

24
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

"AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE
ANTICUERPOS MONOCLONALES NEUTRALIZANTES
CONTRA ROTAVIRUS"

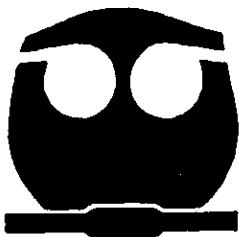
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

Q U I M I C A

P R E S E N T A

JIMENA PEREZ-VARGAS OBREGON



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

276400

1999



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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).

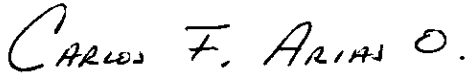
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

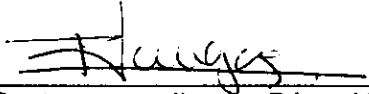
Jurado asignado:

Presidente	Prof. Agustín López-Munguía
Vocal	Prof. Homero Hernandez
Secretario	Prof. Carlos Arias Ortiz
1er. Suplente	Prof. José Pedraza Chaverrí
2o. Suplente	Prof. Marco Antonio Cerbón

Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Genética y Fisiología Molecular
Instituto de Biotecnología, UNAM.


Asesor: Dr. Carlos F. Arias Ortiz


Sustentante: Jimena Pérez-Vargas Obregón

Agradecimientos:

A Carlos y Susana por enseñarme el mundo de la virología.

A Rafaela por su ayuda que me brindo para este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

"Cuando uno sabe en sueños que sueña, está a punto de despertarse .Yo me desperté en seguida. Quizás este fuego no es otra cosa que el primer rayo de sol del amanecer de otra realidad que se cuele debajo de mis párpados cerrados."

Michael Endel

Indice

Resumen

1.Introducción	1
2.Objetivo	10
3.Material y Métodos	11
4.Resultados	20
5.Discusión	34
6.Conclusiones	40
7.Perspectivas	41
8.Bibliografía	42

Resumen

Los rotavirus son reconocidos como el principal agente etiológico de gastroenteritis viral infantil, afectando principalmente a niños menores de 3 años, así como a cachorros de diversas especies animales. Se caracterizan porque la partícula viral madura está formada por tres capas concéntricas de proteínas, que envuelve un geneoma de 11 segmentos de RNA de doble cadena. La capa externa está formada por dos proteínas, VP7 y VP4. VP4 se proyecta de la superficie en forma de espículas, es a través de ésta proteína que los virus se unen a la célula huésped.

En el caso de los rotavirus aislados de animales, como el rotavirus de simio RRV, la proteína VP4 tienen al menos dos dominios que interaccionan con receptores de la célula. El primer dominio interacciona con una molécula que contiene ácido siálico, mientras que el segundo interacciona con un receptor independiente de ácido siálico. Los datos existentes sugieren que la interacción que no depende de ácido siálico pudiera ser la responsable de determinar la susceptibilidad de la célula a ser infectada por rotavirus. Con el fin de identificar el dominio de VP4 que interacciona con el receptor independiente de ácido siálico, aislamos anticuerpos monoclonales neutralizantes contra una cepa mutante del rotavirus RRV (Nar) que no depende de ácido siálico para infectar a la célula, con el propósito posteriormente de mapear el sitio de unión de estos anticuerpos. En principio el sitio de unión en VP4 de un anticuerpo que inhiba la adsorción del virus a la célula, identificará el dominio de la proteína responsable de interaccionar con el receptor.

Para obtener los hibridomas se utilizaron células de bazo de un ratón inmunizado con el rotavirus Nar. Se seleccionaron 13 hibridomas (de un total de 500), por ensayos de ELISA y por su capacidad para neutralizar e inhibir la hemaglutinación del mismo virus. Seis anticuerpos monoclonales presentaron actividad neutralizante contra Nar y los seis reconocieron la proteína VP4. Dos anticuerpos monoclonales neutralizaron de manera diferencial al virus Nar con respecto a RRV, mientras los otros cuatro lo hicieron con títulos similares.

1.INTRODUCCION

Los rotavirus son reconocidos como el principal agente etiológico de gastroenteritis no bacteriana en niños menores de 3 años, causando diarrea severa y en casos extremos la muerte. También afecta a cachorros de diversas especies animales, de relevancia económica para el hombre (3, 25).

Los rotavirus están clasificados dentro de la familia *Reoviridae*. La partícula viral madura tiene una cápside icosaédrica de 75 nm de diámetro, la cual está constituida por tres capas concéntricas de proteínas que envuelven un genoma de once segmentos de doble cadena de RNA (40). El genoma codifica para seis proteínas estructurales y cinco no estructurales (15)(Fig1).

♦ESTRUCTURA

La capa externa está formada por dos proteínas: la glicoproteína VP7, que es la segunda más abundante de la cápside (15), y la proteína VP4, la cual se estructura como 60 dímeros en forma de espículas que se proyectan de la superficie de la partícula (37). VP6, la proteína más abundante en el virión, se encuentra formando trímeros y constituye la capa

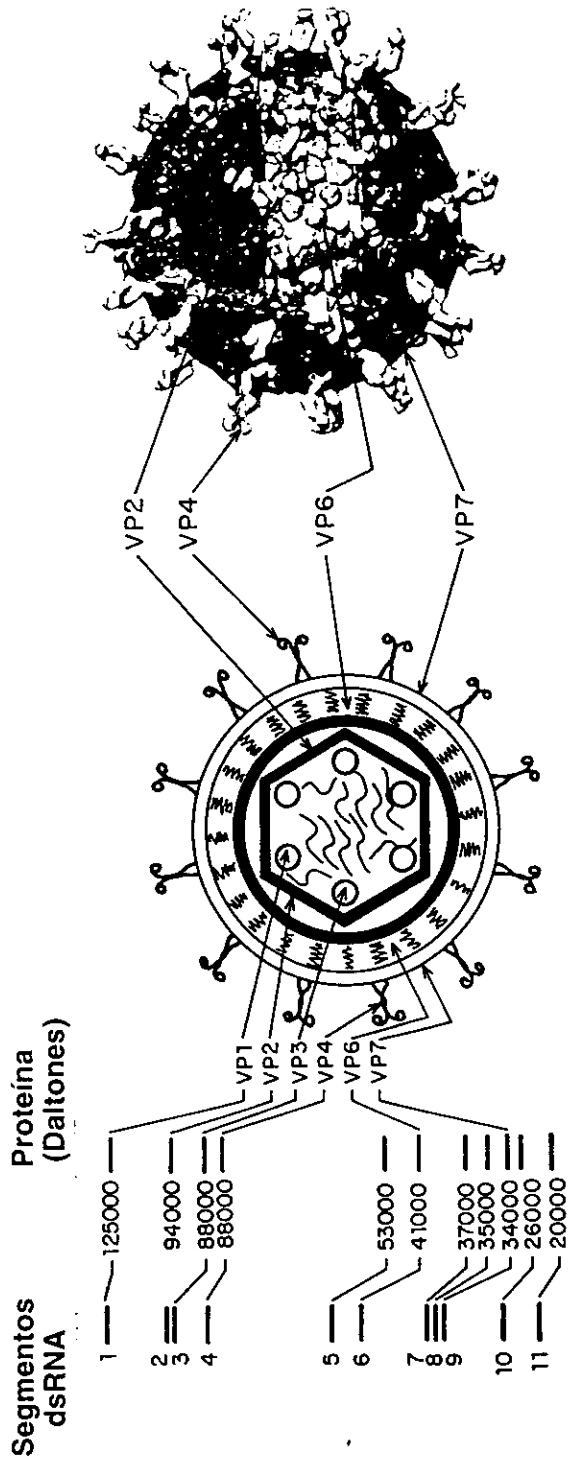


Fig. 1. Representación esquemática de un rotavirus. Se muestra en el extremo izquierdo un patrón electroforético de los once segmentos de dsRNA del genoma viral y las proteínas para las que codifica. En el centro se muestra la localización de las proteínas en la estructura del virión y en el extremo derecho la figura tridimensional del virión en criomicroscopía electrónica (15).

intermedia (11). El core viral, la capa más interna de proteínas, constituida por VP2, que interacciona en su cara interna con las proteínas VP1 y VP3, y rodea el genoma del virus. Las proteínas VP1 y VP3 se han identificado como la RNA polimerasa y guanil transferasa del virus, respectivamente (Fig. 1).

