por ultracentrifugación a 25,000 rpm en el rotor SW28 por 2:30 horas a 4°C. El precipitado obtenido se resuspendió en 2 ml de buffer TSCM (Tris 0.02 M, NaCl 0.15 M, 10 mM Ca<sup>++</sup>, 0.001 M Mg<sup>++</sup>; pH=8.2) y se pasó a través de un colchón de sacarosa al 30% (w/v) ultracentrifugando nuevamente en el rotor TL100.4 a 65,000 rpm por 45 minutos a 4°C. El virus semi-purificado finalmente se rescató del fondo del tubo al resuspender la pastilla insoluble en 500 µl de TSCM. Para su preservación se hicieron alícuotas de 50 µl y se almacenaron a -70°C. La estimación de proteína y la pureza de la preparación se determinó por el método de Lowry y por electroforesis en geles de poliacrilamida como se describe más adelante.

## 3. Purificación por Cloruro de Cesio

Se siguió el mismo protocolo ya mencionado en la semipurificación hasta el paso en el cual se concentra el virus. En este punto la muestra resultante se pasó a través de un gradiente isopícnico de CsCl (aplicando el virus sobre el CsCl previamente preparado a una densidad de 1.36 g/cm<sup>3</sup> en TM (buffer Tris 20 mM, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.1 M, pH=8.2). La separación de las fracciones se logró finalmente mediante ultracentrifugación a 37,000 rpm por 18 horas en el rotor SW50 a 4°C. De esta manera, las bandas opalescentes de mayor y menor densidad que correspondían en éste orden a virus sin cápside externa y a virus con cápside externa se recuperaron<sup>56</sup>.

### D. DETERMINACION DE PROTEINA

La cantidad de proteína de las preparaciones, fue estimada usando el método de Lowry modificado de Bio Rad DC (Life science research products). Para la determinación el virus se disgregaba hirviendo las muestras por 3 minutos en buffer disruptor (5% SDS en TSCM), quedando el SDS finalmente en los pozos al 0.4%, concentración aún tolerada por el método.

### **E. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)**

La pureza de las preparaciones fue analizada con el sistema de Laemmli utilizando geles de poliacrilamina al 11% bajo condiciones desnaturalizantes (0.1% SDS). Brevemente, las muestras y 10 µl de marcadores pre-teñidos de peso molecular (Gibco, Life technologies INC), se hirvieron en presencia de buffer de carga (1% SDS, 1% β-mercaptoetanol (2-ME), 2 mM EDTA, 10% glicerol, 50 mM Tris.HCl pH= 6.8) y la solución proteica obtenida se aplicó al gel para separar las proteínas electroforéticamente. Finalmente éstas se tiñeron con azul brillante de Coomasie al 0.05% en 50% de metanol y 10% de ácido acético.

### **F. WESTERN - BLOT**

Para realizar el Western Blot, después de separar las proteínas por SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Schleicher Schuell) utilizando un sistema de tres buffers consistente de el buffer A: 0.3M de Trizma base, 20% de metanol; el buffer B: 0.25 mM Trizma base 20% metanol y el buffer C: 0.25 mM Trizma base, 40 mM glicina, 20% metanol en los cuales, tanto el papel de nitrocelulosa, los filtros y el gel debían ser inmersos antes de ser colocados uno sobre otro en una cámara Semi-phor (Hoefer scientific Instruments). Para la transferencia se aplicaron 50 Volts y 96 mAmp (para un gel de 12 x 13 cm<sup>2</sup>) por 45 minutos a temperatura ambiente (TA). Al finalizar la membrana de nitrocelulosa se bloqueó con 5% Leche Carnation descremada y 0.2% Tween 20 por 2 horas a TA y posteriormente se incubó con los anticuerpos policlonales de conejo anti-YM (producido con virus purificado) y anti-VP<sub>6,242-397</sub> diluidos 1/1000 en PBST/ 5% leche por 90 minutos a TA. Entre cada paso se hicieron 3 lavados con PBS-Tween 20 de 15 minutos. Finalmente, para la detección se empleó una anti-Inmunoglobulina de cabra acoplado a peroxidasa (Kirkegard & Perry ) y se reveló con una solución compuesta de 1.5 ml de carbazole (4 mg/ml en dimetilformamida), 4ml de buffer de acetatos 0.05 M pH=5 y 10 µl de H<sub>2</sub> O<sub>2</sub> filtrada en el momento a través de una membrana millipore de 0.45 µm y mantenida en la oscuridad

### **G. TRATAMIENTO DE LAS PREPARACIONES VIRALES**

#### **a) Irradiación con luz u.v.**

Las preparaciones de virus se irradiaron con una lámpara Multiband uv 254-366-NM, empleando luz u.v. de onda corta a 1 cm de distancia de la fuente por 5 minutos. En estas condiciones se redujo en un 52% la infectividad del virus. Este tratamiento, sin embargo, fue usado principalmente para esterilizar la preparación y poder ser usada en cultivo

**b) Tratamiento con calor**

Las preparaciones virales con diferentes grados de purificación, se trataron por 30 minutos a 56°C en un baño con agua (RM ó Lauda Brinkmann). En estas condiciones se redujo en un 95% la infectividad del virus.

**H. PEPTIDOS SINTETICOS**

Treinta y cinco péptidos sintéticos de 14 aminoácidos de longitud sobrelapados por 8 aminoácidos, fueron sintetizados por la compañía Chiron Mimotopes (San Diego, Ca, EUA). Para la síntesis la secuencia de aminoácidos de la proteína VP6 de YM del aminoácido 181-397 fue tomada como base<sup>57</sup>. Este grupo de péptidos se sintetizaron usando el sistema de liberación de péptidos "multipin", en el cual los péptidos son sintetizados sobre polímeros de acrílico con el extremo carboxilo terminal bloqueado con Diketopiperazina (DKP) y son liberados a pH neutro ó alcalino, lograndose una pureza promedio de aproximadamente un 50%. Posteriormente los péptidos VP6<sub>289-302</sub> y NP<sub>216-229</sub> (RSAYERMCNILKGGK) de Nucleoproteína de Influenza A/NT/60/68 se sintetizaron de igual manera por las compañías Research genetics (Huntsville,Al,EUA) y por Bio-synthesis (Lewisville,Tx,EUA) respectivamente con un 80% de pureza. Este método de síntesis esta especialmente diseñado para generar niveles bajos de impurezas que pudieran inducir toxicidad en los cultivos celulares.

**I. EXPRESION DE VP6 Y SUS FRAGMENTOS**

La proteína VP6 de rotavirus YM completa 1-397aa y en forma de dos fragmentos sobrelapados correspondientes a las regiones de aminoácidos 1-192 y 171-397 fueron clonados en los vectores de expresión pGEX-2T y 4T (Pharmacia). Estos vectores dirigen la expresión de las proteínas fusionadas a Glutación S-Transferasa (GST). De esta manera se obtuvieron las proteínas de fusión GST-VP6, GST-VP6<sub>1-192</sub> y GST-VP6<sub>171-397</sub>.

## Materiales y Métodos

### 1. Clonación de los fragmentos de DNA que codifican para VP6 y los extremos amino y carboxilo terminal en PGEX

El gene 6 completo de YM clonado en pGEM-3Z (Promega) pGEM-YM6.5 fue usado como templado para obtener tanto VP6 como sus fragmentos que subsecuentemente se clonaron en el plásmido pGEX-4T ó 2T (Pharmacia).

Para esto, se generaron por PCR los sitios de restricción EcoRI y SmaI en los extremos del gene utilizando un par de oligonucleótidos que hibridan del nucleótido 22-38 en el extremo 5' (CCC GGG AAT TCA TAT GGA GGT TCT GTA CTC ) y del nucleótido 1338-1352 en el extremo 3' ( CAG ACC CGG GCC GCG GTC ACA TCC TCT CAC T ) respectivamente. Con esto se amplificó desde el ATG hasta el codón 397. Para su clonación, tanto el vector PGEX-4T como el producto del PCR fueron cortados con las endonucleasas correspondientes y ligados generándose (pGEX-YM6).

El fragmento VP6<sub>1-192</sub> se obtuvo amplificando y extendiendo por PCR con un par de oligonucleótidos que hibridan del ATG al nucleótido 38 (5'-CCC GGG AAT TCA TAT GGA GGT TCT GTA CTC -3') y en la región 563-579 ( 5' GG ATT AAT GCT GGA TCA TGA GAA TTC CCG GG -3'). Con esto se amplificó desde el ATG hasta el codón 193 generándose dos sitios de EcoRI en los extremos. Para su clonación, tanto el vector pGEX-2T y el producto del PCR fueron cortados con las endonucleasas correspondientes y ligados generándose (pGEX- YM6<sub>1-192</sub> )

El fragmento VP6<sub>171-397</sub> fue escindido del plásmido pGEM-YM6.5 por digestión con las endonucleasas SmaI y NaeI y subclonado en PGEX-2T (pGEX-YM6<sub>171-397</sub> )

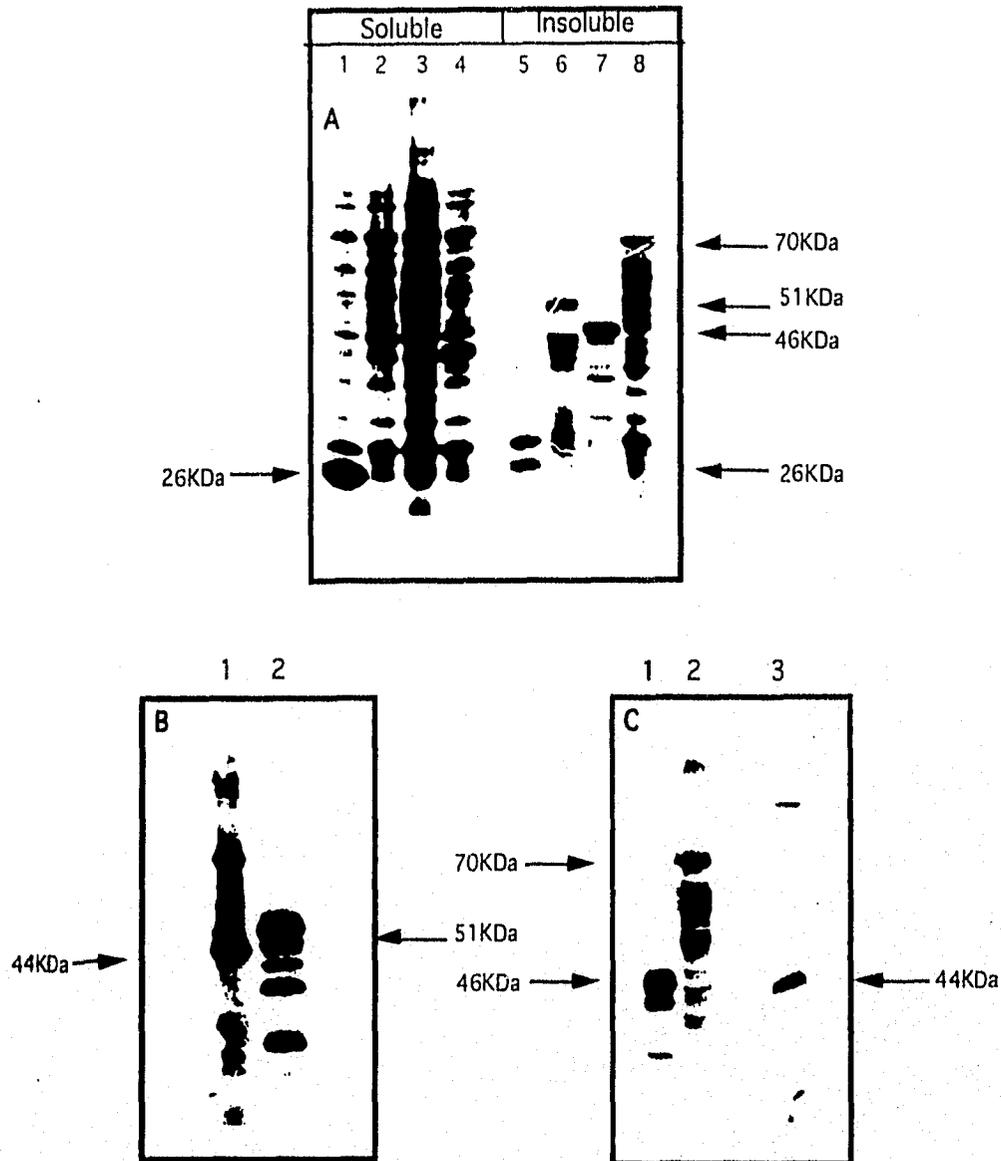
Una vez obtenidos los plásmidos recombinantes se realizó la transformación de la cepa de E.coli JM109. La selección de las colonias fue realizada en base a la resistencia de las colonias a ampicilina y expresando las proteínas de fusión como se describe a continuación.

### 2. Expresión y tratamiento de bacterias

Para la expresión de las proteínas de fusión, las cepas de E.coli JM109 transformadas se crecieron toda la noche a 37°C en medio luria líquido suplementado con 50 µg/ml de ampicilina. El día siguiente, se subcultivaron 1/100 en el mismo medio hasta alcanzar una O.D. de 0.3 a 600 nm y entonces se indujo la expresión de las proteínas de fusión con 1 mM IPTG por 3 horas. Posteriormente con la finalidad de purificar las proteínas de interés, se realizó la separación de la fracción soluble e insoluble de los cultivos inducidos. Con este fin,

## Materiales y Métodos

la suspensión bacteriana se lavó dos veces con buffer de lavado (50mM Tris, 1mM 2-ME) centrifugando a 1500g por 10 minutos cada vez. Después del último lavado, las células previo a su sonicación se resuspendieron en 2 ml del mismo buffer en presencia de los inhibidores de proteasas PMSF 1mM, leupeptina 1μM y Aprotinina 0.3μM. La sonicación consistió de 3 pulsos de 30" de 14-18 mm de amplitud, en un sonicador Soniprep 150 (SANYO MSE). Al finalizar este tratamiento se centrifugó y se obtuvieron las fracción soluble e insoluble de cada preparación. La cantidad aproximada, pureza y solubilidad de las proteínas deseadas fue evaluada al correr las muestras en un gel de poliacrilamida, el cual fue teñido con coomasie. En la figura 1A se muestra la electroforesis de la fracción insoluble del sonicado de las bacterias sonicadas teñidas con coomasie indicando con flechas la expresión de las proteínas de fusión, GST y VP6 de rotavirus YM semi-purificado. En las figuras 1B y 1C se muestra la expresión de las mismas reveladas con los anticuerpos policlonales de conejo anti-VP6<sub>242-397</sub> y anti-YM respectivamente.



**figura 1: Expresión de las proteínas de fusión**

(A) Expresión de las proteínas de fusión GST-VP6, GST-VP6<sub>1-192</sub> y GST-VP6<sub>171-397</sub>. Cantidades equivalentes de las fracciones bacterianas y virus semi-purificado YM se mezclaron con el buffer de carga y sujetos a PAGE-SDS (gel al 11%) y se tificaron con coomasie. Los carriles 1 y 5 corresponden a GST (26 kDa), 2 y 6 a GST-VP6<sub>171-397</sub> (51 kDa), 3 y 7 GST-VP6<sub>1-192</sub> (46 kDa) y 4 y 8 a GST-VP6 (70 kDa). En (B) y (C) se muestran los western blots correspondientes a la fracción insoluble revelado con los anticuerpos policlonales de conejo preparado contra el fragmento VP6<sub>242-397</sub> y contra rotavirus YM purificado respectivamente. En (B)

## Materiales y Métodos

el carril 1 corresponde a YM semi-purificado y el carril 2 a GST-VP6<sub>171-397</sub>. En (C) el carril 1 corresponde a GST-VP6<sub>1-192</sub>, el carril 2 a GST-VP6 y el carril 3 a YM semi-purificado.

### 3. Preparación de los extractos proteicos para cultivo *in vitro*

Para los cultivos, la cantidad de proteína de la fracción insoluble de las preparaciones antes mencionadas fueron determinadas por Lowry (Bio-Rad); además los extractos proteicos fueron irradiados con luz u.v. de manera similar a la descrita para las preparaciones virales.

### J. FUENTES DE INTERLEUCINAS

a) Sobrenadantes condicionados por las células XGL310 mL-2. Para su obtención las células XGL310 mL-2 fueron cultivadas a saturación y el sobrenadante de la suspensión cosechado por centrifugación a 1150 g y filtrado a través de una membrana de 0.22  $\mu$ m. b) IL-2 recombinante comercial de ratón (Boheringer 10,000 U/ml)

### K. ESTIMULACION DE LAS CELULAS Th AISLADAS DE BAZO

Para examinar la respuesta de las células Th a nivel policlonal, el bazo de ratones BALB/c inmunizados i.p. con rotavirus se aisló a los 15 días de la última inmunización. Este se homogeneizó por presión sobre una rejilla metálica y de la suspensión celular resultante se sembraron  $4 \times 10^5$  células/pozo en placas de 96 de fondo plano (Costar) junto con diferentes antígenos a las concentraciones indicadas. Estos cultivos se incubaron a 37°C por 48 horas en un volumen final por pozo de 200  $\mu$ l. Al finalizar la incubación los sobrenadantes se recolectaron y congelaron a -20°C para lisar cualquier célula viva y entonces se evaluó su contenido de IL's en la línea indicadora CTLL-2 dependiente para proliferar de IL-2, IL-4 e IL-15<sup>52,53</sup>. El medio de cultivo utilizado fue RPMI<sup>+</sup> suplementado con  $5 \times 10^{-5}$  M de 2-ME, 100 U/ml de penicilina, 100  $\mu$ g/ml estreptomycin, 2 mM de glutamina y 10 mM de Hepes al 0.5% de suero de ratón previamente inactivado a 56°C ó bien con 7% de suero bovino fetal CPRS-2 (Sigma).

### L. GENERACION DE HIBRIDOMAS DE CELULAS Th

Para la obtención de hibridomas de células Th, las células de bazo de ratones BALB/c inmunizados i.p. con rotavirus YM purificado se disgregaron como ya se ha descrito y la suspensión celular resultante se estimuló de la siguiente manera: El día 0 se resuspendieron a una densidad de  $2 \times 10^6$  células /ml con RPMI<sup>+</sup> en frascos T de 25 cm<sup>2</sup> (Costar) y se

## Materiales y Métodos

estimularon con  $1\mu\text{g/ml}$  de rotavirus YM carente de sus proteínas externas (VP4 y VP7). Siete días después las células se llevaron a una densidad de  $2 \times 10^5$  células/ml con  $3\mu\text{g/ml}$  de SA11 4fm sin capa externa y células de bazo tratadas con mitomicina C como fuente de CPA's ( $2 \times 10^6$  /ml ). La estimulación se repitió a los 7 días con  $1\mu\text{g/ml}$  de SA11 semi-purificado. Cuatro días después de la última estimulación, los blastos se cosecharon, se lavaron con RPMI<sup>+</sup> y se fusionaron con la línea celular BW5147 (TCR<sup>-</sup>, HPRT<sup>-</sup>) en una proporción 5:1. Para esto, se adicionaron 0.8 ml de polietilenglicol al 50% (Boehringer Mannheim Biochemicals) durante 1 minuto y en seguida RPMI<sup>+</sup> por lapsos de 2 y 3 minutos. La suspensión celular se llevó finalmente a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml en RPMI<sup>+</sup> suplementado con HAT (Hipoxantina 5 mM, Aminopterina 0.02 mM y 0.8 mM Timidina), sembrando 100  $\mu\text{l}$  de la misma en placas de 96 de fondo plano. Para la selección de hibridomas se usa HAT como medio de selección ya que permite inhibir la síntesis de novo de nucleótidos (aminopterina) y forza a las células a sintetizar nucleótidos por la vía de salvamento (usando Hipoxantina y Timidina como sustratos). Esto da como resultado la muerte de todas aquellas células no fusionadas ya sea que sea poseedoras de una mutación en la enzima HPRT esencial en la vía de salvamento ó que sean incapaces de crecer por periodos prolongados en ausencia de antígeno tales como cualquier célula no tumoral.

De 3 a 6 días después se reemplazaron 100  $\mu\text{l}$  de medio por 100  $\mu\text{l}$  de medio RPMI<sup>+</sup> HAT 2x. Para el primer ensayo de especificidad, de los pozos confluentes se tomaron 250  $\mu\text{l}$  de la suspensión celular y se transfirieron a 1ml de medio fresco suplementado con HT.

El pozo padre se usó para determinar la especificidad de los hibridomas de la siguiente manera: Las células A.20.J ( $5 \times 10^6$ /ml ) se incubaron con  $25\mu\text{g/ml}$  de YM semi-purificado a  $37^\circ\text{C}$  por 4 horas. Posteriormente, se llevaron a una densidad de  $2.6 \times 10^6$  células/ml y se adicionaron 100  $\mu\text{l}$  de esta suspensión celular a los pozos padre. A las 24 horas los sobrenadantes se colectaron y el contenido de IL's se evaluó en las células CTLL-2.

### **M. TRATAMIENTO DE LAS CELULAS DE BAZO CON MITOMICINA C**

Con la finalidad de bloquear la división celular de las células de bazo de ratones BALB/c normales a utilizar como células presentadoras de antígeno (CPA's) se utilizó como agente entrecruzador del DNA a la mitomicina C. Para esto, las células de bazo se llevaron a una densidad de  $2 \times 10^7$  células/ml, se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  por 20 minutos en presencia de  $25\mu\text{g/ml}$

## Materiales y Métodos

de mitomicina C (sigma). Posteriormente las células se lavaron varias veces y se adicionaron  $2 \times 10^6$  células/ml a los cultivos totales mencionados.

### N. ESTIMULACION DE HIBRIDOMAS

Los hibridomas fueron cultivados en placas de 96 de fondo plano (Costar) a una densidad de  $5 \times 10^4$  células/pozo con antígeno y  $1 \times 10^5$  células/pozo de células A.20.J en RPMI como CPA en un volumen final de cultivo de 200  $\mu$ l. A las 48 horas los sobrenadantes fueron recolectados para evaluar su contenido de IL's en la línea celular CTLL-2.

### O. EVALUACION DE INTERLEUCINAS DE LOS SOBRENADANTES DE CULTIVO

Para evaluar el contenido de interleucinas de los sobrenadantes de los cultivos de células de bazo e hibridomas de células Th estimuladas con antígeno se usó la línea celular CTLL-2 dependiente para proliferar de IL-2, IL4 e IL15. Para esto, las CTLL-2 semi-confluentes se lavaron 3 veces con RPMI y antes del último lavado se incubaron 2 horas a 37°C removiendo completamente la IL-2 presente en el cultivo. Después del último lavado las células se resuspendieron a la concentración adecuada en RPMI con 2% de suero bovino fetal CPRS-2 (Sigma). De esta manera, se sembraron 50  $\mu$ l de la suspensión celular en placas de 96 de fondo redondo (Nunc, Inter Med, Dinamarca) junto con 50  $\mu$ l de los sobrenadantes de cultivo previamente congelados y descongelados una vez para lisar cualquier célula viva. Para evaluar la proliferación de las células CTLL-2 se utilizaron los siguientes métodos: a) La incorporación de [<sup>3</sup>H]-Tdr en el DNA de las células en la etapa de síntesis y b) El método colorimétrico MTT, que mide el producto insoluble formazán, derivado de la oxidación del MTT en las mitocondrias de las células vivas.

#### 1. Incorporación de [<sup>3</sup>H]-Tdr

Para el cultivo  $1 \times 10^4$  células CTLL-2 se incubaron 22 horas con los sobrenadantes de cultivo y 4 horas más con 0.5  $\mu$ Ci de [<sup>3</sup>H]-Tdr. Al término de ésta última las células se cosecharon sobre un papel filtro utilizando un cosechador de células automático Skatron (INC). La incorporación de [<sup>3</sup>H]-Tdr en las células fue medida posteriormente en un contador  $\beta$  de centelleo líquido. Los resultados son expresados en cpm (cuentas por minuto) e índices de estimulación (I.E.). Este último representa el cociente de la incorporación de [<sup>3</sup>H]-Tdr por las células CTLL-2 que proliferan en respuesta a las interleucinas liberadas al estimular las

## Materiales y Métodos

células de bazo ó hibridomas Th con antígeno entre la estimulación de las células en respuesta a las interleucinas liberadas por las células de bazo e hibridomas Th con medio sin antígeno.

### 2. MTT

Alternativamente,  $2 \times 10^4$  células se adicionaron a los sobrenadantes y se pulsó el cultivo a las 24 horas con 20  $\mu$ l de MTT (5mg/ml) por 4 horas generandose una pastilla insoluble de azul de formazán. Para lograr su disolución se adicionaron 100  $\mu$ l de una solución de SDS al 10% en 0.01N HCl y se incubó toda la noche. El producto coloreado entonces, se leyó a 570 nm en un lector de placa de elisa ( Bio-Tek instruments). El sobrenadantes de IL-2 procedentes de las células XGL310 mL-2 se usó como control positivo en ambos ensayos.

## P. ENSAYOS DE RESTRICCIÓN POR EL MHC CLASE II

### 1. Presentación de antígeno por células L transfectadas

Los hibridomas Th se cultivaron en RPMI<sup>+</sup> sembrando  $5 \times 10^4$  células/pozo en presencia de antígeno y fibroblastos L ( $3 \times 10^4$  células/ml ) transfectados con las moléculas del MHC IA<sup>d</sup> ó IE<sup>d</sup> ó con las células A.20.J como CPA's en un volúmen final de cultivo de 200  $\mu$ l. A las 48 horas los sobrenadantes se cosecharon y se determinó su contenido de Interleucinas en la línea celular CTLL-2.

### 2. Bloqueo de las moléculas del MHC clase II con anticuerpos monoclonales.

Para los ensayos de bloqueo por anticuerpos, se sembraron hibridomas Th ( $5 \times 10^4$  /pozo) en presencia de las células A.20.J ( $1 \times 10^5$  /pozo), 5  $\mu$ g/ml de rotavirus YM semi - purificado y 10  $\mu$ g/ml de los anticuerpos monoclonales de ratón K22.203.7 (anti-IA<sup>d</sup> ) y K22.42.2 (anti-IE<sup>d</sup>). A las 48 horas los sobrenadantes se recolectaron de los pozos y se examinaron en la línea celular CTLL-2. Los hibridomas productores de los anticuerpos utilizados son del mismo isotipo ( IgG<sub>a</sub>) y han sido usados previamente para bloquear el reconocimiento de antígeno por células T<sup>58,59</sup>, donados por el Dr. Vianney Ortiz.

## V. RESULTADOS

### A. RESPUESTA ANTI-VIRAL DE CELULAS Th A NIVEL POLICLONAL

Como modelo experimental para la evaluación de la respuesta policlonal de células Th en contra de rotavirus, ratones adultos de la cepa singénica BALB/c (H-2<sup>d</sup>) se inmunizaron intraperitonealmente (i.p) con rotavirus heterólogos activado con tripsina. Esto fue realizado basándonos en estudios previos en donde, a pesar de que por esta vía solo un ciclo de replicación se lleva a cabo, una clara inmunidad activa puede ser inducida<sup>60</sup>. Por esta razón, este modelo fue implementado como una alternativa a la utilización de ratones neonatos (4-15 días) y al uso rotavirus murinos dados los problemas metodológicos que su uso implica, ya que hay que tener excesiva precaución en la manipulación para evitar que toda la colonia de ratones se infecte y que los ratones sean bien inoculados. Así para evaluar la activación de las células Th, las células totales de bazo de estos ratones sin procesamiento alguno, se cultivaron en presencia del virus y sus proteínas. En estos cultivos, las preparaciones antigénicas que se utilizaron fueron: lisados virales, virus semi-purificado, así como las proteínas de fusión GST-VP6<sub>1-192aa</sub> y GST-VP6<sub>171-397aa</sub>.

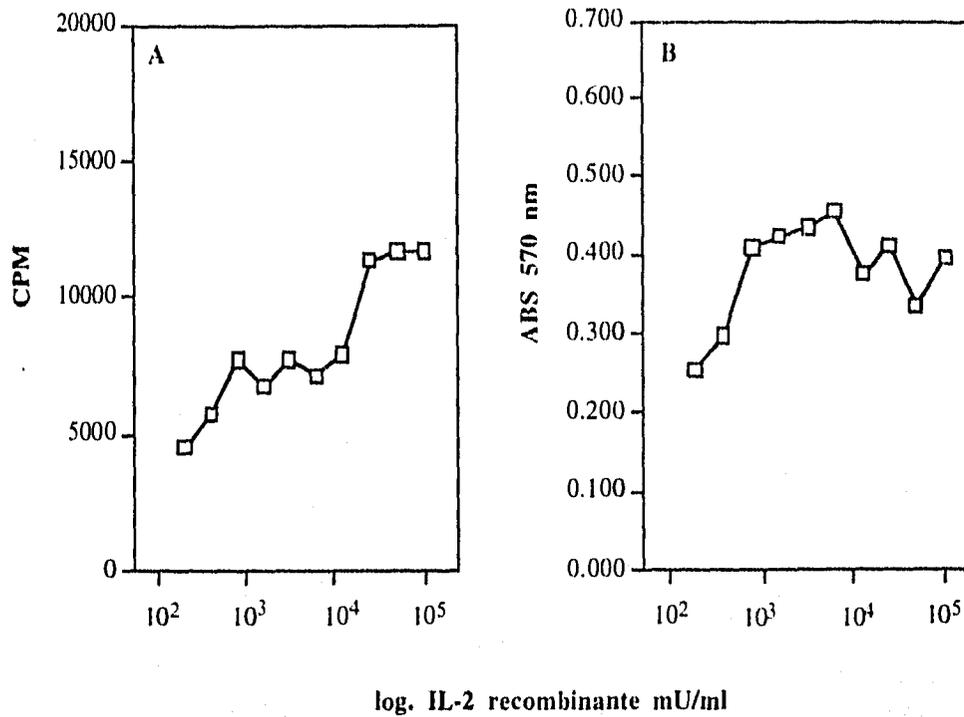
La estimulación de las células Th fue evaluada midiendo la presencia de interleucinas en el sobrenadantes. Para esto, se implemento un bioensayo previamente usado en otros sistemas virales. En estos, se mide el contenido de interleucinas de los sobrenadantes de cultivo por medio de la proliferación de las células CTLL-2 dependientes de IL-2, IL-4 e IL15<sup>52,53</sup>. Esto da una medida muy confiable de la estimulación de las células Th, ya que se ha demostrado que más del 95% de las IL's detectadas por las CTLL-2 en este ensayo son secretadas por las células T CD4<sup>+</sup><sup>61</sup>. Dado que IL-2 es secretada predominantemente por la subpoblación Th1 e IL-4 por las Th2, la utilización de este sistema permite valorar la activación de ambas subpoblaciones de células Th. En este trabajo no se discriminó específicamente la ó las poblaciones de células Th activadas en respuesta a antígeno dado que el trabajo se enfoco a la determinación de la especificidad del reconocimiento de antígeno de las células Th.