Otras proteínas que no forman parte de la partícula madura se les conoce como proteínas no estructurales y participan en los procesos de replicación del genoma viral, así como en el ensamblaje del virión (4, 16).

♦INFECCION VIRAL

Una infección viral se da cuando un virus transfiere su material genético a la célula huésped y el virus es replicado. La infección ocurre en tres etapas: la adsorción, cuando la partícula viral se une a través de una de sus proteínas a una molécula que funge como receptor en la superficie celular. La penetración, que puede ser por endocitosis o por penetración directa a nivel de la membrana plasmática (24) y el desnudamiento del genoma del virus. En el caso de los rotavirus estos entran a la célula huésped por penetración directa; también hay evidencias que el virus puede entrar por endocitosis, sin embargo esta vía de entrada parece no dar una infección productiva. En los rotavirus, al momento que se da la penetración, el virus pierde la capa externa formada por las proteínas VP7 y VP4 (16). Este paso activa la transcripción del genoma viral, produciéndose los mRNAs del virus, e iniciándose así el ciclo de replicación del material genético del virus.

•PROTEINAS DE LA CAPA EXTERNA

VP7 que constituye el 30% de las proteínas del virión, es inmunogénica y es el mayor antígeno de neutralización que tiene el virus, ya que tiene un dominio inmunodominante que induce anticuerpos neutralizantes que reaccionan en una infección por rotavirus con altos títulos de neutralización (15,25,38). Estos anticuerpos neutralizan a la población viral en un paso posterior a la adsorción, ya que no son capaces de inhibir la unión del virus a la célula (39).

La proteína VP4 participa en la adsorción y penetración del virus a la célula huésped. Se sabe que es VP4 la responsable de la adsorción, porque en rotavirus de triple capa que no tienen VP4 no son capaces de unirse a la célula (16). Además, a diferencia de los anticuerpos anti-VP7, los anticuerpos anti-VP4 tiene la capacidad de inhibir la unión del virus a la superficie celular.

Para poder ingresar al citoplasma celular, los rotavirus necesitan haber sido tratados previamente con tripsina. Si este tratamiento no ocurre, los virus son capaces de unirse a la célula, pero no de penetrar a su interior (1). Se ha descrito que la tripsina provoca un corte proteolítico en VP4 generando dos polipéptidos, VP8 (28kDa, aa1-321 de VP4) y VP5 (60kDa, aa 242-776 de VP4), que representan respectivamente los extremos amino y carboxilo terminal de ésta proteína (1). El corte en VP4 se correlaciona con el aumento en la infectividad del virus causado por la tripsina, que al parecer se da por una modificación de la proteína en donde se expone una región que antes no estaba expuesta. Se ha propuesto que es a través de ésta

región de VP5 que se da una interacción del virus con la membrana celular, que induce la penetración del virus a la célula huésped (2).

Al igual que VP7, VP4 también es capaz de inducir anticuerpos que neutralizan la infección del virus. En el caso del rotavirus RRV de simio, los anticuerpos dirigidos contra VP8 neutralizan la infección del virus, bloqueando su unión a la célula huésped, mientras que los anticuerpos dirigidos contra VP5 lo neutralizan en un paso posterior a la unión (39). El hecho de que la infección de RRV pueda ser bloqueada en diferentes niveles por anticuerpos dirigidos contra diferentes regiones de la proteína, apunta a que VP4 está involucrada en los eventos tanto de adsorción como de penetración del virus a la célula huésped.

La proteína VP4 ha sido también identificada como la hemaglutinina viral (17, 31) ya que cuando es expresada en baculovirus, VP4, tiene la capacidad de aglutinar eritrocitos sin ayuda de ninguna otra proteína del virus. Esta proteína tiene un dominio que interacciona con residuos de ácido siálico, que es el responsable de la actividad hemaglutinante del virus, ese dominio se encuentra entre los aminoácidos 93 y 208, del extremo amino de VP4. Mientras que los aminoácidos 155, 188 y 190 son los responsables de la interacción con el ácido siálico (31,19).

♦INTERACCION CON RECEPTORES CELULARES

Comparando las secuencias de aminoácidos de las VP4s provenientes de diferentes cepas de rotavirus, se ha observado que las regiones conservadas de la proteína están localizadas en VP5, mientras que en

VP8 hay una mayor variación, teniendo una región hipervariable en los aminoácidos 71 a 204 (29). Se han mapeado los sitios de interacción de VP4 con anticuerpos monoclonales y se ha encontrado que algunos sitios en VP8 están asociados con la neutralización específica de cepa, mientras que en VP5 se presentan actividades de neutralización cruzada con otras cepas (39). En el caso de los rotavirus aislados de animales, como el rotavirus RRV de simio, VP4 tiene al menos dos dominios de interacción con los receptores celulares que interaccionan con la célula aparentemente de manera secuencial; el primero interacciona con una molécula que contiene ácido siálico, mientras que el segundo interacciona con un receptor independiente de ácido siálico (Fig. 2)(32). Por lo que el tratamiento de las células con neuraminidasa, enzima que retira los ácidos siálicos de la superficie celular, inhibe de manera pronunciada la infectividad del virus RRV.

La segunda interacción, independiente de ácido siálico parece ser más específica que la primera dependiente de esos carbohidratos, ya que se ha visto que los rotavirus aislados de animales se unen a una gran variedad de células; sin embargo, sólo son capaces de penetrar y llevar a cabo una replicación productiva, en células de origen epitelial renal e intestinal. Esto sugiere que la segunda interacción pudiera ser la responsable, cuando menos en algunos casos, de determinar la susceptibilidad de la célula de ser infectada por rotavirus (Fig. 2).

♦ROTAVIRUS NAR

Recientemente se aisló una cepa mutante del rotavirus RRV (llamada Nar), cuya infectividad no requiere de la presencia de ácido siálico en la superficie celular, sin embargo, esta cepa conserva su capacidad de aglutinar eritrocitos a través de interaccionar con residuos de ácido siálico (32, 33). Esto indica que el virus Nar aún conserva su dominio de unión a estos azúcares, pero no requiere de ésta interacción para unirse a la célula (Fig. 2). A diferencia del virus silvestre, los anticuerpos dirigidos contra la proteína VP5 de rotavirus neutralizan la infección del virus mutante Nar a través de inhibir su unión a la célula; mientras que los anticuerpos dirigidos contra VP8 no son neutralizantes para Nar, aunque si se unen al virus. Esto indica que los anticuerpos anti-VP4 tienen diferentes mecanismos para neutralizar la infectividad de la cepa silvestre RRV o la mutante Nar.

A través de un mapeo genético, se determinó el fenotipo de independencia del ácido siálico que presenta el virus Nar, el cual se determina con el gene de VP4 (33). Una comparación de secuencias del gene de VP4 de Nar, con la del virus silvestre RRV, así como con la de algunos virus revertantes, mostró que una mutación Lis→Arg en la posición 187 de VP4 es la responsable del fenotipo independiente de ácido siálico. (33).

Los resultados mencionados sugieren que la proteína VP4 de la variante Nar presenta una diferencia conformacional en relación a la proteína de RRV, la cual le permite interaccionar directamente con la superficie celular en ausencia de ácido siálico. Suponemos que en la proteína VP4 de Nar hay un dominio expuesto, que no esta presente en la

proteína de RRV, responsable de la interacción con el carbohidrato. Para localizar ese dominio en VP4, nos propusimos inducir anticuerpos neutralizantes contra el virus Nar, con la idea de que alguno de los anticuerpos inducidos podría ir dirigido contra ese dominio. Estos anticuerpos debieran de neutralizar de forma diferencial al virus mutante Nar y al silvestre RRV.