## Resultados

### 1. Estandarización del sistema de detección de interleucinas

En el establecimiento de este bioensayo, se compararon los siguientes métodos para la evaluación de la proliferación celular de la línea indicadora CTLL-2: a) La incorporación de [<sup>3</sup>H]-Tdr y b) El método colorimétrico MTT. Para esto, se realizaron curvas dosis respuesta con IL-2 recombinante. En la Figuras 2A y 2B se puede ver que la sensibilidad de los dos métodos probados es similar<sup>62</sup>. Al 50% de la respuesta máxima la concentración de IL-2 detectada en el caso de [<sup>3</sup>H]-Tdr fue de 501mU/ml y en el caso de MTT de 631mU/ml. Por ello, ambos se emplearon en la evaluación de la proliferación de las CTLL-2 mediada por el contenido de interleucinas presentes en los sobrenadantes de los cultivos.

## Resultados



**Figura 2: Evaluación de la proliferación de las células CTLL -2 usando [<sup>3</sup>H]-Tdr y MTT**

Proliferación celular de la línea celular CTLL-2 mediada por la estimulación con varias concentraciones de IL-2 recombinante (200-190U/ml). Las células fueron cultivadas 22 y 24 horas utilizando como métodos de detección A) [<sup>3</sup>H]-Tdr y B) MTT respectivamente (ver métodos). Las lecturas obtenidas ante la estimulación con medio fueron para [<sup>3</sup>H]-Tdr =800cpm y para MTT =0.106. En la figura C) se compara la respuesta entre ante ambos métodos.

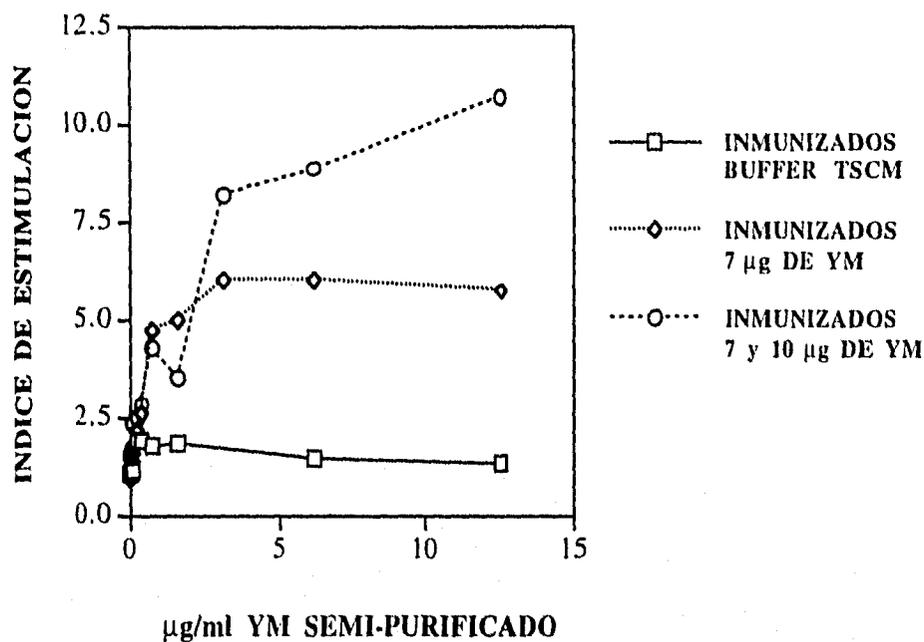
Por esta razón el métodos de [<sup>3</sup>H]-Tdr se uso preferencialmente cuando se requería determinar concentraciones de IL's muy similares entre sí en forma precisa como en el caso de una respuesta policlonal. Es importante mencionar que el método del MTT resulto ser más rápido y fácil de realizar, por lo que fue usado en los ensayos de hibridomas en los cuales la respuesta ante la estimulación antigénica era considerablemente diferente a la obtenida con el control. Así mismo, esta técnica permitió manejar de un gran número de muestras.

## Resultados

### 2. Dosis óptima de antígeno necesario para la inducción de células Th anti-rotavirus

Con la finalidad de emprender la caracterización de la respuesta de las células Th ante rotavirus; se inmunizaron ratones BALB/c con rotavirus y se realizaron cultivos totales de células de bazo en presencia de antígeno. Inicialmente se estandarizó el número de células de bazo necesarias para lograr una respuesta óptima de células Th *in vitro* en estos cultivos, encontrando que  $4 \times 10^5$  células/ pozo era la concentración adecuada (dato no mostrado). En función de esto, la respuesta de las células Th contra rotavirus se evaluó por medio de la inmunización intraperitoneal de ratones con diferentes dosis de virus purificado para de esta manera: a) evitar la introducción de proteínas no virales que pudieran interferir en la respuesta sobre todo a altas concentraciones y b) trabajar a nivel de masa, en  $\mu\text{g}$  de proteínas virales, lo cual es difícil de hacer con lisados. Así para evaluar la respuesta de las células Th de memoria procedentes de estos ratones, las células de bazo se estimularon *in vitro* con diferentes concentraciones de rotavirus YM semi-purificado (12-0.024  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) e irradiado con luz ultravioleta (uv). Como control se utilizaron ratones inmunizados con buffer. Como se puede apreciar en la (Figura 3), YM purificado fue capaz de inducir una respuesta policlonal de células Th. A la concentración de 3.125  $\mu\text{g}/\text{ml}$  se alcanzó una respuesta óptima en los ratones que se inmunizaron una vez. En los ratones de inmunización doble, el punto máximo no pudo determinarse con el rango de concentración probado, sin embargo, la estimulación fue mejor en casi todo lo largo de la curva. Las células de bazo provenientes de ratones inoculados con buffer dieron valores de fondo a lo largo de las concentraciones de virus usados. Estos resultados muestran que rotavirus purificado puede inducir una respuesta dosis dependiente de las células Th de memoria cuando se inocula por vía parenteral y sugieren que la inmunización con rotavirus purificado potencialmente sensibiliza células Th contra alguna de las proteínas estructurales (VP1,VP2,VP3,VP4,VP6 y VP7).

## Resultados



**Figura 3: Respuesta policlonal de las células Th específicas contra rotavirus**

Respuesta de células Th contra rotavirus evaluada por medio de la liberación de interleucinas. Las células de bazo de ratones BALB/c inmunizados i.p. con (■) Buffer, (◊) una vez con 7 µg of purified YM ó (○) dos veces con 7 y 10 µg de rotavirus YM purificado se cultivaron en presencia de distintas concentraciones de rotavirus YM semi-purificado. A las 48 horas de cultivo los sobrenadantes se colectaron y el contenido de interleucinas se evaluó midiendo la proliferación de las CTL-2 por medio de la incorporación de [<sup>3</sup>H]-Tdr. Los resultados son presentados como índices de estimulación. La respuesta de los controles con medio fueron: (■) =180 cpm (◊) =287 cpm and (○) =320 cpm.

### 3. Respuesta heterotípica

Por estudios recientes se sabe que las células Th anti-VP6 de la cepa UK(G6:bovina) pueden activarse con la cepa de rotavirus Ch2(G7:aviar)<sup>49</sup>. Por tanto, dada la naturaleza heterotípica de esta respuesta, se quiso determinar si algo similar podría ocurrir entre otras cepas de rotavirus. Para esto se cultivaron células de bazo de ratones inoculados i.p. con buffer ó con rotavirus YM (G11:porcina) semi-purificado en presencia de lisados de células MA104 y lisados de células infectadas con rotavirus SALL (G3:simio) tratados con calor (ver materiales

## Resultados

y metodos). Como se puede apreciar en la Tabla 2, las células Th específicas para YM (G11) pudieron ser activadas con rotavirus SA11 (G3). Esto corroboró la capacidad que tienen las células Th específicas de rotavirus de responder de manera heterotípica. Además, podemos mencionar que también se encontró una respuesta heterotípica de células Th provenientes de ganglio cuando el virus fue inoculado en presencia de CFA encontrando que células Th sensibilizadas con YM reconocieron las cepas de rotavirus SA11 y Uk (resultado no mostrado).

**Tabla 2: Respuesta de las células Th vs. YM y SA11**

GRUPO	CPM (I.E.)	
	BALB/c control	BALB/c 1P 25 µgYM
MEDIO	129 (1.0)	789 (1.0)
CON-A	5060 (39)	4870 (6.2)
MA104	114 (0.8)	2220 (2.8)
SA11	129 (1.0)	3766 (4.8)

Respuesta de células Th contra rotavirus evaluada por medio de la liberación de interleucinas. Las células de bazo de ratones BALB/c inmunizados i.p. con 25 µg/ml de rotavirus YM semi-purificado se estimularon con lisados de rotavirus SA11 y células MA104 tratados con calor así como con 2.5 µg/ml de Con-A. A las 48 horas de cultivo los sobrenadantes se colectaron y el contenido de interleucinas se midió evaluando la proliferación de las CTLL-2 por medio de la incorporación de [<sup>3</sup>H]-Tdr.

#### 4. Respuesta de células Th hacia VP6 de YM

Dados los resultados anteriores, se inicio la caracterización de la respuesta de las células Th hacia las diferentes proteínas del virión. Se eligió VP6 como modelo para montar las condiciones experimentales dado que: Esta proteína se encuentra en una proporción muy alta en el virión (alrededor de un 50% del peso total del mismo). Además, se ha demostrado que es un blanco del reconocimiento de una línea de células Th heterotípicas procedentes de ratones BALB/c lo cual sugería la existencia de epítopes Th altamente conservados. En función de esto, para empezar a disectar los sitios antigénicos localizados en VP6, se construyeron y expresaron las proteínas de fusión GST-VP6<sub>1-192</sub> y GST-VP6<sub>171-397</sub> (Figura 4) que comprenden las regiones de aminoácidos 1-192 y del 171-397 de VP6 fusionados a la proteína Glutation-S transferasa GST respectivamente.

## Resultados



**Figura 4: Diagrama de los fragmentos de VP6 fusionados a GST**

Estos comprenden las regiones de aminoácidos del 1 al 192 y del 171 al 397. La región sombreada muestra la zona sobrelapada entre los dos fragmentos.

Para evaluar la especificidad de la respuesta ante los dos fragmentos de VP6, se analizó la respuesta de las células Th en cultivos de células de bazo de ratones inmunizados dos veces con rotavirus YM purificado. Como control se usaron células de bazo de ratones inoculados i.p. con buffer. En estos cultivos las proteínas utilizadas como antígeno fueron las proteínas totales presentes en la fracción insoluble de lisados bacterianos que expresaban GST solo ó fusionado a los fragmentos VP6<sub>1-192</sub> y VP6<sub>171-397</sub>. Con la finalidad de que no se perdiera ningún epítipo de células Th, los fragmentos se construyeron sobrelapados por 21 aminoácidos. La proporción de estas proteínas respecto a la fracción total de proteínas presentes en los lisados fue de un 50, 70 y 80% respectivamente. Estos valores se obtuvieron por análisis visual de las preparaciones en geles de poliacrilamida teñidos con coomasie (Figura 1, ver materiales y métodos). En la Tabla 3 se muestran solamente las respuestas más altas de las células Th en los cultivos de células de bazo en un rango de estimulación antigénica de 3.75 a 15.0 µg/ml.

Resultados

**Tabla 3: Respuesta policlonal de células Th hacia VP6**

GRUPO	CPM ( I.E.)	
	BALB/c IP TSCM	BALB/c IP YM
MEDIO	237	322
YM SEMI-PURIF.	208 (0.9)	8252 (25 )
GST	236 (1.0)	534 (1.6)
GST-VP6 1-192	249 (1.0)	1265 (3.9)
GST-VP6 171-397	241 ( 1.0)	1784 (5.5)
CON-A	26380 (111)	24746 (77 )

Secreción de interleucinas por células de bazo estimuladas con VP6. Los sobrenadantes de cultivo se recolectaron a las 48 horas y examinaron en cuanto a su contenido de interleucinas midiendo la proliferación de la línea celular CTLL-2 por incorporación de <sup>3</sup>H-Tdr. Como antígeno, se usaron rotavirus semi-purificado 10 µg/ml de YM, así como 7.5 µg/ml de GST, 7.5 µg/ml de GST- VP6<sub>1-192</sub> , 3.5 µg/ml GST-VP6<sub>171-397</sub> y como control 2.5 µg/ml de Con-A.

Ante la estimulación de las células de bazo con GST-VP6<sub>1-192</sub> y GST-VP6<sub>171-397</sub>, encontramos que ambas fracciones de VP6 inducían una respuesta específica de células Th, siendo esta mejor ante el extremo 171-397 de VP6. Las células de bazo del ratón control no respondieron, lo cual valida el uso de las proteínas de fusión sin mayor purificación que el fraccionamiento de proteínas solubles e insolubles. Este resultado sugiere que la región 171-397 de VP6 es más antigénica. Sin embargo, en base a estos experimentos no podemos afirmarlo ya que la región 1-192 pudiera estar siendo procesada de manera ineficiente.

### B. RESPUESTA CLONAL DE CELULAS Th

Para la localización de epítopes, usualmente se emplean clonas de células T. Estas clonas pueden ser generadas por dos métodos: a) reestimulación continua *in vitro* con antígeno ó b) generando hibridomas de células T. A pesar de que ambas son igualmente útiles para el estudio de la especificidad *in vitro*<sup>63,64</sup>, se decidió producir hibridomas de células T por las ventajas que estos involucran. Entre estas, la inmortalización de células capaces de crecer en ausencia antígeno y conservar su habilidad de responder específicamente ante éste. Así células Th de bazo específicas para rotavirus fueron fusionadas con la línea celular Bw 5147 que es un linfoma de células T de ratón sensibles a HAT y en los cuales no se encuentra RNA mensajero para alguna de las cadenas del TCR<sup>65</sup>. En los hibridomas así generados, la selección de las líneas Th fue realizada midiendo las IL's secretadas por estos en presencia de antígeno y las células A.20.J como CPA's. De esta manera, de las líneas Th obtenidas algunas fueron clonadas por dilución limitante de tal manera que la caracterización clonal pudo ser realizada en poblaciones homogéneas y estables en cultivo.