MODELO DE LAS PRIMERAS INTERACCIONES ROTAVIRUS - CELULA

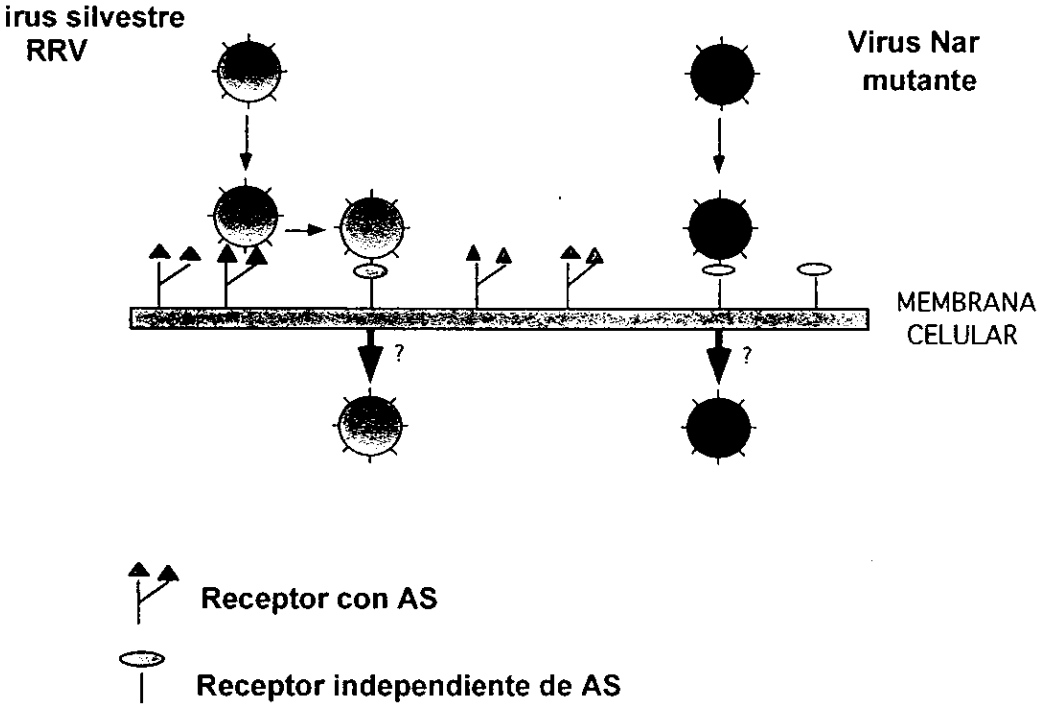


Fig. 2.

2.OBJETIVOS

2.1.Generales

Aislar y caracterizar anticuerpos monoclonales neutralizantes contra la cepa de rotavirus Nar, que presenten diferencias de neutralización entre el virus silvestre RRV y el mutante Nar.

2.2.Específicos

1)Aislar anticuerpos monoclonales que tengan la capacidad de neutralizar la infección del virus Nar en células en cultivo.

2)Determinar si los AcM son capaces de inhibir a no la hemaglutinación del virus silvestre RRV y el mutante Nar.

3)Identificar la proteína que reconocen cada uno de los anticuerpos aislados.

3.MATERIALES Y METODOS

3.1 Producción de Anticuerpos Monoclonales

3.1.1 Inmunización

Tres ratones Balb/c fueron inmunizados tres veces por vía intraperitoneal con 20 µg de proteína viral y adyuvante incompleto de Freund's al 50%, con un intervalo de quince a veinte días entre cada inmunización. Se utilizó como antígeno al virus Nar semipurificado (sedimentado a través de un colchón de sacarosa al 30% en buffer TMSC [Tris-base 20 mM, MgCl₂·6H₂O 1 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 10 mM]).

Después de la tercera inmunización se hizo un ensayo de ELISA (ver en la sección 3.1.3.3, pag. 15) para probar la reactividad de los sueros hiperinmunes contra el virus, y compararla con los sueros preinmunes. El ensayo se hizo probando diferentes diluciones (dobles recíprocas) de los sueros pre e hiperinmune de cada ratón inmunizado, con una concentración constante de virus Nar (4.27 µg/ml). Con base en estos datos se seleccionó al ratón que sería utilizado para la fusión y al cual se le dió un reto por vía intravenosa con la misma cantidad de antígeno (20 µg) sin adyuvante, cuatro días antes de la fusión.

3.1.2 Fusión.

Las células de bazo del ratón inmunizado se fusionaron con células de mieloma (Fox) en una relación de 4:1 (4 células de bazo por 1 del mieloma), usando polietilenglicol como agente fusionante (35). Las células se resuspendieron en medio selectivo AAT (DMEM [Medio Eagle Modificado por Dulbecco, con glucosa al 4.5%, L-glutamina 0.03% y piruvato de sodio, GIBCO], suero fetal de bovino al 15%, penicilina/estreptomicina 0.01%, adenina, aminopterina y timidina al 0.5%). En este medio crecieron únicamente las células que sí se fusionaron. Las células de bazo no pueden crecer en cultivo, mientras que las células del mieloma tienen un defecto en una enzima que afecta la vía de "salvación" en la síntesis de nucleótidos, por lo que sólo funciona la vía de síntesis *de novo*. Como el medio contiene aminopterina, compuesto que bloquea la síntesis *de novo* de nucleótidos, las células parentales del mieloma no pueden crecer en el medio selectivo. Por esta razón sólo las células fusionadas son capaces de crecer en el medio selectivo AAT. Las células fusionadas se colocaron a una densidad de 1.7×10^6 células/pozo en cajas de 96 pozos (200 μ l/pozo), y se mantuvieron a 37°C con 8% de CO₂ y 95% de humedad (35).

3.1.3 Selección.

La selección de los hibridomas de interés (los que tienen la capacidad de neutralizar la infectividad del virus Nar) se realizó de 10 a 15 días después de la fusión, utilizando los siguientes tres ensayos.

3.1.3.1 Ensayo de neutralización de la infectividad de Nar.

La infectividad del virus se activa al tratarlo con tripsina (10 µg de tripsina/ml de virus) durante 30 min a 37°C. El virus activado (50 µl) se incubó por 1h a temperatura ambiente con 50 µl del sobrenadante de los hibridomas que crecieron de la fusión. Por otro lado las células epiteliales de riñon de mono MA104 se lavaron con medio MEM (Medio Esencial Mínimo, GIBCO) sin suero, y se incubaron 1h a 37°C con la mezcla virus-AcM. Posteriormente la mezcla de virus-anticuerpo se retiró, las células se lavaron e incubaron a 37 °C en presencia de 5% de CO₂ durante 12 h. Después de este tiempo, las células se fijaron con acetona al 80% por 30 min a temperatura ambiente, se les agregó un anticuerpo anti-rotavirus (RαR diluido 1:1000 en PBS [NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄·7H₂O 4.3 mM y KH₂PO₄ 1.4 mM]) y se incubaron 1h a 37°C. Finalmente se agregó proteína A peroxidasa (Amersham) diluida 1:2500 en PBS, se incubó 1h a 37°C, y se reveló con carbazole (4 ml solución amortiguadora de acetatos 0.5 M, 1.5 ml de carbazole [0.8 g/200 ml de dimetilformamida] y 10 µl de H₂O₂). Después de cada incubación las células se lavaron dos veces con PBS.

El título de neutralización de los anticuerpos se definió como la dilución más alta del sobrenadante de células o de líquido de ascitis (ver adelante) que inhibe el 60% del número de células infectadas (focos infecciosos) por el virus.

3.1.3.2 Ensayo de Titulación de la Hemaglutinación.

Inicialmente se determinó el título de hemaglutinación del virus, utilizando placas de 96 pozos de fondo en V y eritrocitos de humano tipo O positivo. Se hicieron diluciones dobles del virus (empezando 1:50) en albumina de suero fetal de bovino (BSA) en PBS al 0.125%. Posteriormente se agregaron a cada pozo 50 µl de eritrocitos al 0.4%

en BSA/PBS al 0.125% y se incubaron por 1h a temperatura ambiente. Después de este tiempo se registraron los resultados del título de hemaglutinación, que es la dilución más alta del virus en la cual no se observa un botón en el fondo del pozo, resultado de la sedimentación de los eritrocitos que no aglutinan (19, 23).