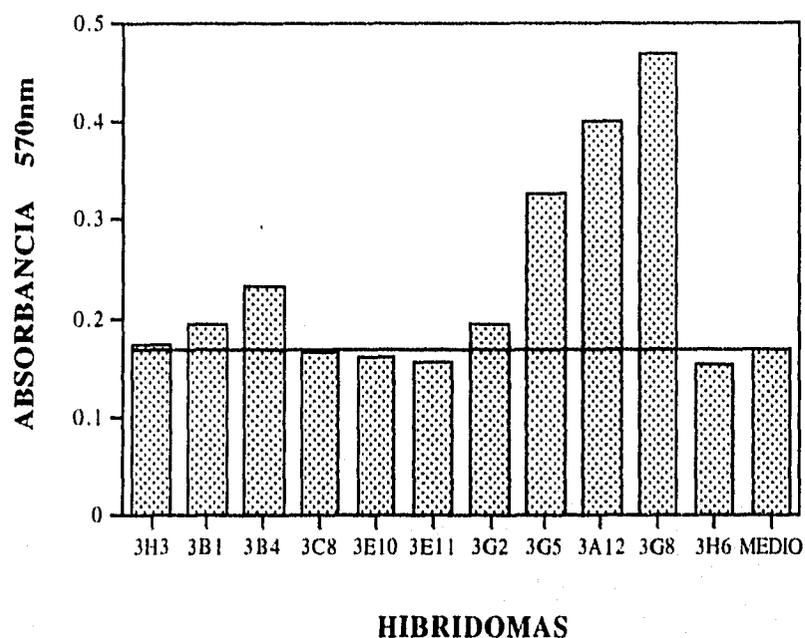
Inicialmente la especificidad de algunas de las clonas se determinó ante la estimulación con diferentes cepas de rotavirus y las proteínas de fusión GST-VP6, GST-VP6<sub>1-192</sub> y GST-VP6<sub>171-397</sub>. Posteriormente, se utilizó una batería de péptidos sintéticos como en otros sistemas virales<sup>66,67</sup>. Estos fueron sintetizados en base a la secuencia de VP6 de YM<sup>57</sup> con 14 aminoácidos de longitud yuxtapuestos por ocho aminoácidos y se determinó su restricción por el MHC clase II (IA e IE)<sup>d</sup>. Esto fue realizado empleando como CPA's fibroblastos de ratón transfectados ya sea con la molécula IA<sup>d</sup> o IE<sup>d</sup> ó bien mediante el bloqueo de la presentación de antígeno de la línea celular A.20.J (IAIE)<sup>d</sup> con anticuerpos dirigidos anti-IA<sup>d</sup> ó anti-E<sup>d</sup><sup>58,59</sup>.

## Resultados

### 1. Generación de hibridomas de células Th anti-rotavirus

En la generación de hibridomas, la especificidad preferencialmente se trató de dirigir hacia las proteínas más conservadas. Para esto, las células de bazo de ratones BALB/c inmunizados i.p. dos veces con rotavirus YM purificado (7 y 10  $\mu\text{g}$ ) se estimularon *in vitro* primero con 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de rotavirus YM, después con 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de rotavirus SA11 sin capa externa y finalmente con rotavirus SA11 semi-purificado. Se hicieron 3 fusiones siguiendo el mismo protocolo de inmunización, sólo en una de ellas se generaron hibridomas. Los hibridomas tardaron en crecer de 7 a 21 días después de haber sido sembrados en placas de 96 pozos. Estos se expandieron en pozos de 24 hasta llegar casi a confluencia y entonces se realizó la selección de las líneas de hibridomas Th específicas hacia rotavirus. Para esto, los hibridomas fueron estimulados con YM en presencia de  $1 \times 10^5$  células A.20.J como CPA's. En la Figura 5 se muestra la proliferación celular de las CTLL-2 en presencia de los sobrenadantes de cultivo de 11 hibridomas evaluados. Las líneas consideradas como positivas fueron la 3G5, 3A12 y 3G8. Estas líneas mostraron una estimulación superior a la del control en un 50%.

## Resultados



**Figura 5: Selección de hibridomas de células Th específicas para rotavirus**

Secreción de interleucinas por hibridomas de células T, mediada por la estimulación de las células A20 con 2.5 µg/ml. de YM semi-purificado. A las 48 horas de cultivo los sobrenadantes se colectaron y el contenido de interleucinas se midió evaluando la proliferación de las CTLL-2 por MTT. Los hibridomas cuya respuesta rebasó la línea marcada fueron considerados como positivos.

### 2. Clonación limitante de las líneas 3G5 y 3A12

Para poder llevar a cabo la caracterización fina de los epítopes Th. Los hibridomas se clonaron por dilución limitante evitando de esta manera la pérdida de especificidad y estabilizando las poblaciones. La clonación por dilución limitante consiste en sembrar las células a muy baja densidad en lo que se espera que quede una célula por pozo. Esto fue realizado basándonos en el método descrito por J. E. Coligan<sup>68</sup>. Este consiste en sembrar hipotéticamente de 0.3 a 0.5 células por pozo con lo cual podríamos tener una eficiencia de plaqueo alrededor de un 22% en toda la placa. La efectividad del método asegura la obtención de clones en un 88% de los casos. La línea 3G8 se perdió por lo que sólo se clonaron 3G5 y 3A12.

## Resultados

### a) Clonas de 3G5 generadas

En la Figura 6 se muestran las clonas generadas procedentes de la clonación de la línea 3G5. En esta ocasión se sembró sólo una placa de 96 pozos, de la cual se obtuvo un 23% de crecimiento con respecto al total de pozos sembrados 22/96.

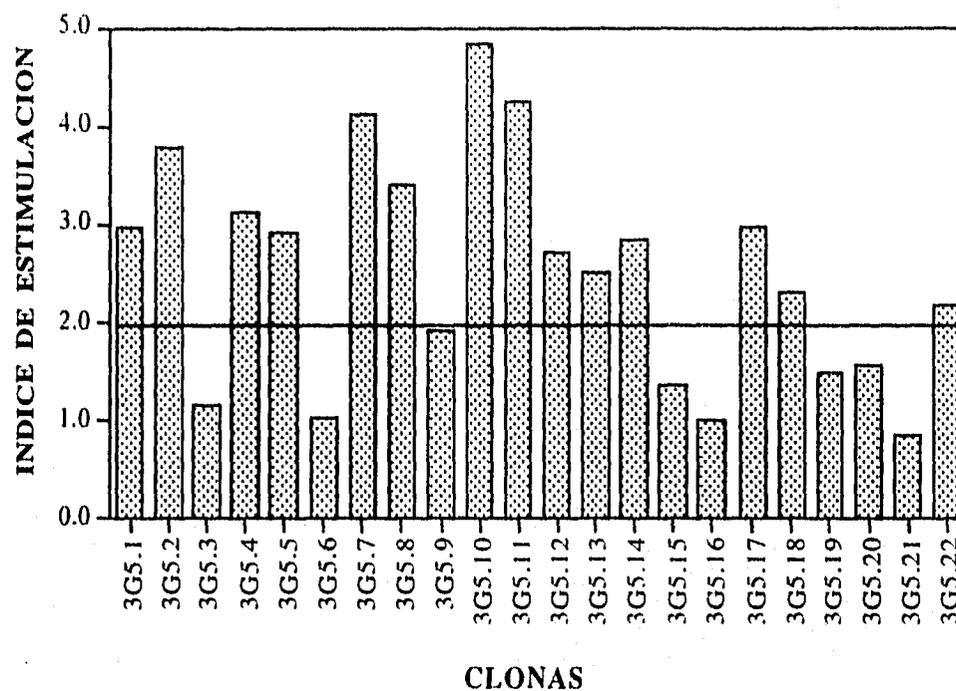
Para probar rápidamente la especificidad de las clonas generadas, el contenido de interleucinas de los sobrenadantes del cultivo de estas en presencia de rotavirus YM y células A20.J como CPA's se evaluó por MTT. Se consideraron como positivas a todas aquellas cuya respuesta ante el virus se encontraron arriba ó igual a 2. En base a este análisis el 63% de las clonas fueron tomadas como positivas.

### b) Clonas de 3A12 generadas

En las Figura 7A y B se muestran las clonas generadas procedentes de la clonación de la línea 3A12. En esta ocasión de dos placas de 96 se obtuvo un crecimiento de un 22% respecto al total de pozos sembrados 42/192, lo cual por estadística podemos decir que constituyen clonas dentro de los márgenes de confianza ya descritos.

Para la selección de las clonas Th específicas de rotavirus se llevo a cabo el mismo procedimiento que para 3G5. Como se puede apreciar en base al criterio descrito en el inciso anterior un 19% de las clonas generadas fueron consideradas como positivas hacia rotavirus.

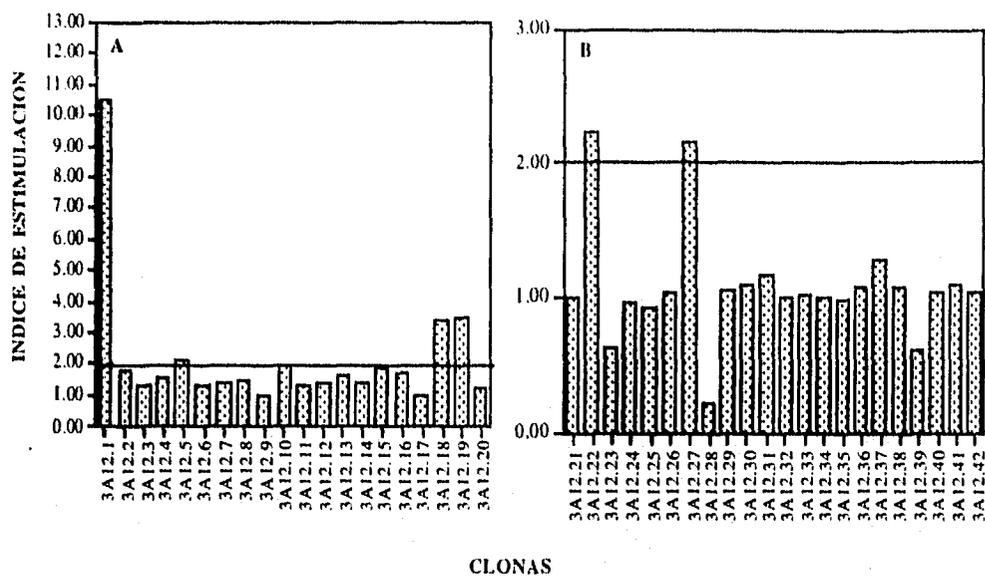
## Resultados



**figura 6 Clonas 3G5 generadas**

Secreción de interleucinas por las clonas 3G5 mediada por la estimulación de las células A20.J con 5  $\mu\text{g./ml.}$  de YM semi-purificados. A las 48 horas de cultivo los sobrenadantes se colectaron y el contenido de interleucinas se midió evaluando la proliferación de las CTLL-2 por MTT. Los híbrdomas cuya respuesta rebasó la línea marcada fueron considerados como positivos.

## Resultados



**figura 7 Clonas de 3A12 generadas**

(A) y (B) Secreción de interleucinas por las clonas 3A12, mediada por la estimulación de las células A20.J con 5  $\mu$ g./ml. de una mezcla de virus semi-purificados compuesta de YM y SA11. A las 48 horas de cultivo los sobrenadantes se colectaron y el contenido de interleucinas se midió evaluando la proliferación de las CTLL-2 por MTT. Los hibridomas cuya respuesta rebasó la línea marcada fueron considerados como positivos.

## Resultados

### 3. Especificidad de las clonas procedentes de 3G5

Se analizó la especificidad de las clonas procedentes de la línea 3G5, la caracterización de las clonas derivadas de la línea 3A12 no se realizó en este trabajo. Inicialmente se determinó la respuesta de las clonas hacia YM como SA11. Se seleccionaron 4 de las clonas derivadas de la línea 3G5 más estables en cultivo y se evaluó su capacidad de respuesta al ser retadas con las cepas de rotavirus YM y SA11. Como se puede apreciar en la Tabla 4 ambas cepas virales fueron capaces de estimular a las clonas seleccionadas.

**Tabla 4: Respuesta de clonas de 3G5 vs. YM y SA11**

CTLL-2 x MTT Abs. 570 nm (I.E.)			
CLONAS	MEDIO	YM	SA11
3G5.1	0.020	0.244 (4.4)	0.317 (6.0)
3G5.7	0.028	0.278 (5.0)	0.406 (7.4)
3G5.8	0.018	0.214 (5.0)	0.235 (5.5)
3G5.10	0.019	0.277 (4.9)	0.342 (6.0)

Secreción de interleucinas de las clonas 3G5, mediada por la estimulación de las células A20.J con 5µg/ml. de rotavirus YM ó SA11. A las 48 horas de cultivo los sobrenadantes se colectaron y el contenido de interleucinas se midió evaluando la proliferación de las CTLL-2 por MTT.

Con la finalidad de determinar hacia que región del virión la respuesta de estas clonas estaba dirigida; se probó su especificidad ante distintas preparaciones virales. Desde virus purificado con y sin capa externa, hasta virus semipurificado. Los datos mostrados en la Tabla 5 demuestran que la especificidad de las 4 clonas probadas está dirigida hacia las proteínas internas del virión. Esto no fue sorprendente dadas las condiciones de estimulación de las células previo a la fusión.

Tabla 5: Clonas de 3G5 vs. diferentes preparaciones virales

		CTLL-2 Incorporación <sup>3</sup> H-Tdr		CPM (I.E.)
CLONAS	MEDIO	Rotavirus YM		
		SEMI-PURIFICADO	PURIFICADO	SIN CAPA EXTERNA
3G5.1	440	8969 (20.0)	3324 (7.5)	39404 (90.0)
3G5.7	427	46035 (107.0)	17937 (42.0)	73979 (173)
3G5.8	340	23133 (68.0)	12353 (36.0)	72674 (214)
3G5.10	298	1931 (6.5)	786 (2.6)	4514 (15.2)

Secreción de interleucinas de las clonas 3G5, mediada por la estimulación de las células A20.J con 5µg./ml. de distintas preparaciones de rotavirus YM. A las 48 horas de cultivo los sobrenadantes se colectaron y el contenido de interleucinas se midió evaluando la proliferación de las CTLL-2 por medio de la incorporación de [<sup>3</sup>H]-Tdr.

Dado que la inmunización con rotavirus purificado YM sensibilizó células Th específicas de VP6, se pensó que esta proteína podría ser uno de los blancos principales de las clonas ya que previo a la fusión los linfocitos utilizados para generar los hibridomas Th se habían activado predominantemente con partículas subvirales compuestas de VP1,VP2,VP3 y VP6, siendo VP6 la más abundante ( 50% del peso del virión). Se probó la reactividad de las clonas ante la región 171-397 de VP6 usando la proteína de fusión GST-VP6<sub>171-397</sub> y GST en presencia de células A.20.J como CPA's. Las clonas reportadas en la Tabla 6 respondieron específicamente ante esta región y no reaccionaron ante GST. Estos datos sugieren que dentro de las clonas Th seleccionadas existen varias específicas de VP6. No sabemos aún si la región 171-397 de VP6 es la más antigénica ya que no se han mapeado todas las clonas obtenidas. Sin embargo, este resultado sugería que en esta región debía existir al menos un epítipo de células Th.

## Resultados

Tabla 6: Respuesta de las clonas 3G5 ante VP6

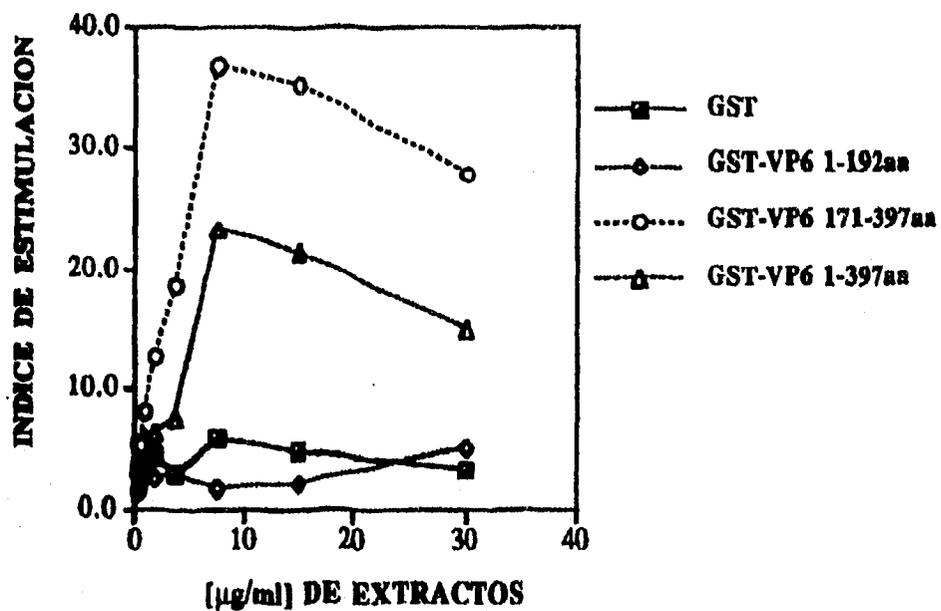
CTLL-2 x MTT Abs. 570 nm (I.E.)		
CLONAS	GST (extracto)	GST-VP6 171-397
3G5.1	0.074	0.267 (3.6)
3G5.7	0.110	0.329 (3.0)
3G5.8	0.081	0.314 (3.8)
3G5.10	0.072	0.235 (3.3)

Secreción de interleucinas de 4 clonas representativas de la línea 3G5 mediada por la estimulación de las células A20J con 5 µg/ml. de los extractos bacterianos insolubles que expresaban GST-VP6<sub>171-397</sub> y GST. A las 48 horas de cultivo los sobrenadantes se colectaron y el contenido de interleucinas se midió evaluando la proliferación de las CTLL-2 por MTT.

#### 4. Región de VP8 que reconoce la clona 3G5.7

En esta sección, se muestra como se empezó a definir la especificidad de la clona 3G5.7. Para esto, se probaron varias dosis de los extractos insolubles GST, GST-VP6<sub>1-192</sub>, GST-VP6<sub>171-397</sub> y GST-VP6. De esta manera, al analizar la respuesta de la clona ante los extremos mencionados, encontramos que tanto GST-VP6 como GST-VP6<sub>171-397</sub> pueden inducir una activación específica (Figura 8). La respuesta fue dosis dependiente y predominante ante GST-VP6<sub>171-397</sub>. En contraste no hubo respuesta ante GST-VP6<sub>1-192</sub> y GST. Por tanto, estos resultados indican que el epítopo reconocido por la clona 3G5.7 debe estar presente dentro de la región 193-397 de VP6.

## Resultados



**Figura 8: Reconocimiento de la región 193-397 de VP6 por el hibridoma 3G5.7**

Secreción de interleucinas por 3G5.7 mediada por la estimulación de las células A20.J con varias concentraciones (30-0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) de los extractos bacterianos insolubles que expresaban GST y las proteínas de fusión indicadas. A las 48 horas los sobrenadantes se colectaron y el contenido de interleucinas se evaluó en la línea celular CTLL-2 midiendo la proliferación celular por incorporación de [ $^3\text{H}$ ]-Tdr. Control con medio =119 cpm.

## Resultados

### 5. Localización del epítoto reconocido por la clona 3G5.7

Para la localización del epítoto reconocido por 3G5.7, se analizó la actividad antigénica de VP6 con 35 péptidos. Estos se sintetizaron en base a la secuencia de dicha proteína que comprende del aminoácido 181-397. La longitud elegida para estos fue de 14 aminoácidos yuxtapuestos por 8, ya que la longitud definida para los péptidos clase II es de 12-25 aminoácidos. Así al realizar el cultivo de 3G5.7 en presencia de éstos, se observó que esta clona es activada con tres péptidos que mapean en la región comprendida del aminoácido 283 al 302 de la proteína. El péptido que comprende la región 289-302 de VP6 indujo una activación predominante, mientras que ante la estimulación con los péptidos adyacentes que comprenden las regiones 283-296 y 295-308 respectivamente, la activación fue de un 13 y 31% respectivamente respecto a la estimulación mayor. Como control positivo se usó rotavirus YM semipurificado (Figura 9).

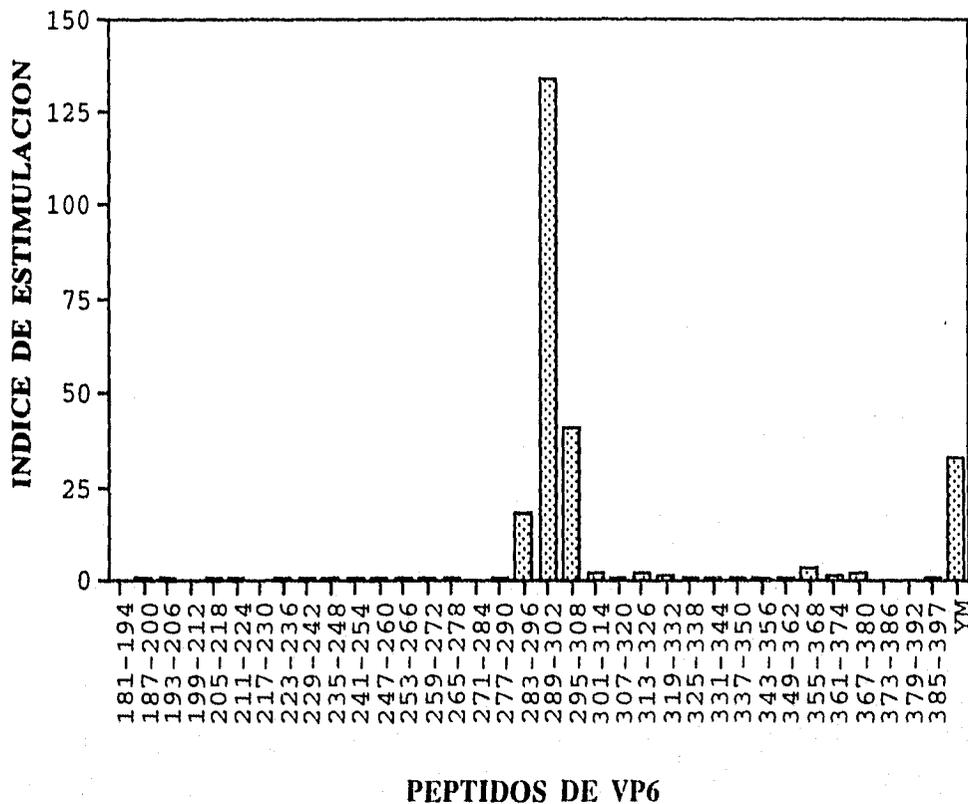
Por tanto, en base a estos datos pensamos que el epítoto se localiza en la región 289- 302 y que la antigenicidad de los péptidos adyacentes, se debe a que éstos contienen ciertos residuos del epítoto. Las secuencias de los péptidos mencionados son las siguientes:

**283-R N F D T I R L S F Q L V R-296**

**289-R L S F Q L V R P P N M T P-302**

**295-V R P P N M T P A V A N L F-308**

## Resultados



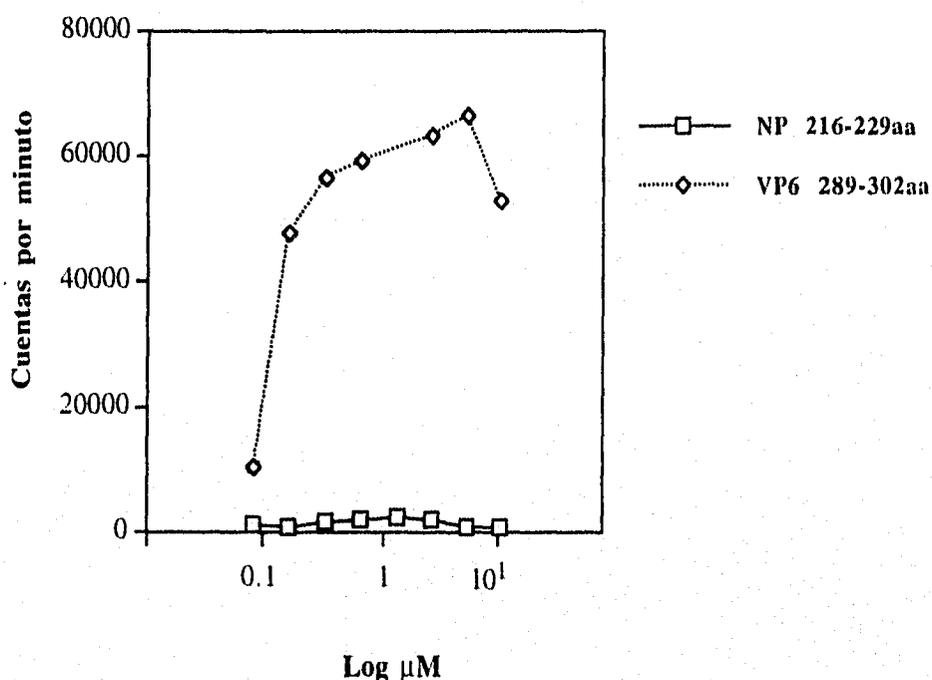
**figura 9: Mapeo del epítipo sobre VP6**

Respuesta del hibridoma Th 3G5.7 ante péptidos sintéticos que abarcan la región de aminoácidos de VP6 de YM 181-397. La respuesta de 3G5.7 se midió por medio de la secreción de IL's ante la estimulación con antígeno en presencia de las células A20.J como CPA. Como antígeno se usaron 2.5 µg/ml de péptido y como control positivo 10 µg/ml de rotavirus YM semipurificado. A las 48 horas los sobrenadantes se colectaron y el contenido de interleucinas se evaluó en la línea celular CTLL-2 midiendo la proliferación celular por incorporación de [<sup>3</sup>H]-Tdr. (Control con medio =711.5 cpm).

La especificidad de la respuesta de la clona 3G5.7 ante el péptido 289-302 se analizó además usando caracterizada varias concentraciones del péptido 289-302 de VP6 sintetizado de manera independiente por Biosynthesis. Como control se utilizó un péptido correspondiente a la región 216-229 de la nucleoproteína de influenza (NP 216-229), el cual es reconocido por

## Resultados

las células Th de ratones BALB/c<sup>69</sup>. Como se puede apreciar en la Figura 10 es evidente que 3G5.7 reconoce específicamente la región de VP6 del aminoácido 289 al 302, siendo la respuesta de la clona dosis dependiente en el rango de concentración que va de 5.3  $\mu$ M (10  $\mu$ g/ml) a 0.08  $\mu$ M (140  $\mu$ g/ml) observándose con 10.6  $\mu$ M (20  $\mu$ g/ml) un descenso en la respuesta. Por otro lado, como se puede apreciar la sensibilidad es muy alta ante esta región, ya que la clona es estimulada aún con 0.08  $\mu$ M (140 ng/ml) del péptido. Por otro lado, el péptido NP 216-229 no fue capaz de activarla. La concentración media molar alcanzada fue de 0.13  $\mu$ g (0.244  $\mu$ g/ml), la cual fue calculada en base al 80% de pureza de la preparación.



**Figura 10 : Respuesta del hibridoma Th 3G5.7 hacia el péptido 289-302 de VP6**

La respuesta del hibridoma 3G5.7 se midió por medio de la secreción de interleucinas en presencia de las células A20.J como CPA's y como antígeno varias concentraciones de los péptidos 289-302 de VP6 de rotavirus YM y como control el péptido 216-229 de la nucleoproteína de Influenza. Los péptidos examinados se probaron en un rango de concentraciones de 20  $\mu$ g/ml a 0.14  $\mu$ g/ml. A las 48 horas los sobrenadantes se

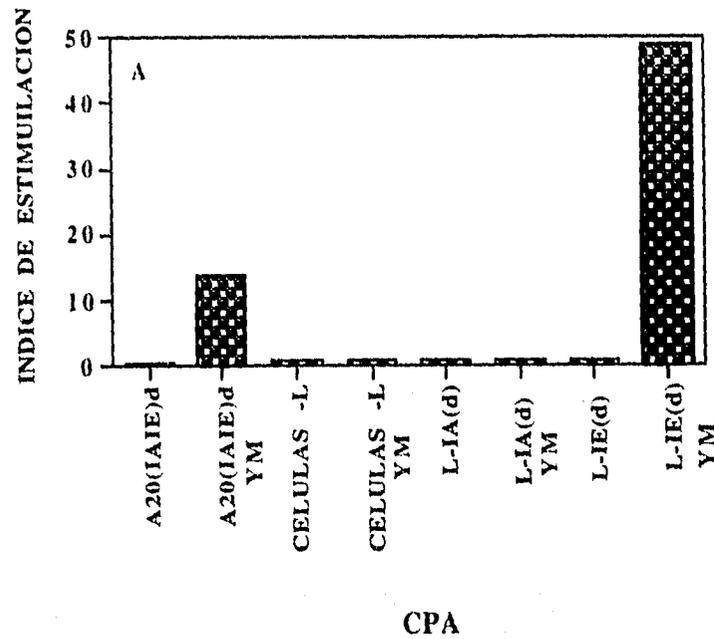
## Resultados

colectaron y el contenido de interleucinas se evaluó en la línea celular CTLL-2 midiendo la proliferación celular por incorporación de [ $^3$ H]-Tdr. (Control con medio= 997cpm).

### 6. Restricción por el MHC clase II de 3G5.7

El reconocimiento de la clona 3G5.7 fue analizada utilizando células L transfectadas con las moléculas IA<sup>d</sup> ó IE<sup>d</sup>, así como con células A.20.J como CPA's. En la figura 11A se muestra la evaluación de los sobrenadantes del cultivo de éstas células en presencia de YM semi-purificado. Como se puede ver, la clona 3G5.7 sólo fue capaz de activarse cuando el epítipo que esta reconoce es presentado por células L transfectas con la molécula IE<sup>d</sup>, así como por las células A.20.J (IA<sup>d</sup>IE<sup>d</sup>). Con ésto fue posible definir que el elemento de restricción involucrado en la presentación y reconocimiento del epítipo por parte de esta clona es la molécula del MHC clase II IE<sup>d</sup>.

## Resultados

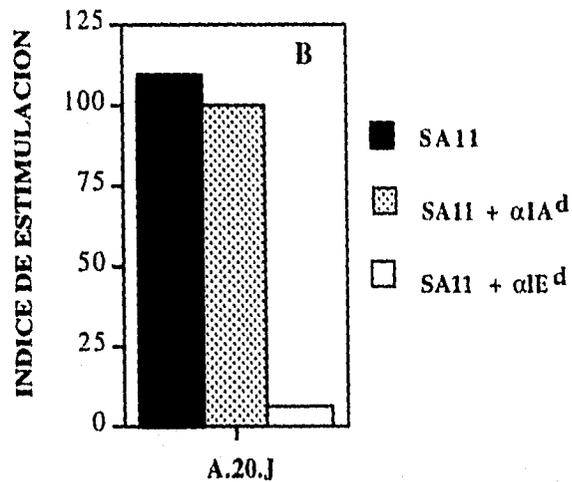


**Figura 11: El hibridoma 3G5.7 reconoce antígeno en el contexto de la molécula del MHC clase II IE<sup>d</sup>**

(A) Secreción de interleucinas por el hibridoma Th 3G5.7 mediada por la estimulación de las células A.20.J y células L con 5µg/ml de rotavirus YM semipurificado ó medio. A las 48 horas los sobrenadantes se colectaron y el contenido de interleucinas se evaluó en la línea celular CTLL-2 midiendo la proliferación celular por incorporación de [<sup>3</sup>H]-Tdr. Los valores de los controles negativos fueron: A20 =381, células L= 615, L-IA<sup>d</sup> =535, L-IE<sup>d</sup> =618.