3.1.3.3 Ensayo de Inhibición de la hemaglutinación

Se incubaron durante 1h a temperatura ambiente 16 unidades hemaglutinantes del virus (título de HA/16) con un volumen igual (25 μ l) del sobrenadante diluido de los hibridomas 1/5 en BSA/PBS al 0.125%. Posteriormente se agregaron a cada pozo 50 μ l de eritrocitos al 0.4% y se incubaron durante 1h a temperatura ambiente.

El título de inhibición de la hemaglutinación es la dilución más alta a la cual el anticuerpo bloquea la hemaglutinación producida por el virus (19).

3.1.3.4 Ensayo de ELISA.

Se sensibiliza una placa de 96 pozos (Costar 3791), con 50 μ L de una dilución 1:2000 en PBS, de un anticuerpo policlonal dirigido contra el rotavirus YM (α YM). Posteriormente la placa fue bloqueada al incubar por 2h a 37°C con 200 μ L de 1% BSA en PBS, en cada pozo y después de este tiempo se adicionaron 50 μ l (40 μ g) del virus Nar como antígeno y la placa fue incubada por 1h a 37°C. Posteriormente se agregaron 50 μ l del sobrenadante de los hibridomas, se incubó 1h a 37°C, y se adicionan 50 μ l del anticuerpo anti-inmunoglobulinas de ratón marcado con la peroxidasa, y se incubó nuevamente 1h a 37°C. Entre cada incubación los pozos fueron lavados dos veces con PBS. Finalmente, se agregó el sustrato de la peroxidasa (50 μ L de una solución que contiene 1 mg/ml de o-fenilenediamina y 4 μ l

de H_2O_2 /10ml de buffer de citratos 0.1 M, pH 4.5) y después de 10 min se paró la reacción con 100 μL de H_2SO_4 1 N. Se leyó la absorbancia a 490 nm.

3.2. Producción y caracterización de los anticuerpos monoclonales

3.2.1 Clonación.

Una vez seleccionados los hibridomas de interés, se clonaron tres veces para asegurar que los anticuerpos monoclonales sean generados a partir de un hibridoma homogéneo. Para ello, las células de los hibridomas se transvasaron de los frascos de cultivo a un tubo, se centrifugaron 5 min a 1200 rpm y se resuspendieron en 1 ml de DMEM sin suero. Las células se tiñeron con azul de tripano, se contaron y se ajustó la densidad a 0.3 célula por cada pozo de la placa de 96 pozos. Después de 10 ó 15 días de crecimiento, se confirmó la especificidad de los anticuerpos monoclonales secretados por las colonias que crecieron, utilizando los mismos ensayos que se usaron para la selección (sección 3.1.3, pag. 12-14). Este proceso se repitió tres veces para cada hibridoma (35).

3.2.2 Producción de líquido de ascitis.

Las células de los hibridomas se transfirieron a un tubo y se centrifugaron por 5 min a 1000 rpm, se lavaron dos veces con DMEM sin suero y se resuspendieron en 1 mL para contar las células y ajustar la densidad del inóculo a 2×10^6 células/mL.

Cada uno de tres ratones Balb/C de 6 a 8 semanas de edad recibió por vía intraperitoneal 500 μl de pristán (2,6,10,14-tetrametilpentadecano, Sigma). Después de 5 a 10 días, los ratones fueron inoculados intraperitonealmente con 2×10^6 células

de un hibidoma previamente clonado y confirmada su especificidad. Después de 10 a 15 días de la inoculación el líquido de ascitis se colectó por punción. Una vez colectado, el líquido de ascitis se centrifugó por 5 min a 2000 rpm para quitar los restos celulares, los lípidos o las trazas de pristán que pudieron contener.

3.3 Caracterización de los anticuerpos monoclonales

Con los líquidos de ascitis se hizo la caracterización de los anticuerpos: los títulos de neutralización y de inhibición de la hemaglutinación, así como diferentes ensayos para saber que proteína están reconociendo. Todos los ensayos se hicieron utilizando el virus mutante Nar y el silvestre RRV.

3.3.1 Ensayos de Neutralización de la infectividad y de inhibición de la hemaglutinación.

Estos ensayos son similares a los descritos en la sección de selección (sección 3.1.3.3, pag 14), con la diferencia de que se utilizaron diferentes diluciones del líquido de ascitis de cada anticuerpo monoclonal, en lugar de sobrenadante de los hibridomas. Además se hizo tanto con el virus mutante (Nar) como con el silvestre (RRV).

3.3.2 Identificación de la proteína que reconocen los anticuerpos monoclonales.

Se probaron diferentes ensayos con todos los anticuerpos, comparando siempre con un anticuerpo policlonal α Nar como control.

3.3.2.1 Inmunoprecipitación.

Se incubaron a temperatura ambiente por 1h 20 μ l de un lisado de células Ma104 infectadas con Nar, marcado radiactivamente con ^{35}S (Nar ^{35}S), con 5 μ l del anticuerpo monoclonal y 75 μ l de amortiguador RIPA (tris 50 mM pH 8.0, tritón X-100 1%, SDS 0.1%, desoxicolato de sodio 1% y NaCl 150 mM). La mezcla se centrifugó 3 min a 14000 rpm y el sobrenadante se transvasó a un tubo nuevo, se le agregaron 25 μ l de proteína A-sefarosa al 50% en PBS y la mezcla se incubó con agitación 1h. Posteriormente, la sefarosa se lavó 2 veces con 1 mg/ml de BSA/RIPA y una tercera solo con RIPA, centrifugando 2 min a 6000 rpm entre cada lavado. Finalmente el sedimento se resuspendió en 25 μ l del amortiguador para la muestra (tris 100 mM pH 6.8, SDS 4%, azul de bromofenol 0.2%, glicerol 20% y 10 μ l/ml de β -mercaptoetanol). Las muestras se hirvieron por 2 min, se centrifugaron 1 min a 14000 rpm, y las proteínas presentes en las muestras se separaron en un gel de poliacrilamida al 11%, a una corriente constante de 12 mA. Después de finalizar la electroforesis el gel se fijó a temperatura ambiente por 90 min con metanol y ácido acético, ambos al 10%, posteriormente se lavó 3 veces con agua, y se incubó 15 min con ácido salicílico 1 M. Finalmente, el gel se secó a 80 $^{\circ}\text{C}$ durante 20 min y se colocó sobre una placa fotográfica (Kodak) a -70 $^{\circ}\text{C}$.(21)

3.3.2.2 Inmunopurificación en fase sólida.

En una placa para ELISA de 96 pozos (Costar 3791), se colocaron 50 µl de una dilución 1:10 del anticuerpo y se incubaron toda la noche a 4°C. Después se bloqueó con 200 µl de gelatina al 1% en PBS por 2h a 37°C, lavando entre cada paso 3 veces con PBS. Posteriormente se adicionaron 50 µl de lisado de Nar-S³⁵ y se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavaron cuatro veces con amortiguador de lavado (SDS 0.01%, deoxicolato de sodio 1%, NP40 1% y azida de sodio 0.6% en PBS), se adicionaron 50 µl de amortiguador de muestra (SDS 1%, urea 0.5M, tris/HCl 0.05M, glicerol 10%, rojo de fenol 0.025%, mercaptoetanol 10%) y se hicieron por 3 min. Las muestras se corrieron en un gel de poliacrilamida al 11%. El gel se trató como se describió anteriormente (sección 3.3.2.1, pag. 17), para finalmente colocarlo sobre una placa fotográfica a -70°C (41).

3.3.2.3 Ensayos de neutralización con virus rearreglantes.

Los ensayos de neutralización se realizaron de la misma forma que los ensayos de inhibición de la infectividad que se mencionaron en la parte de la selección de los hibridomas (sección 3.1.31, pag 13). La diferencia es que las proteínas de la capa externa, VP4 y VP7, de los virus rearreglantes que se utilizan en estos ensayos son derivadas de diferentes cepas de rotavirus.

➤ Los virus rearmados que se utilizaron son:

-DS1XRRV, que tiene VP7 de la cepa humana DS1 y VP4 de la cepa de simio RRV.

-RRVXYM, que tiene VP7 de RRV y VP4 de la cepa porcina YM.

La identidad y especificidad de los virus rearmados se confirmó utilizando anticuerpos monoclonales específicos de cepa contra las proteínas VP4 y VP7.

4. RESULTADOS

4.1 Generación y Selección de los Anticuerpos Monoclonales

El nivel de anticuerpos inducido en los animales inmunizados se caracterizó con un ensayo de ELISA, utilizando el virus completo como antígeno. La figura 3 muestra que los tres ratones inmunizados respondieron de manera similar al antígeno Nar. Con base en estos resultados, se fusionó el bazo de uno de los ratones (ratón 2) con células del mieloma (Fox), y las células resultantes de la fusión se crecieron en un medio selectivo (AAT), en el cual pueden crecer únicamente las células fusionadas (sección 3.1.2, pág. 12).

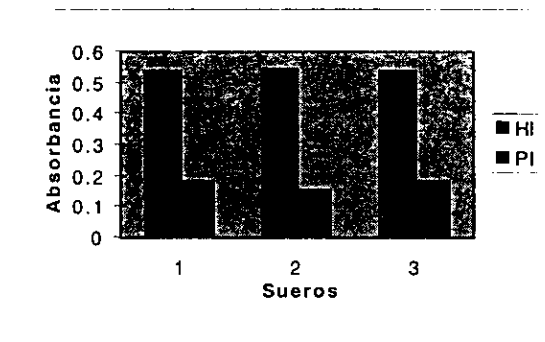


Fig3. Ensayo de ELISA con los sueros pre (PI) e hiperinmune (HI) de los 3 ratones inmunizados. Se utilizaron diferentes diluciones de sueros. En esta figura se muestran los resultados de una dilución de 1:100 para los dos tipos de sueros.

Dado que el objetivo de este trabajo fue generar anticuerpos con actividad neutralizante contra la cepa de rotavirus Nar, los hibridomas de interés se seleccionaron utilizando tres ensayos diferentes:

1) Ensayo de neutralización, el cual nos permite identificar anticuerpos que tengan la capacidad de neutralizar la infección viral.

2) Inhibición de la hemaglutinación (IHA). Sólo anticuerpos dirigidos contra VP4 y VP7 son capaces de inhibir la hemaglutinación, y en general se ha encontrado que estos anticuerpos tienen actividad neutralizante. Este ensayo es también conveniente porque es más sencillo de realizar que el de neutralización.

3) Ensayo de ELISA con el virus completo, el cual nos permite detectar anticuerpos que vayan dirigidos contra cualquiera de las proteínas del virus. Esto nos permite, además de seleccionar anticuerpos monoclonales contra VP4 y VP7, seleccionar anticuerpos monoclonales con otra especificidad, que son de interés para otro proyecto de nuestro grupo. En todos los ensayos se usaron como controles los sueros pre e hiperinmunes de los ratones.

De aproximadamente 500 hibridomas analizados de una sola fusión, se seleccionaron once que secretaron anticuerpos que reaccionaron con el virus Nar por al menos uno de los tres métodos utilizados. La tabla 1 muestra las características de estos once anticuerpos monoclonales (AcM).

Tabla 1. Selección de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el rotevirus Nar

AcM	Neutralización*	IHA	ELISA
N1	-	-	+
N2	-	-	+
N3	-	-	+
N4	+	-	+
N5	-	-	+
N6	+	-	+
N7	+	+	-
N8	+	+	-
N9	+	-	-
N10	+	-	-
N11	-	-	+

*Se considera una neutralización positiva cuando se observa una disminución de al menos 40% del número de focos infecciosos. Cada ensayo es un promedio de tres experimentos diferentes.

4.2 Caracterización de los Anticuerpos Monoclonales

De acuerdo al objetivo central de este trabajo, se seleccionaron los anticuerpos de los hibridomas N4, N6-N10 para caracterizarlos más detalladamente ya que mostraron capacidad de inhibir la infectividad del virus.

Los seis hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales neutralizantes se clonaron tres veces cada uno, para asegurar que el crecimiento y la secreción del anticuerpo fueran a partir de una sola célula. Después de la tercera clonación, se produjo líquido de ascitis en ratones, con cada uno de estos hibridomas, para generar anticuerpos monoclonales a una concentración mayor que la obtenida en el sobrenadante del medio de cultivo de los hibridomas primarios. Se caracterizó tanto la capacidad de los anticuerpos monoclonales para neutralizar la infectividad tanto del virus silvestre RRV como del mutante Nar, como de inhibir la hemaglutinación de ambos virus. Se determinó también, la proteína viral que reconocen, utilizando tres diferentes métodos (ver adelante).

4.2.1 Inhibición de la Infectividad

El título de neutralización de cada anticuerpo monoclonal, definido como la dilución más alta del anticuerpo a la que inhibe el 60% de los focos infecciosos de un virus control no incubado con anticuerpo, se calculó gráficamente. Las curvas de neutralización para cada anticuerpo se muestran en las figuras 4 a 6, y en la tabla 2 se presentan los títulos de neutralización de cada anticuerpo monoclonal para los virus probados.

Cuatro de los anticuerpos monoclonales (N7 a N10) no mostraron una diferencia significativa en el título de neutralización obtenido para Nar y RRV, ya que la variabilidad experimental que se ha observado en el laboratorio para este ensayo es de dos veces. En contraste con esos resultados, los otros dos anticuerpos neutralizan de 6 (N6) a 32 (N4) veces más eficientemente a Nar que a RRV.

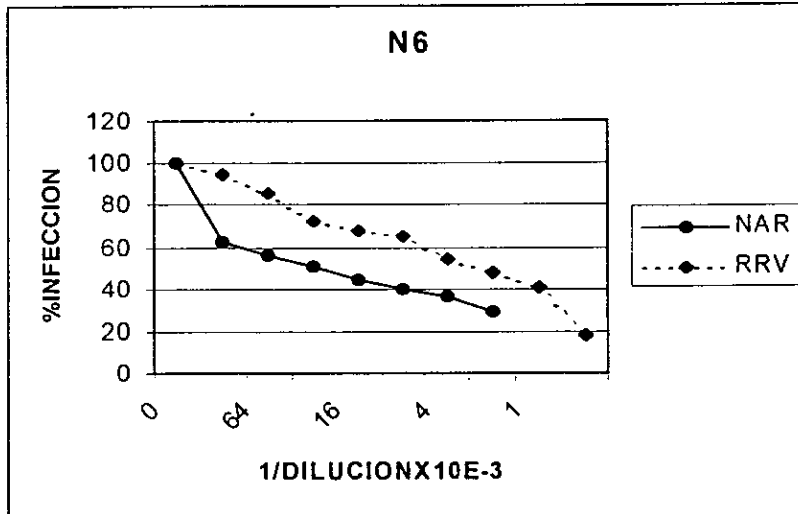
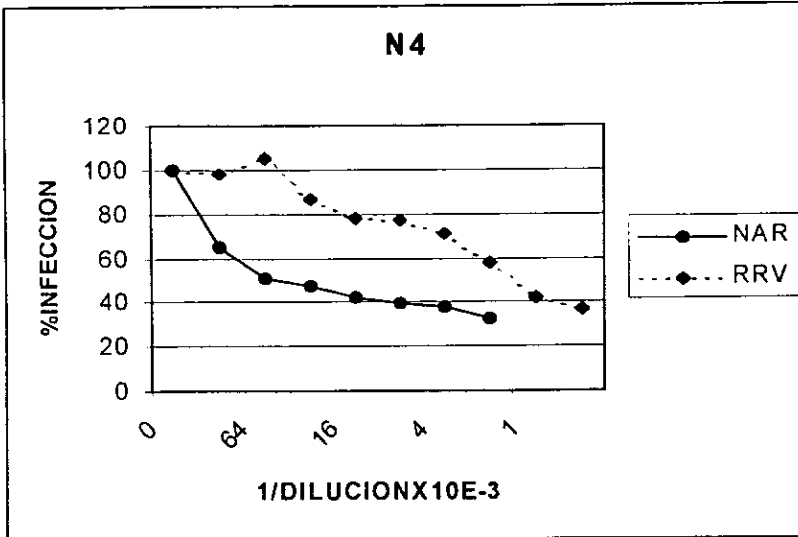


Fig. 4. Ensayos de inhibición de la infectividad. En la gráfica se muestra el porcentaje de infección vs el inverso de la dilución del anticuerpo. Las diferentes diluciones de anticuerpos se incuban con 500 focos infecciosos del virus. La mezcla de virus-AcM se añade posteriormente sobre una monocapa de células MA104 para determinar el número de virus que no fueron neutralizados por el anticuerpo.