Para confirmar la restricción por la molécula IE<sup>d</sup>, el reconocimiento de antígeno por 3G5.7 se bloqueo con anticuerpos monoclonales específicos contra las moléculas del MHC clase II. Para esto, las células A20.J (IA IE<sup>d</sup>) fueron utilizadas como CPA's. Como se puede apreciar en la Figura 11B la respuesta de 3G5.7 ante la estimulación con rotavirus SAll en presencia de los anticuerpos anti-IA<sup>d</sup> (K22.203.7) ó anti-IE<sup>d</sup>(K22.42.2)<sup>58,59</sup>, fue inhibida específicamente con el anticuerpo anti-IE<sup>d</sup>, corroborandose de esta manera que IE<sup>d</sup> es el elemento involucrado en la presentación de antígeno.

## Resultados



**Figura 11: El hibridoma 3G5.7 reconoce antígeno en el contexto de la molécula del MHC clase II IE<sup>d</sup>**

(B) Secreción de interleucinas por 3G5.7, mediada por la estimulación de las células A20.J (IA<sup>d</sup> IE<sup>d</sup>) con 5 $\mu$ g/ml de rotavirus SA11 semi-purificado en presencia de los anticuerpos monoclonales anti-IA<sup>d</sup> (K22.203.7) y anti-IE<sup>d</sup> (K22.42.2). A las 48 horas los sobrenadantes se colectaron y el contenido de interleucinas se evaluó en la línea celular CTLL-2 midiendo la proliferación celular por incorporación de [<sup>3</sup>H]-Tdr Control con medio = 261 cpm.

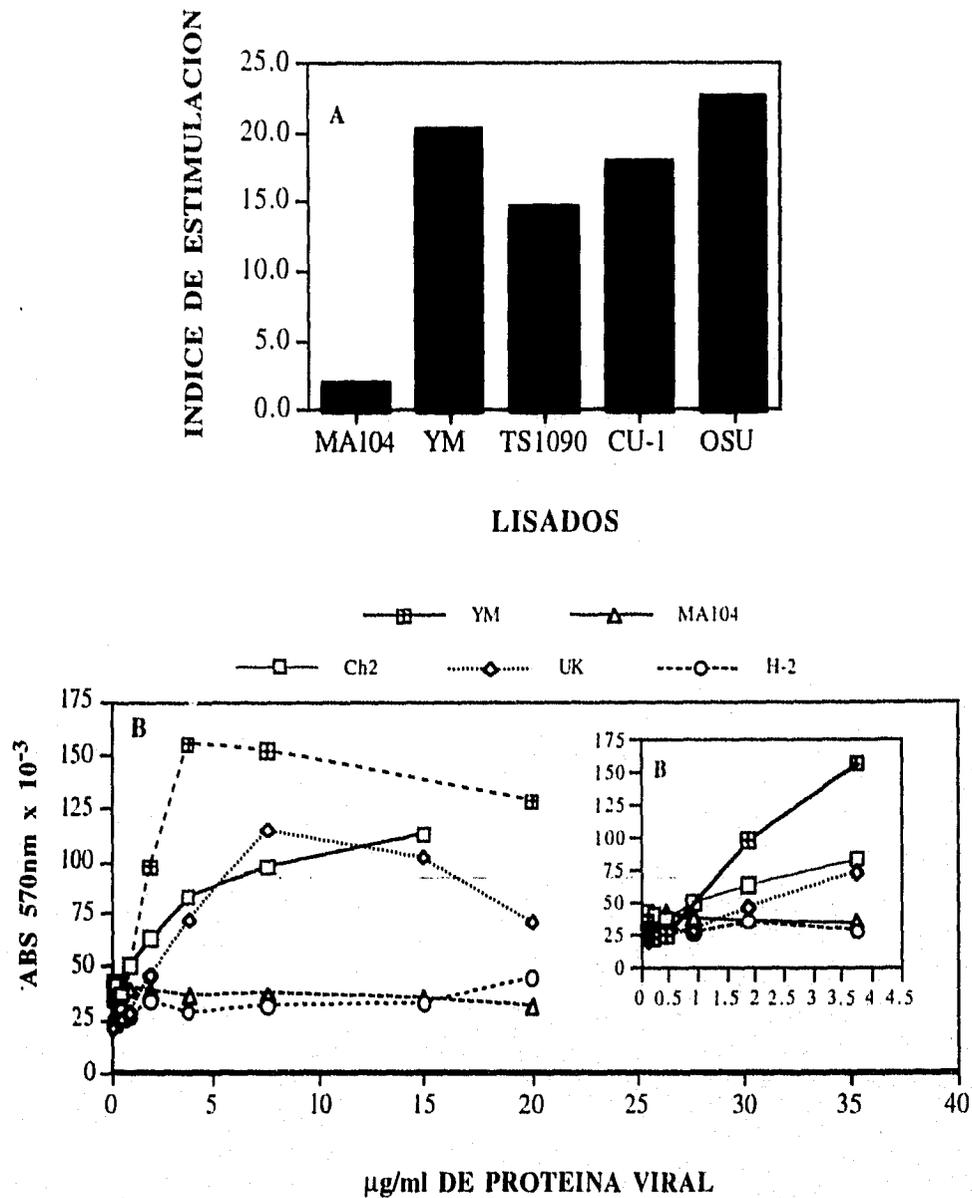
### 7. Reacción cruzada de la clona 3G5.7 ante distintas cepas virales

Hasta aquí, los resultados obtenidos ponían en evidencia, que en la región 171-397 de VP6 estaba localizado al menos un epítipo células Th. En función de esto, se determinó que tan conservada estaba esta región entre distintas cepas de rotavirus. Para esto, se eligió el

## Resultados

hibridoma 3G5.7 por su estabilidad así como por mostrar una reactividad similar a las otras. De esta manera, con 3G5.7 se realizaron dos ensayos, en el primero se analizó la reactividad de la clona hacia lisados de células infectadas con rotavirus TS1090 (G3; felino), CU-1 (G3; canino), OSU(G5; puerco) y YM Figura 12A. En el segundo se usaron virus semi-purificados de las cepas YM, UK, Ch2 (G7; aviar) y H-2 (G3; equino), esto último con la finalidad de tener una estimación más precisa de la cantidad de antígeno ya que con los lisados es difícil saberlo (Figura 12B). Al analizar la respuesta se encontró que todos los virus empleados estimularon a la clona 3G5.7 a excepción de la cepa de rotavirus de equino H-2.

Resultados



**Figura 12: Respuesta de la clona 3G5.7 ante diferentes cepas de rotavirus**

A) La respuesta del hibridoma fue medida por medio de la secreción de IL's en presencia de antígeno y las células A20.J como CPA's. A) respuesta contra lisados de células MA104 infectadas con las cepas de rotavirus YM, TS1090 CU-1 y OSU usados en una proporción 1/4 vol/vol en el cultivo. Como control se usó un lisado de células MA104 sin infectar. Los resultados son expresados como índices de estimulación. Control con medio =145 cpm. B) Respuesta contra varias concentraciones de rotavirus semi-purificado (20-0.117µg/ml) YM, Ch2, UK, SA11, H-2. Como control, se uso un lisado de células MA104 pasadas por un

## Resultados

colchón de sacarosa. La proliferación de la línea indicadora CTLL-2 se midió por MTT. Los resultados son expresados como unidades de absorbancia. Control con medio =0.03 Abs.

Por otro lado, los datos obtenidos de las curvas dosis respuesta revelaron que la clona 3G5.7 es extremadamente sensible a la estimulación con YM. Como se puede ver a una concentración de 3.75 µg/ml se pudo inducir la máxima proliferación y a una dosis mínima de 117 ng/ml pudo detectarse aún una respuesta. Además, la sensibilidad de la clona ante las cepas restantes fue muy variable. Ante la estimulación con UK y Ch2 la respuesta fue menor. Así, con UK la máxima estimulación fue observada a la concentración de 7.5 µg/ml no detectándose respuesta con 117ng/ml de proteína viral. Mientras que la respuesta inducida por Ch2 fue similar a la mostrada por UK. Sin embargo, en el rango de concentración de antígeno probado no se pudo determinar el punto máximo de respuesta. En contraste, la respuesta ante la cepa H-2 se vio completamente abatida siendo la magnitud de ésta similar a la observada con el control de MA104. Los resultados sugieren que el epítipo presente entre las cepas capaces de estimular al hibridoma Th 3G5.7 podría ser relevante en la inducción de inmunidad protectora por estar altamente conservado en 3 diferentes serotipos de rotavirus cuyos huéspedes están muy alejados desde el punto de vista filogenético<sup>70</sup>.

## Resultados

### 8. Comparación de la secuencia de aminoácidos de la región 289-302 de VP6 de cuatro cepas de rotavirus

La secuencia de la región de VP6 289-302 que corresponde al epítipo se comparó entre algunas de las cepas probadas cuya secuencia del gene 6 esta reportada. Como se puede apreciar en la Tabla 7 todas las cepas presentan un cambio respecto a YM en la posición 295 de una valina por una metionina. Por otro lado en H2 existen dos prolina adicionales en las posiciones 299 y 300 que corren la secuencia produciendo un cambio de 4 aminoácidos.

**Tabla 7: Comparación de la secuencia de aminoácidos en la región 289-302 de VP6 de distintas cepas de rotavirus**

<b>CEPAS VIRALES (Serotipo)</b>	<b>REGION DE AMINOACIDOS 289-302</b>
YM (G11) porcina	RLSFQLvRPPNMTP
SAII (G3) simio	- - - - -M - - - - -
UK (G6) bovina	- - - - -M - - - - -
H2 (G3) equina	- - - - -M - - - p p NMTP

Discusión

## VI. DISCUSION

En este trabajo se evaluó la respuesta secundaria de las células Th CD4<sup>+</sup> contra rotavirus por medio de la secreción de IL's de células de bazo cultivadas en masa e hibridomas de células Th procedentes de ratones BALB/c inmunizados parenteralmente con rotavirus, demostrando que las células Th así sensibilizadas pueden reconocer al rotavirus tanto de manera homotípica como heterotípica y que VP6 es un antígeno importante en esta respuesta.

El modelo empleado fue la inmunización parenteral con cepas heterólogas utilizado previamente para inducir protección a través de anticuerpos neutralizantes en ratones adultos retados oralmente con cepas de rotavirus murinas<sup>60</sup>. Esto indirectamente implica una activación *in vivo* de las células Th. Existen varias evidencias que indican que estas células son importante tanto en la protección ante la infección como en la depuración viral. Se ha visto al depletar células T CD4<sup>+</sup> en becerros que éstas influyen en la producción de anticuerpos neutralizantes tipo IgA los cuales directamente previenen la infección en la mucosa intestinal<sup>48</sup>. Por otro lado, en ratones depletados de células Tc y de IgA's se ha observado una lenta recuperación en ratones infectados<sup>71</sup>. En función de estos trabajos es posible pensar que tanto la liberación de interleucinas así como la inducción de citotoxicidad restringida clase II podrían ser las responsables de la función efectora involucrada en protección.

Siguiendo el modelo descrito, nosotros inmunizamos ratones por la ruta i.p. con rotavirus YM purificado ó semi-purificado activado con tripsina, encontrando que con una sola inmunización de 7 µg de rotavirus purificado es posible sensibilizar a las células Th *in vivo*, las cuales son capaces de responder ante una estimulación secundaria *in vitro* liberando interleucinas de manera específica. No es claro si el virus es capaz de infectar las células residentes en el peritoneo y de esta manera se pueda amplificar la cantidad de antígeno inicialmente inoculado. Ward et al<sup>60</sup> reportaron que rotavirus infectivo inoculado i.p era capaz de inducir una respuesta de anticuerpos dirigidos contra proteínas NS, sin embargo, no fue posible detectar replicación viral, sugiriendo una infección abortiva. En este laboratorio no ha sido posible demostrar síntesis de proteínas virales cuando células de bazo han sido incubadas con rotavirus activado (comunicación personal, Dr. Fernando Esquivel ). Por otro lado Burns et al<sup>72</sup>, sugieren que virus activado inoculado por vía parenteral es capaz de llegar al intestino delgado y replicarse. De cualquier manera parece ser que no existen niveles altos de replicación por lo que la mayoría del virus inoculado podría estar siendo tomado por la vía endocítica que favorece la presentación a las células Th CD4<sup>+</sup>.

## Discusión

Una vez evaluada la respuesta secundaria de las células Th ante cepas homólogas, la respuesta de las células Th se evaluó ante la cepa de rotavirus SA11 (G3;simio) en ratones inoculados i.p. con YM (G11;puerco), observando una activación heterotípica de células de memoria similar a la reportada por Snodgrass et al<sup>49</sup> donde la actividad de las células Th se midió por proliferación celular. En contraste, a nuestro trabajo en este último se encontró adicionalmente que las células Th, tanto de bazo como de ganglio cultivadas en masa con rotavirus presentaban altos niveles de proliferación inespecífica, debido posiblemente a un efecto mitogénico del RNA de doble cadena sobre las células B, lo cual era evitable si se inactivaba el virus con luz uv ó calor<sup>73</sup>. En el presente estudio se usó tanto virus tratado con uv como con calor y en ningún caso se observó activación inespecífica de las células Th de bazo de los ratones control, lo cual concuerda con el trabajo antes mencionado. Sin embargo, es importante aclarar que la inactivación por luz u.v. fue realizada principalmente para esterilizar la preparación antigénica utilizada dándonos una reducción en la infectividad de un 52% y con la inactivación por calor esta se redujo hasta un 95% (datos no mostrados). Esta reducción en la infectividad creemos que lejos de afectar la presentación de antígeno a las células Th la beneficia ya que favorece que el virus sea tomado por la ruta endocítica, vía principal en el procesamiento y presentación de antígeno restringido por el MHC clase II<sup>25</sup>. Además, dado que el tratamiento con luz uv no redujo la infectividad totalmente y no se detectó una respuesta inespecífica en los ratones no inoculados muestra que el método empleado para evaluar el contenido de interleucinas es altamente específico para IL2, IL4 e IL15 cuya liberación en un 95% puede ser atribuido a las células Th CD4<sup>+</sup> <sup>61</sup>. Por tanto, las interleucinas que pudieran ser liberadas por la sobreestimulación tanto de células B tales como: IL-6, INF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  y TNF- $\beta$ <sup>16</sup> así como cantidades mínimas de IL-2 por las células Tc bajo estas condiciones<sup>17</sup> deben contribuir muy poco a la proliferación de las células CTLL-2.

Dado que VP6 es una proteína abundante en el virión y se había demostrado que era un blanco del reconocimiento de una línea de células Th heterotípicas procedentes de ratones BALB/c<sup>49</sup>, se inició la caracterización de la especificidad de la respuesta con ésta proteína. En la respuesta hacia VP6 se encontró a nivel policlonal una mejor activación de células Th de memoria específicas para rotavirus YM en el fragmento 171-397, sin embargo, en base a estos experimentos no podemos afirmar que esta región sea más antigénica que la región 1-192, ya que este fragmento fusionado a GST pudiera estar siendo procesado de una manera ineficiente. Se ha visto por medio de la síntesis de péptidos sintéticos compuestos de epítopes Th inmunodominantes de nucleoproteína de Influenza y el represor cI de lambda que el reconocimiento de estos epítopes por las células Th se ve afectado por el contexto bajo el cual se encuentren dentro de la molécula proteica<sup>74</sup>. Por otro lado otra alternativa es que la cantidad neta de proteína adicionada sea menor que a la del fragmento 171-397 ya que es difícil

## Discusión

determinar con exactitud la cantidad de la proteína de interés dado que en las preparaciones usadas, además de las bandas principales, se observaron frecuentemente una serie de bandas más pequeñas, que en apariencia parecen ser productos de degradación de el fragmento, sin embargo, estas bandas pudieran ser fragmentos de VP6 más pequeños generados por la presencia de inicios de traducción internos dentro de el DNA<sup>75</sup>.