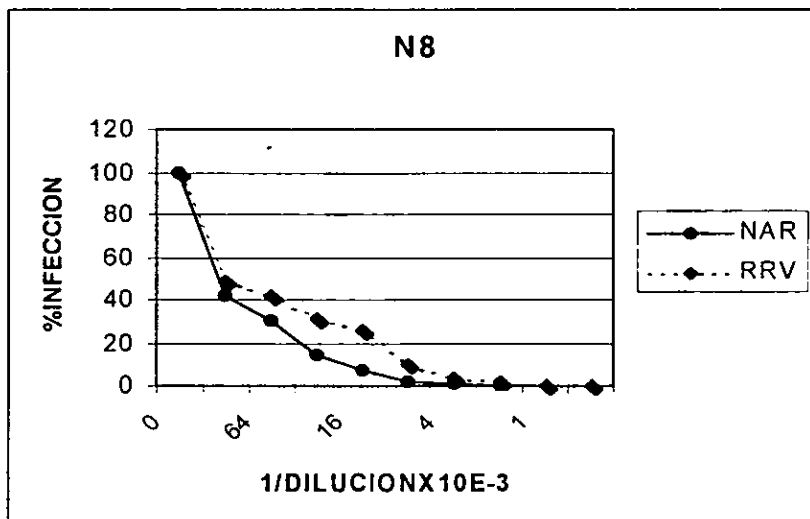
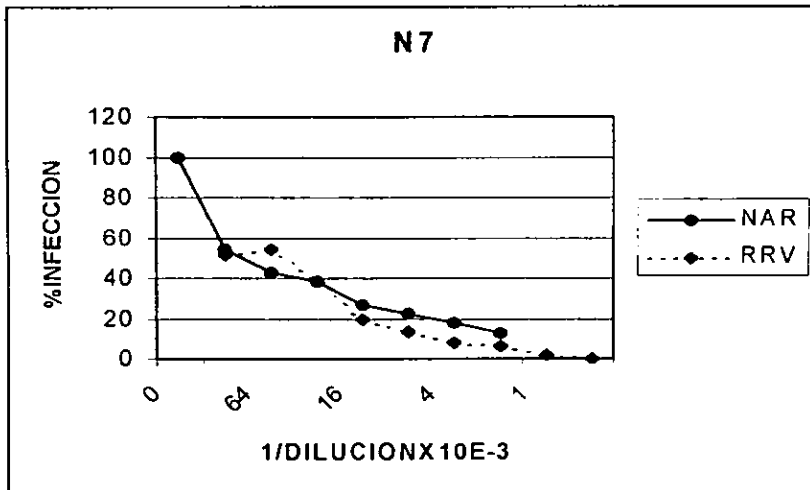


Fig. 5. Ensayos de inhibición de la infectividad. En la gráfica se muestra el porcentaje de infección vs el inverso de la dilución del anticuerpo. Las diferentes diluciones de anticuerpos se incuban con 500 focos infecciosos del virus. La mezcla de virus-AcM se añade posteriormente sobre una monocapa de células MA104 para determinar el número de virus que no fueron neutralizados por el anticuerpo.

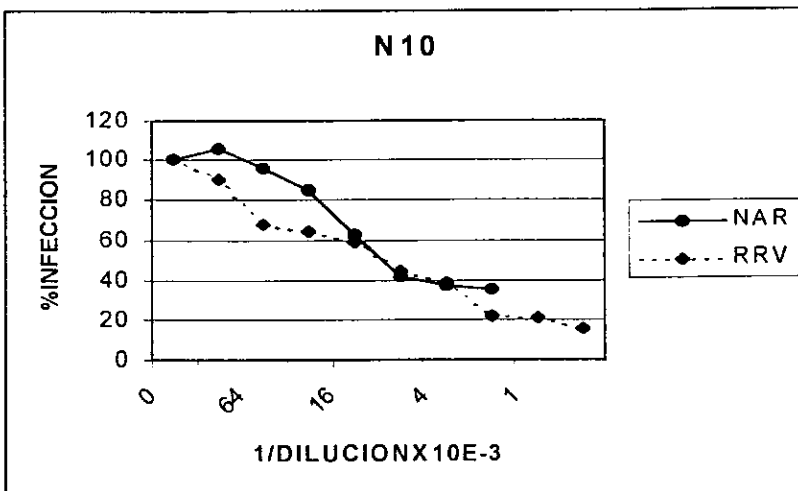
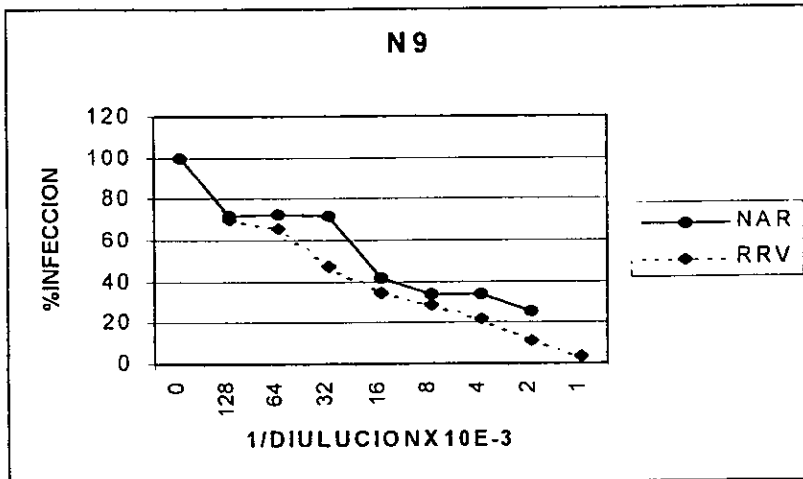


Fig. 6. Ensayos de inhibición de la infectividad. En la gráfica se muestra el porcentaje de infección vs el inverso de la dilución del anticuerpo. Las diferentes diluciones de anticuerpos se incuban con 500 focos infecciosos del virus. La mezcla de virus-AcM se añade posteriormente sobre una monocapa de células MA104 para determinar el número de virus que no fueron neutralizados por el anticuerpo.

Tabla 2. Titulod de neutralización de los anticuerpos monoclonales

AcM	Títulos de Neutralización	
	NAR	RRV
N4	1:16000	1:500
N6	1:10000	1:1500
N10	1:6000	1:4000
N8	1:74000	1:47000
N7	1:39000	1:39000
N9	1:8000	1:19000

Todos los resultados son promedio de 2 experimentos.

Los títulos de neutralización variaron también entre los diferentes anticuerpos monoclonales, para un determinado virus. Así, N4 tuvo un título de neutralización aproximadamente 100 veces menor que N8 para RRV, mientras que N8 fue aproximadamente 10 veces más efectivo para neutralizar a Nar que el anticuerpos monoclonales N10. Sin embargo, estos resultados son difíciles de interpretar ya que no conocemos la concentración de los anticuerpos monoclonales en los diferentes líquidos de ascitis.

4.2.2 Inhibición de la Hemaglutinación

La mayoría de los rotavirus de origen animal, no humano, tienen la capacidad de aglutinar eritrocitos de humano tipo O a través del dominio de unión a ácido siálico, localizado en la subunidad VP8 de la proteína VP4 (23). Como se mencionó en la introducción, tanto el virus silvestre RRV como el mutante Nar son capaces de hemaglutinar, lo cual nos permite comparar la actividad de inhibición de la

hemaglutinación de los anticuerpos monoclonales contra las dos cepas, y así definir posibles diferencias en sus patrones de reactividad.

Para caracterizar la actividad de inhibición de los anticuerpos monoclonales, primero se determinó el título de hemaglutinación de los virus Nar y RRV. En ambos casos el título encontrado fue 1:1600. El título de hemaglutinación, definido como la dilución más alta de anticuerpo capaz de inhibir la hemaglutinación producida por el virus, se considera como 1 unidad hemaglutinante. Para los ensayos de inhibición de la hemaglutinación se incuban 16 unidades hemaglutinantes de cada virus con diluciones seriadas de los anticuerpos monoclonales y esta mezcla virus-anticuerpo se pone posteriormente en contacto con los eritrocitos, para conocer la dilución máxima del anticuerpo capaz de inhibir la aglutinación. Los resultados que se muestran en la tabla 3 son un promedio de tres experimentos.

Tabla 3. Títulos de inhibición de la hemaglutinación de los anticuerpos monoclonales

AcM	Título de IHA	
	NAR	RRV
N4	1:10	1:40
N6	1:80	1:80
N10	1:10	1:10
N8	1:8000	1:8000
N7	1:128000	1:8000
N9	1:800	1:40

Los resultados son un promedio de tres experimentos

Observamos que la capacidad de inhibir la hemaglutinación por los anticuerpos puede ser clasificada en tres grupos. El primero corresponde a los anticuerpos monoclonales N4, N6 y N10 que no inhiben la hemaglutinación de ninguno de los virus, o lo hacen a títulos muy bajos; el segundo, presentado por el anticuerpo monoclonal N8, inhibe la hemaglutinación de ambos virus a títulos iguales; y el tercer grupo que corresponde a los anticuerpos monoclonales N7 y N9, los cuales presentan títulos de inhibición de 16 a 20 veces más altos para el virus Nar en relación al virus RRV.

4.2.4 Identificación de la proteína que reconocen los anticuerpos monoclonales

El hecho de que los anticuerpos aislados tengan actividad neutralizante, indican que van dirigidos contra una de las dos proteínas de la superficie del virus, VP4 o VP7. Sin embargo, a través de su patrón de neutralización o de inhibición de la hemaglutinación no es posible identificar la proteína blanco. Para lograr esto se hicieron tres ensayos diferentes.

Los dos primeros ensayos, inmunoprecipitación e inmunopurificación en fase sólida, se basan en la identificación de la proteína blanco a través de su separación física del resto de las proteínas, utilizando el anticuerpo monoclonal para capturarla. Dado que la proteína se encuentra marcada radioactivamente, puede posteriormente ser identificada, de acuerdo a su peso molecular, por electroforesis en geles de poliacrilamida. En el ensayo de inmunoprecipitación se forma el complejo antígeno-anticuerpo en solución y posteriormente se captura este complejo por incubación con

proteína A unida a esféras de sefarosa. En el ensayo de inmunopurificación en fase sólida, el anticuerpo monoclonal se fija a una fase sólida (el fondo de los pozos de una placa de 96 pozos) y posteriormente el anticuerpo monoclonal inmovilizado se pone en contacto con las proteínas virales, donde quedara capturada la proteína reconocida por el anticuerpo.

El empleo de estas dos técnicas nos permitió identificar a VP4 como la proteína reconocida por los anticuerpos monoclonales N7y N8 (Fig. 7).

El tercer ensayo se basa en la capacidad que tienen los anticuerpos de neutralizar la infectividad viral. Se utilizan virus rearreglantes que tienen las dos proteínas de la capa externa, VP7 y VP4, derivadas de distintas cepas de rotavirus que no cruzan por neutralización con el rotavirus RRV y su mutante Nar. Así si los anticuerpos monoclonales neutralizan al virus DS1XRRV que tiene VP7 de DS1y VP4 de RRV, entonces estarán reconociendo a VP4, mientras que si neutralizan al otro virus rearreglante, que tiene VP7 de RRV y VP4 de YM están reconociendo a VP7. Al igual que los ensayos de neutralización con los virus Nar y RRV, la neutralización se definió por la inhibición del 60% de la infección. Con este ensayo se probó que todos los anticuerpos monoclonales reconoce a VP4, ya que fueron capaces de inhibir la infección del virus rearreglante que tiene VP7 de DS1 y VP4 de RRV, mientras que no neutralizaron al virus que tenía VP7 de RRV en YM, los resultados se muestran en la tabla 4. Por lo cual podemos decir que los 6 anticuerpos monolconales que aislamos están reconociendo la proteína VP4.

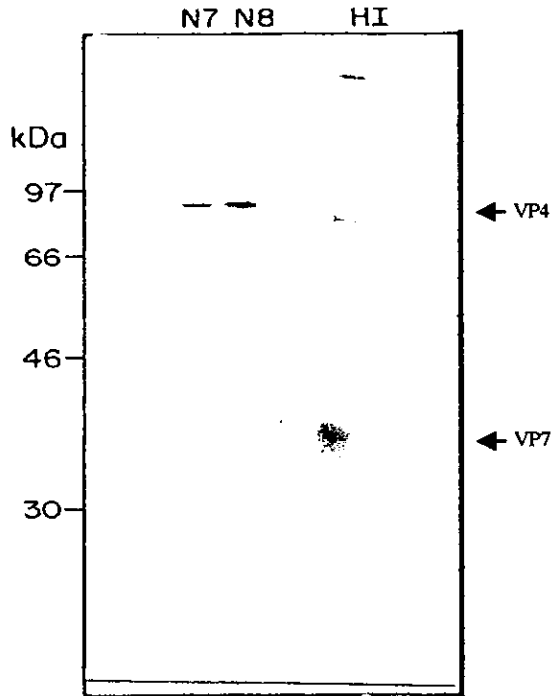


Fig.7. Ensayo de inmunopurificación en fase sólida. 50 μ L de anticuerpo diluido 1:10, se fijaron a una placa de 96 pozos, incubando a 4 $^{\circ}$ C por 12 h. Los pozos se bloquean con gelatina 1% y posteriormente se incubaron con 50 μ L de lisado Nar-S³⁵ a 4 $^{\circ}$ C por 12 h. Los pozos se lavaron con PBS y la proteína capturada por el anticuerpo se liberó hirviendo en presencia de SDS. Las muestras se corrieron en un gel de acrilamida al 11%. Finalmente se expusó una placa fotográfica sobre el gel por tres días a -70 $^{\circ}$ C. También se incluyeron marcadores moleculares, al igual que un suero policlonal contra Nar (HI).

Tabla 4. Neutralización con virus rearreglantes

AcM	DS1XRRV (VP7 DS1-VP4 RRV)	RRVXYM (VP7 RRV-VP4 YM)
N4	1:250	>1:10
N6	1:1250	>1:10
N7	1:6250	>1:10
N8	1:6250	>1:10
N9	1:30000	>1:10
N10	1:6250	>1:10

Tabla 5. Resumen de las características de los 6 anticuerpos monoclonales analizados

AcM	IHA		Neutralización		Proteína		
	Nar	RRV	Nar	RRV	Ipp	SPIT	Neut.
N4	1:10	1:40	1:16000	1:500			VP4
N6	1:80	1:80	1:10000	1:1500		VP4	VP4
N10	1:10	1:10	1:6000	1:4000		VP4	VP4
N8	1:8000	1:8000	1:74000	1:47000	VP4		VP4
N7	1:128000	1:8000	1:39000	1:39000	VP4		VP4
N9	1:800	1:40	1:8000	1:19000			VP4

5.DISCUSION

El objetivo de éste trabajo fue el de aislar anticuerpos monoclonales, inducidos por el virus Nar, que tuvieran la capacidad de neutralizar la infección del virus mutante más eficientemente que la del virus silvestre RRV. Nuestra hipótesis de trabajo fue que el virus Nar tiene un dominio expuesto en la proteína VP4, el cual no está presente en RRV y que permite a la mutante unirse a la célula aun en ausencia de ácido siálico. Ese dominio nos permitiría producir anticuerpos monoclonales que interaccionen e inhiban de manera selectiva la infectividad de Nar sobre la del virus silvestre RRV.