Una de las principales características de los rotavirus es su gran variabilidad antigénica en sus proteínas externas (VP4 y VP7) lo que da lugar a un gran número de serotipos. Existen cuatro serotipos de rotavirus epidemiológicamente importantes en el humano G1, G2, G3 y G4<sup>1</sup>, por lo que una vacuna que pueda inducir una respuesta heterotípica es sumamente deseable. Es evidente existen epítopes Th conservados entre diferentes cepas de rotavirus que deben estar presentes principalmente en las proteínas más conservadas y abundantes como VP6. Esto y la inexistencia de epítopes para células Th reportados nos llevó a determinar a nivel clonal la especificidad de células Th contra rotavirus. Para esto, se generaron hibridomas de células Th procedentes de linfocitos activados usando rotavirus YM inoculado i.p. y dirigidos contra epítopes comunes en las proteínas internas de YM y SA11. De esta manera, fue posible obtener dos líneas de hibridomas, 3G5 y 3A12 específicas para rotavirus. De 3G5 se derivaron 22 clonas de las que solamente 14 (63%) fueron rotavirus específicas y de 3A12 se derivaron 42 de las cuales sólo 8 (19%) fueron específicas de rotavirus. Esto claramente muestra la heterogenicidad de las poblaciones presentes en las líneas celulares obtenidas. Dentro de las clonas examinadas solamente cuatro derivadas de 3G5 fueron analizadas en detalle encontrando que todas ellas reconocían específicamente la región de VP6 171-397. Esto nos hace pensar que VP6 es uno de los blancos principales del reconocimiento de las células Th y que dada su abundancia en el virión fue posible la expansión de células Th dirigidas hacia esta proteína y consecuentemente la obtención de varias clonas con la especificidad mencionada. Aunque en base a el análisis estadístico reportado<sup>68</sup> para la clonación por dilución limitante existe un rango de confianza que hace altamente probable que estas sean en realidad clonas, no podemos descartar la posibilidad de que alguna de éstas pueda estar mezclada con otra población con una especificidad diferente, por lo que para asegurar la clonalidad de la respuesta se realizó la subclonación de dos de ellas para estudios posteriores. En otros sistemas virales se ha visto que la mayoría de la respuestas heterotípicas están dirigidas hacia las proteínas internas. Estas proteínas generalmente son más conservadas, primero porque cumplen funciones estructurales y segundo porque no están sujetos a una presión selectiva por anticuerpos neutralizantes. Al querer localizar el epítipo reconocido por el hibridoma 3G5.7 se recurrió al uso de péptidos sintéticos sobrelapados que cubrían la región de VP6 181-397<sup>57</sup> dado que los algoritmos de predicción para epítopes de células Th tiene muchas limitaciones<sup>69</sup>. Creemos que hay dos

## Discusión

razones principales por lo que estos algoritmos no son tan ciertos: (1) Las moléculas de clase II presentan una gran promiscuidad para enlazar péptidos de 12-25 aminoácidos por lo que muchos aminoácidos pueden ser intercambiados sin afectar grandemente la afinidad<sup>76</sup>, (2) Es necesario un mayor conocimiento sobre la biología del procesamiento de antígeno. Esto permitiría señalar no sólo que secuencias podrían tener la capacidad de enlazar a clase II sino también cuales péptidos podrían ser generados en el procesamiento. De esta manera se descubrió que la clona Th 3G5.7 reconoce sobre VP6 un epítoto altamente conservado en la región de los aminoácidos 289-RLSFQLVRPPNMTP-302 el cual se sobrelapa con el dominio de trimerización de VP6 por 39 aminoácidos<sup>77</sup> y cuya presentación esta restringida por la molécula del MHC clase II IE<sup>d</sup>. Aunque el aminoácido 305 presente en VP6 es uno de los involucrados en el dominio que determina el subgrupo de las cepas de rotavirus, este está fuera del epítoto localizado, por lo que no parece haber una correlación en cuanto a la presencia del epítoto en determinados subgrupos virales. Sin embargo para demostrarlo sería necesario probar otras cepas de diferente subgrupo ya que todas las cepas utilizadas a excepción de H-2 y Ch2 son subgrupo I. Al realizar un análisis posterior ante otras cepas, se observó que ante la estimulación con la cepa de rotavirus H-2 (G3;equina) la respuesta de 3G5.7 se abatía completamente. En esta cepa, se localizan dos prolinas adicionales dentro del sitio mapeado que pueden estar alterando la conformación del péptido y su libertad de enlace al inducir el rompimiento de alfa hélices y potencialmente dobles en sentido opuesto dentro de las estructuras proteicas<sup>78</sup>. Además, no se puede descartar que el péptido no se genere por algún defecto en el procesamiento de la cepa H-2. En función de esto, se buscaron algoritmos de predicción de epítotos que nos ayudaran a entender las posibles interacciones del péptido mapeado con la molécula IE<sup>d</sup> y consecuentemente con las células Th. Recientemente, Rammensee et.al.<sup>79</sup> han hecho un análisis de varios epítotos tanto para clase I como para clase II, los cuales se basan en su posible interacción con ciertos sitios de anclaje presentes en la parte central de la molécula HLA-DR1 previamente definidos por cristalografía del complejo HLA-DR1 con el péptido 306-318 de la hemaglutinina de Influenza<sup>18</sup>. En tales sitios las siguientes secuencias de aminoácidos conservados tanto en humanos como en el ratón están presentes: en la posición 1: W, Y, F, I, L ó V; en la posición 4: K, R ó I; en la posición 6: I, L, V ó G y en la posición 9: K ó R. Al analizar el epítoto 289-RLSFQLVRPPNMTP-302 de VP6, se puede observar que dentro de los motivos de unión a IE<sup>d</sup> propuestos existe uno que involucra una Leucina en la posición 1 y una valina en la posición 6, lo que parece indicar que estos dos residuos de aminoácidos se anclan en la parte central dominio de la molécula IE<sup>d</sup>. Así mismo, en base a esto pensamos que la antigenicidad observada de los péptidos adyacentes 283 -RNFDTIRLSFQLVR - 296 y 295-VRPPNMTPAVANLF-308 puede ser debida a la presencia de ciertos residuos del epítoto.

## Discusión

Por otro lado, dada la alta reactividad de éste último (31%), creemos que la región 295 - **VRPPNMTP**-302 podría estar proyectada afuera del sitio de unión y posiblemente involucrada en la interacción con el receptor de células T (TCR). Existen evidencias que los residuos de aminoácidos del extremo carboxilo terminal de los péptidos que se unen a las moléculas del MHC clase II, son importantes para la interacción con el receptor de células Th<sup>80</sup>. En el epítotope de células Th 306-318 presente en la HA de influenza los residuos de aminoácidos K 307, V 309, K 310, N 312, K 315 están implicados en la interacción con el TCR<sup>81</sup>. Con esto, es posible pensar que al menos los aminoácidos V 295 y N 299 del epítotope 289-302 de VP6 podrían estar implicados en una función similar.

Es conocido que proteínas internas del virión, pueden ser blancos importantes de células Th, las cuales pueden inducir la producción de anticuerpos neutralizantes dirigidos hacia las proteínas externas del virión<sup>63,64</sup>. Este mecanismo de ayuda intermolecular consiste en la internalización y procesamiento de la partícula viral por una célula B específica hacia alguna proteína externa. Esto permite que potencialmente todos los epítotos de células Th, aún los que se encuentran dentro de la partícula viral, podrían expresarse sobre la superficie de las células B asociados a la molécula del MHC clase II y de esta forma servir de ligandos para el reconocimiento de células Th específicas de sitios conservados. Por tanto es factible pensar que células Th capaces de reconocer sitios conservados sobre VP6 podrían estar involucradas en la inducción de IgA's con diferentes especificidades en la mucosa intestinal<sup>39</sup>. No sabemos si este epítotope es importante en el reconocimiento a nivel policlonal, por lo que sería importante estudiar esto. Se sabe que las células Th pueden reconocer más de un epítotope dentro de una proteína en un haplotipo dado<sup>69</sup>. Esto claramente nos sugiere que debe haber más de un epítotope dentro de VP6.

## Conclusiones

### VII. CONCLUSIONES

- 1.- Se establecieron las condiciones experimentales para evaluar la respuesta secundaria de células Th contra rotavirus y sus proteínas a través de la principal característica de estas células, que es la secreción de IL's.
- 2.- Se confirmó en nuestro sistema que células Th de memoria pueden presentar una respuesta heterotípica hacia rotavirus.
- 3.- Se confirmó que VP6 es un blanco importante de células Th específicas para rotavirus y que esta proteína contiene al menos un epítipo altamente conservado entre las diferentes cepas de rotavirus (289-RLSFQLVRPPNMTP-302), que es presentado en el contexto de la molécula del MHC clase II I-E<sup>d</sup>.

Perspectivas

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## VIII. PERSPECTIVAS

- 1.- Continuar con la caracterización de los hibridomas específicos para rotavirus obtenidos en este trabajo.
- 2.- Generar mas hibridomas de células Th contra rotavirus con especial énfasis hacia otras proteínas internas del virión.
- 3.- Determinar la antigenicidad del epítope descrito, en poblaciones de células Th específicas para rotavirus derivadas tanto de bazo como de ganglio.
- 4.- Generar clonas de células Th por reestimulación continua *in vitro* específicas para el epítope localizado, con la finalidad de establecer su función *in vivo* en experimentos de transferencia pasiva in ratones tanto SCID recostituyendo ó no con células B e infectadas con rotavirus. En los ratones SCID no reconstituidos con células B se verá la capacidad efectora directa de las clonas para controlar la infección y en los ratones SCID reconstituidos con células B se verá su importancia combatiendo la infección a través de la secreción de anticuerpos neutralizantes.
- 5.- Determinar la capacidad de las células Th específicas para VP6 y el epítope localizado para inducir anticuerpos neutralizantes *in vivo* a través de una ayuda a células B de tipo intermolecular.

## Bibliografía

### IX. INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1: Resumen de las características más sobresalientes de las líneas celulares	14
Tabla 2: Respuesta de las células Th vs. YM y SA11	30
Tabla 3: Respuesta policlonal de células Th hacia VP6	32
Tabla 4: Respuesta de clonas de 3G5 vs. YM y SA11	39
Tabla 5: Clonas de 3G5 vs. diferentes preparaciones virales	40
Tabla 6: Respuesta de las clonas 3G5 ante VP6	41
Tabla 7: Comparación de la secuencia de aminoácidos en la región 289-302 de VP6 de distintas cepas de rotavirus	52
figura 1: Expresión de las proteínas de fusión	20
Figura 2: Evaluación de la proliferación de las células CTLL -2 usando [ <sup>3</sup> H]-Tdr y MTT	27
Figura 3: Respuesta policlonal de las células Th específicas contra rotavirus	29
Figura 4: Diagrama de los fragmentos de VP6 fusionados a GST	31
Figura 5: Selección de hibridomas de células Th específicas para rotavirus	35
figura 6 Clonas 3G5 generadas	37
figura 7 Clonas de 3A12 generadas	38
Figura 8: Reconocimiento de la región 193-397 de VP6 por el hibridoma 3G5.7	42
figura 9: Mapeo del epítipo sobre VP6	44
Figura 10 : Respuesta del hibridoma Th 3G5.7 hacia el péptido 289-302 de VP6	45
Figura 11: El hibridoma 3G5.7 reconoce antígeno en el contexto de la molécula del MHC clase II IE <sup>d</sup>	47
Figura 12: Respuesta de la clona 3G5.7 ante diferentes cepas de rotavirus	50

## Bibliografía

## X. BIBLIOGRAFIA

---

- <sup>1</sup>Institute of Medicine. Prospects for immunizing against rotavirus. In new vaccine development. Establishing priorities. National Academy Press, Washington, D.C. 1986; 2:308-318
- <sup>2</sup> Hoshino, Y., and Kapikian, A.Z. Rotavirus vaccine development for the prevention of severe diarrhea in infants and young children. *Trends in Microbiol.* 1994; 2: 242-249.
- <sup>3</sup> Bishop, S. Development of candidate rotavirus vaccines. *Vaccine* 1993; 11: 247-254
- <sup>4</sup> Prasad, B.V.V., Wang, G.J., Clerx, J.P.M., and Chiu, W. (1988). Three-dimensional structure of rotavirus. *J. Mol. Biol.* 1988; 199 (2): 269-275.
- <sup>5</sup> Yeager, M., Berriman, J.A., Baker, T.S., and Bellamy A.R. Three-dimensional structure of the rotavirus haemagglutinin VP4 by cryo-electron microscopy and difference map analysis. *Embo J.* 1994; 13 (5): 1011-1018
- <sup>6</sup> Bican, P.J., Cohen, J., Charpilien, A., and Scherrer, R. Purification and characterization of bovine rotavirus cores. *J. Virol.* 1982; 43 (3): 1113-1117.
- <sup>7</sup> Pizarro, J.L., Sandino A.M., Pizarro, J.M., Fernandez, J., Spencer, E. Characterization of rotavirus guanylyltransferase activity associated with polypeptide VP3. *J. Gen. Virol.* 1991; 72: 325-332.
- <sup>8</sup> Boyle, J. F. and Holmes K.V. RNA-binding proteins of bovine rotavirus. *J. Virol.* 1986; 58 (2): 561-568.
- <sup>9</sup> López, S., Espinosa, R., Greemberg, H., and Arias, F. Mapping the subgroup epitopes of rotavirus protein VP6. *Virology* 1994;204: 153-162.
- <sup>10</sup> Estes, M. K., and Cohen, J. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol. Rev.* 1989; 53(4): 410-449.
- <sup>11</sup> Anthony, I.D., Berriman J.A., Bullivant, S., Dayal, S., Bellamy, A.R. Rotavirus spike structure and polypeptide. *J. Virol.* 1991; 65: 4334-4340.
- <sup>12</sup> Clark, S.M., Roth, J.R., Clark, M.L., Barnett, B.B., and Spendlove, R.S. Trypsin enhancement of rotavirus infectivity: Mechanism of enhancement. *J. Virol.* 1981; 39: 816-822.

## Bibliografia

---

- <sup>13</sup> Bass, D.M., Baylor, M.R., Greenberg, H.B. Liposome mediated transfection of intact viral particles reveals that plasma membrane transfection of intact viral particles reveals that plasma membrane determines permissivity of tissue culture cells to rotavirus. *J. Clin. Invest.* 1992; 90: 2313-2320
- <sup>14</sup> Shaw, R.D., and Greenberg, H.B. Rotaviruses. In *encyclopedia of Virology* ( Webster, R., and Granoff, A. eds. ). Academic Press, San Diego, CA. 1994; 3: 1286-1290
- <sup>15</sup> Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pober, J.S. In *Cellular and molecular immunology* (Wonsiewicz, M.J. editor). Saunders, W.B. Company, Philadelphia, PA. 1991; 5, 6, 7: 99 - 167.
- <sup>16</sup> Fitch, F.W., Lancki, D.W., and Gajewski, T.F. T cell mediated immune regulation. In *Fundamental Immunology* (Third Edition William, E.P.). Raven Press, New York. 1993; 19: 741- 750.
- <sup>17</sup> Mossmann, T.R., and Coffman, R.L. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv. Immunol.* 1989; 46: 111-147.
- <sup>18</sup> Brown J.H., Jardetzky T.S., Gorga J.C., Stern L.J., Urban R.G., Strominger J.L., Wiley D.C. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 1993; 364: 33-39
- <sup>19</sup> Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennett, W.S., Strominger, J.L., Wiley D.C. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 1987; 329 (6139): 512-518
- <sup>20</sup> Young, A.C., Zhang, W., Sacchettini, J.C., and Nathenson, S.G. The three dimensional structure of H-2Db at 2.4 Å resolution: Implications for antigen-determinant selection. *Cell* 1994; 76(1): 39-50.
- <sup>21</sup> Yewdell, J.W., and Bennink, J.R. Cell biology of antigen processing and presentation to MHC class I molecule restricted T lymphocytes. *Adv. Immunol.* 1992; 52: 1-123.
- <sup>22</sup> Shepherd, J.C., Schumacher, T.N.M., Ashton, R., Janeway, C.A., and Tonegawa, S. TAP-1 dependent peptide translocation in vivo is ATP dependent and peptide selective. *Cell* 1993; 74: 577-586.

## Bibliografia

---

- <sup>23</sup> Peters P.J., Neefjes, J.J., Corschot, V., Pioegh, H.L., and Geuze, H.J. Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments. *Nature* 1991; 349: 669-676.
- <sup>24</sup> Maric, M.A., Taylor, M.D., and Blum, J.S. Endosomal aspartic proteinases are required for invariant chain processing. *Proc. Natl. Acad.Sci. U.S.A.* 1994; 91: 2171-2175.
- <sup>25</sup> Cresswell, P. Antigen processing. *Annu. Rev. Immunol.* 1993; 12: 259-293.
- <sup>26</sup> Denzin, L.K., and Cresswell, P. HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II  $\alpha\beta$  dimers and facilitates peptide loading. *Cell* 1995; 82 (1): 155-165.
- <sup>27</sup> Croft, M. Activation of naive, memory and effector T cells. *Current Opinion in Immunology* ( Alt, F., and Marrack, P. eds.). 1994; 6: 431-437.
- <sup>28</sup> Kagi, D., Vignaux, F., Ledermann, B., Burk, K., Sella P., Odermatt B., Olsen K.J., Podack E.R., Zinkernagel R.M., Hengartner H. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 1994; 369: 31-37
- <sup>29</sup> Kagi D., Vignaux F., Ledermann B., Burk K., Depraetere V., Nagata, S., Hengartner, H., Golstein, P. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell mediated cytotoxicity. *Science* 1994; 265: 528-530
- <sup>30</sup> Ralph, P., Nakoinz, I., and Rennick, D. Role of interleukin 2, interleukin 4 and alpha, beta and gamma interferon in stimulating macrophage antibody-dependent tumoricidal activity *J. Exp. Med.* 1988; 167: 712-717
- <sup>31</sup> Biron, C.A. Cytokines in the generation of immune responses to, and resolution of virus infection. *Current Opinion in Immunology* 1994; 6: 530-538.
- <sup>32</sup> Kapikian, A. Z., and Chanock, R.M. Rotaviruses. In *Virology* ( 2nd edn Fields, B.N., Knipe, D.M., eds). Raven Press, New York. 1990; 49: 1353-1404.
- <sup>33</sup> Gentsch, J.R., Glass, R.I., Woods, P., Gouvea, V., Gorziglia, M., Flores, J., Das, B.K., and Bhan, M.K. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J. Clin Microbiol.* 1992; 30: 1365-1373.
- <sup>34</sup> Das, M., Dunn, S.J., Woode, G.N., Greenberg, H.B., and Rao, D. Both surface proteins (VP4 and VP7) of an asymptomatic neonatal rotavirus strain (1321) have high levels of

## Bibliografia

---

sequence identity with the homologous proteins of a serotype 10 bovine rotavirus. *Virology* 1993; 194: 374-379.

<sup>35</sup> Matsui, S. M., Mackow, E.R., and Greenberg, H.B. Molecular determinant of rotavirus neutralization and protection. *Adv. Virus Res.* 1989; 36: 181-214.

<sup>36\*</sup> Padilla-Noriega, L., Dunn, S.J., Lopez, S., Greenberg, H.B., and Arias, C.F. Identification of two independent neutralization domains on the VP4 trypsin cleavage products VP5\* and VP8\* of human rotavirus ST3. *Virology* 1995; 206: 001-007.

<sup>37</sup> Matsui, S.M., Offit, P.A., Mackow, E.R., Benfield, D.A., Shaw, R.D., Padilla-Noriega L., Greenberg, H.B. Passive protection against rotavirus-induced diarrhea by monoclonal antibodies the heterotypic neutralization domain of VP7 and the VP8 fragment of VP4. *J. Clin. Microbiol.* 1989; 27(4) : 780-782.

<sup>38</sup> Ward, R.L., McNeal, M.M., and Sheridan J.F. Evidence that protection following oral immunization of mice with live rotavirus is not dependent on neutralizing antibody. *Virology* 1992; 188: 57-66

<sup>39</sup> Greenberg, N. F., Burns, J.W., and Bracy, L. Comparison of mucosal and systemic humoral immune responses and subsequent protection in mice orally inoculated with a homologous or a heterologous rotavirus. *J. Virol.* 1994; 68(12) : 7766-7773.

<sup>40</sup> Offit, P.A., and Dudzik, K.I. Rotavirus-specific cytotoxic T lymphocytes cross-react with target cells infected with different rotavirus serotypes. *J. Virol.* 1988; 62(1): 127131.

<sup>41</sup> Offit P.A., and Dudzik K.I. Rotavirus-specific cytotoxic T lymphocytes passively protect against gastroenteritis in suckling mice. *J. Virol.* 1990; 64(12): 6325-6328

<sup>42</sup> Dharakul, T., Rott, L., and Greenberg, H.R. Recovery from chronic rotavirus infection in mice with severe combined immunodeficiency: virus clearance mediated by adoptive transfer of immune CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *J. Virol.* 1990; 64(9): 4375-4382

<sup>43</sup> Dharakul, T., Labbe, M., Cohen, J., Bellamy, R., Street, J.E., Mackow, E.R., Fiore, L., Rott, L., and Greenberg, H.B., Immunization with baculovirus-expressed recombinant rotavirus proteins VP1, VP4, VP6 and VP7 induces CD8<sup>+</sup> T lymphocytes that mediate clearance of chronic rotavirus infection in SCID mice. *J. Virol.* 1991; 65(11): 5928-5932

## Bibliografia

---

- <sup>44</sup> Franco, M.A., Lefevre, P., Willems, P., Tosser, G., Lintermanns, P., and Cohen, J. Identification of cytotoxic T cell epitopes on the VP3 and VP6 rotavirus proteins. *J. Gen. Virol.* 1994; 75: 589-596
- <sup>45</sup> Franco, M.A., Prieto, I., Labbe, M., Poncet, D., Borrás-Cuesta, F., and Cohen, J. An immunodominant cytotoxic T cell epitope on the VP7 rotaviral protein overlaps the H2 signal peptide. *J. Gen. Virol.* 1993; 74: 2579-2586.
- <sup>46</sup> Franco, M. A., and Greenberg, H.B. Role of B cells and cytotoxic T lymphocytes in clearance of and immunity to rotavirus infection in mice. *J. Virol.* 1995; 69(12): 7800-7806
- <sup>47</sup> Offit, P. A., Hoffenberg, E.J., Pia, E.S., Panacka, I.P.A., and Hill, N.L. Rotavirus-specific helper T cell responses in newborns, infants, children, and adults. *J. Infect. Dis.* 1995; 165(6): 1107-1011.
- <sup>48</sup> Oldham, G., Bridger, J.C., Howard, C.J., and Parsons, K.R. In vivo role of lymphocyte subpopulations in the control of virus excretion and mucosal antibody responses of cattle infected with rotavirus. *J. Virol.* 1993; 67(8): 5012-5019.
- <sup>49</sup> Bruce, M.G, Cambell, I., Xiong, Y., Redmond, M., Snodgrass, D.R. Recognition of rotavirus antigens by mouse L3T4-positive T helper cells. *J. Gen. Virol.* 1994; 75: 1859-1866.
- <sup>50</sup> White, J., Blackman, M., Bill, J., Kappler, J., Marrack, P., Gold, D.P., and Born, W. Two better cell lines for making hybridomas expressing specific T cell receptors. *J. Immunol.* 1989; 143: 1822-1825.
- <sup>51</sup> McKean, D.J., Milson, A., Kimoto, M., Fathman, G., Walker, E., and Warner, N. Major histocompatibility complex-restricted antigen presentation to antigen-reactive T cell by B Lymphocyte tumor cells. *J. Exp. Med.* 1981; 1081: 1419-1431.
- <sup>52</sup> Gillis, S. Long term culture of tumour-specific cytotoxic T cell. *Nature* 1977; 268(14): 154-156.
- <sup>53</sup> Grabstein, K.H., Eisenman, J., Shanebeck, K., Rauch, C., Srinivasan, S., Fung, V., Beers, C., Richardson, J., Schoenborn, M.A., Ahdieh, M., Johnson, L., Alderson, M.R., Wajson, J.D., Anderson, D.M., and Giri, J.G. Cloning of T cell growth factor that interacts with the  $\beta$  chain of the interleukin-2 receptor. *Science* 1994; 364: 965-968.

## Bibliografía

---

- <sup>54</sup> Germain, R.N. Lymphocyte biology section. Laboratory of Immunol. NIAID, NIH. Bethesda, Maryland, U.S.A.
- <sup>55</sup> Clark, S.M. Trypsin enhancement infectivity: mechanism of enhancement. *J. Virol.* 1981; 39(3): 816-822.
- <sup>56</sup> Espejo, R. T., Lopez, S., and Arias, C.F. Structural polypeptides of simian rotavirus SALL and the effect of trypsin. *J. Virol.* 1981; 37(1): 156-160.
- <sup>57</sup> López, S., and Arias, C.F. Sequence analysis of rotavirus YM VP6 and NS28 proteins. *J. Gen. Virol.* 1993; 74: 1223-1226
- <sup>58</sup> Koch, N., Hammerling, G.J., Tada, N., Kimura, S., Hammerling, U. Cross-blocking studies with monoclonal antibodies against I-A molecules of haplotypes b,d, and k. *Eur.J. Immunol.* 1982; 12(11): 909-914.
- <sup>59</sup> Koch, N., Sandrin, M.S., Hammerling, G.J., Tada, N., Kimura, S., Hammerling, U. Monoclonal antibodies detect polymorphic determinants shared by I-A and I-E antigens. *Mol. Immunol.* 1984; 21(4): 293-299.
- <sup>60</sup> McNeal, M. M., Sheridan, J.F., and Ward, R.L. Active protection against rotavirus infection of mice following intraperitoneal immunization. *Virology* 1992; 191(1): 150-157.
- <sup>61</sup> Openshaw, P.J.M., Pemberton, R.M., Ball, L.A., Wertz, G.W., and Askonas, B.A. Helper T cell recognition of respiratory syncytial virus in mice. *J. Gen. Virol.* 1988; 69: 305-312.
- <sup>62</sup> Mossmann, T. Specific assays for cytokine production by T cells. *J. Immunol. Methods* 1989; 116: 151-158.
- <sup>63</sup> Milich, D.R., McLachlan, A., Thornton, G.B., and Hughes, J.L. Antibody production to the nucleocapsid and envelope of the hepatitis B virus primed by a single synthetic T cell site. *Nature* 1987; 329: 547-549.
- <sup>64</sup> Scherle, P.A., and Gerhard, W. Differential ability of B cells specific for external vs internal influenza virus proteins to respond to help from influenza virus-specific T-cell clones *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1988; 85: 4446-4450.
- <sup>65</sup> Trowbridge, I., Hyman R., Mazauskas, C. The synthesis and properties of T25 glycoprotein in Thy- 1 negative mutant lymphoma cells. *Cell* 1978; 14: 21-22.

## Bibliografía

---

- <sup>66</sup> Burkhart, C., Freer, G., Castro, R., Adorini, L., Wiesmuller, K.H., Zinkernagel, R.M., and Hengartner, H. Characterization of T helper epitopes of the glycoprotein of vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* 1994; 68(3): 1573-1580.
- <sup>67</sup> Muir S., Bittle, J. and Seraba, D. Identification of Mengo virus T helper cell epitopes. *J. Gen. Virol.* 1994; 75: 2925-2936.
- <sup>68</sup> Coligan, J.E., Shevach, E., Strober W. Quantitation of functional T cells by limiting Dilution. In *Current protocols in Immunology* (Coico, R. editor) 1994; tomo 1: secc. 3.15.1
- <sup>69</sup> Gao, M.X., Liew, F.Y., and Tite, J. P. Identification and characterization of T helper epitopes in the nucleoprotein of Influenza A virus. *J. Immunol.* 1989; 143: 3007-3014.
- <sup>70</sup> Dunn, S.J., Cross, T.L. and Greenberg, H.B. Comparison of the rotavirus nonstructural protein NSP1(NS53) from different species by sequence analysis and northern blot hybridization. *Virology* 1994; 203: 178-183
- <sup>71</sup> McNeal, M.M., Barone, K. S., Rae, M. N., and Ward, R. L. Effector functions of antibody and CD8+ cells in resolution of rotavirus infection and protection against reinfection in mice. *Virology* 1995;214: 387-397.
- <sup>72</sup> Burns, J.W., Krishnaney, A., Rouse, V.R., Anderson, L.J., and Greenberg, H.B. Analyses of homologous rotavirus infection in the mouse model *Virology* 1995; 207: 143-153.
- <sup>73</sup> Smirnov, Y., Kapitulets, S.P., Ginevskaya, A.N.N. Effect of u.v. irradiation on rotavirus. *Acta virologica* 1991; 35: 1-6.
- <sup>74</sup> Perkins, D.L., Berriz, G., Kamradt, T., Smith, J.A., and Geftter, M.L. Immunodominance: intramolecular competition between T cell epitopes. *J. Immunol.* 1991; 146: 2137-2144.
- <sup>75</sup> Lewin, B. In *GENES*. (editor, Cell) Wiley, J. press. New York, NY. 1983; 4: 74
- <sup>76</sup> Chicz, R.M., Urban, R.G., Lane, W.S., Gorga, J.C., Stern, L.J., Vignali, D.A.A., and Strominger, J.L. Predominant naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size. *Nature* 1992; 358: 764-769.
- <sup>77</sup> Liprandi, F., Lopez, G., Rodriguez, I., Hidalgo, M., Ludert, E., and Mattion, N. Monoclonal antibodies to the VP6 of porcine subgroup I rotaviruses reactive with subgroup I and non-subgroup I non-subgroup II strains. *J. Gen. Virol.* 1990; 71: 1395-1398.

## Bibliografía

---

<sup>78</sup> Rose, G.D., Gierasch, L.M., and Smith, J.A. Turns in peptides and proteins. *Adv. Protein Chem.* 1985; 37: 1-10.

<sup>79</sup> Rammensee, H.G., Friede, T., Stevanović, S. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* 1995; 41: 178-278.

<sup>80</sup> Vignali, D.A., Strominger, J.L. Amino acid residues that flank core peptide epitopes and the extracellular domains of CD4 modulate differential signaling through the T cell receptor. *J.Exp.Med.* 1994; 179(6): 1945-1956.

<sup>81</sup> Alexander, J., Gaeta, F.C., and Colon, S.M. Functional consequences of engagement of the T cell receptor by low affinity ligands. *J. Immunol.* 1993; 150(1): 1-7