Para lograr este objetivo propuesto, se inmunizaron ratones con el virus Nar y se seleccionaron hibridomas que secretanran anticuerpos con la capacidad de neutralizar la infección de este virus y que inhibieran la hemaglutinación, ya que sólo los anticuerpos que reconocen a las proteínas VP7 y VP4 pueden inhibir la actividad hemaglutinante que presentan algunas cepas de rotavirus, incluyendo a RRV y su mutante Nar.

Los anticuerpos monoclonales producidos en trabajos previos mostraron la capacidad de inhibir la hemaglutinación y tener también una actividad neutralizante.

En este trabajo aislamos 6 anticuerpos monoclonales con actividad neutralizante y esperabamos que estos seis anticuerpos estén dirigidos contra la subunidad VP5 de la proteína VP4, o contra VP7, ya que se ha observado que sólo anticuerpos contra estas dos proteínas son capaces de neutralizar la infección de Nar, ya sea inhibiendo la adsorción o un paso posterior, mientras que los anticuerpos contra el dominio VP8 de VP4 no neutralizan la infectividad de Nar, pero si la de RRV (32, 33).

De acuerdo a los títulos de neutralización de los 6 anticuerpos monoclonales caracterizados, estos se puede clasificar en dos grupos: el primero, formado por los anticuerpos N4 y N6, los cuales presentan una neutralización diferencial entre el virus mutante Nar y el silvestre RRV. Estos dos anticuerpos monoclonales neutralizan 32 y 6 veces más eficientemente a Nar que a RRV, respectivamente, probablemente están dirigidos contra el dominio que está expuesto en Nar y no en RRV, y que sería el dominio que interacciona con el receptor celular independiente de ácido siálico.

El segundo grupo formado por los anticuerpos N7 a N10, que presentan títulos de neutralización para ambos virus que difieren por 2 veces o menos. Estas diferencias están dentro del rango de la variabilidad experimental del ensayo, por lo cual no la consideramos significativa. Estos anticuerpos probablemente estén reconociendo epitopos conservados para ambos virus. Sin embargo, no se puede descartar que el determinante antigénico reconocido por estos anticuerpos pudiera ser la región de VP4 que presenta diferencias conformacionales entre los dos virus, ya que el epitopo podría ser inmunogénico únicamente en el contexto de Nar, pero antigénico tanto en Nar como en RRV.

La presencia de dos patrones diferentes de neutralización entre estos 6 anticuerpos monoclonales inducidos por Nar sugiere que al menos existen dos dominios de neutralización presentes en el virus Nar.

Desconocemos el mecanismo a través del cual los anticuerpos aislados en este trabajo neutralizan la infección de ambos virus. De acuerdo con lo reportado en la literatura, algunos anticuerpos producidos contra el dominio VP5 de VP4 neutralizan la infectividad de Nar a través de inhibir su unión a la célula, mientras que aquellos que neutralizan a RRV lo hacen en un paso posterior a la unión (33, 39). El conocimiento del mecanismo de neutralización de los anticuerpos monoclonales neutralizantes aislados nos ayudará a saber si estos anticuerpos monoclonales están dirigidos contra el dominio en VP4 responsable de la interacción con el receptor independiente de ácido siálico, ya que este tipo de anticuerpos inhiben la unión del virus Nar a las células que han sido tratadas con neuroaminidasa.

Como se mencionó los rotavirus tienen la capacidad de aglutinar eritrocitos a través del dominio VP8 de la proteína VP4, el cual tiene un sitio de unión al ácido siálico responsable de la interacción con eritrocitos. Se sabe que los anticuerpos dirigidos tanto contra VP4 como VP7 pueden inhibir la hemaglutinación del virus. De los anticuerpos contra VP4, los que están dirigidos contra la región VP8 posiblemente bloquean la interacción del virus con el eritrocito de manera directa ya que los anticuerpos anti-VP8 interactúan con la región de unión al ácido siálico de la proteína, es decir que bloquean la interacción con el ácido siálico (23). Los anticuerpos dirigidos contra el dominio VP5 de VP4, y contra VP7, inhiben la hemaglutinación de manera indirecta, provocando cambios conformacionales en el

sitio de unión al ácido siálico o como resultado de un impedimento estérico del anticuerpo (39).

Los 6 anticuerpos monoclonales que aislamos presentan tres patrones de reactividad, en relación con su capacidad de inhibir la hemaglutinación:

El primero es el que tienen los anticuerpos monoclonales N4, N6 y N10 que inhiben poco o no inhiben la hemaglutinación de ninguno de los dos virus. Los títulos de inhibición de la hemaglutinación que presentan (1:10 a 1:80) caen dentro del rango observado para anticuerpos irrelevantes que se sabe que no tienen actividad de inhibición de la hemaglutinación, lo cual sugiere que probablemente la inhibición de la hemaglutinación observada para los anticuerpos monoclonales N4, N6 y N10 no sea específica. Sin embargo, no puede descartarse el que si presenten una inhibición de la hemaglutinación específica pero en títulos muy bajos.

El segundo patrón es representado por N8, donde los títulos de inhibición de la hemaglutinación son iguales para los dos virus. Independientemente de la diferencia conformacional que pueda existir en la proteína VP4 de ambos virus, este anticuerpo reconoce a ambas cepas de manera similar, inhibiendo la hemaglutinación y neutraliza a los dos virus en títulos parecidos.

El tercer patrón presentado por los anticuerpos N7 y N9 los cuales inhiben la hemaglutinación de los virus en forma diferente. Estos anticuerpos inhiben de 16 a 20 veces más eficientemente la actividad hemaglutinante de Nar que la de RRV, a pesar de que los títulos de neutralización son muy similares para ambos virus. Esto puede ser reflejo de la diferencia de conformación que presentan los virus, ya que la

interacción de los anticuerpos con las partículas virales puede afectar el dominio de unión al ácido siálico en forma diferente, mientras que bloquea un sitio en VP4 importante para la infección, de manera similar.

La existencia de tres patrones diferentes en la inhibición de la hemaglutinación de los virus Nar y RRV mostrada por los anticuerpos caracterizados, sugiere la presencia de cuando menos tres regiones de reconocimiento diferentes en la proteína VP4. Probablemente alguna de estas regiones de reconocimiento pueda ser un dominio no identificada previamente en la proteína, ya que hasta ahora no se habían inducido anticuerpos contra el virus Nar, y hasta el momento no se han reportado anticuerpos monoclonales que neutralicen la infección de cepas de rotavirus animales y que no inhiban su hemaglutinación. Esto último puede ser debido a que la mayoría de los anticuerpos monoclonales que se han aislado hasta el momento han sido seleccionados por ensayos de inhibición de la hemaglutinación.

Una parte muy importante de la caracterización de estos anticuerpos fue identificar la proteína que reconoce cada uno. Lo que se esperaba, como se mencionó anteriormente, era que los anticuerpos que se aislaron estuvieran dirigidos contra VP7 o el dominio VP5 de la proteína VP4, ya que sólo los anticuerpos dirigidos contra estas dos proteínas son capaces de neutralizar al virus Nar. Se utilizaron diferentes ensayos para poder identificar la proteína blanco de los anticuerpos, porque la reactividad de los anticuerpos puede variar en función del método. Por ejemplo, los anticuerpos que tienen isotipo IgM no reaccionan con la proteína A sefarosa, la cual además tiene diferencias de afinidad por algunos isotipos IgG, por lo que no funcionan bien en ensayos de inmunoprecipitación. A

parte de hacer ensayos de inmunoprecipitación y de inmunopurificación en fase sólida, se hicieron ensayos de neutralización con virus rearreglantes, cuyas proteínas de capa externa provienen de diferentes cepas. Este ensayo se efectuó para mejorar la identificación de la proteína reconocida por el anticuerpo monoclonal, en casos donde el epítopo estuviera solo presente, en la conformación correcta en el virus pero no en la proteína aislada. Por al menos uno de los tres métodos empleados determinamos que los 6 anticuerpos reconocen a la proteína VP4. De acuerdo a lo discutido anteriormente, lo más probable es estén dirigidos contra determinantes antigénicos presentes en VP5. Para confirmar esto, y poder mapear de manera precisa el sitio de la interacción de los anticuerpos monoclonales, nos proponemos en el futuro aislar variantes de Nar que escapen a la neutralización por estos anticuerpos y secuenciar el gene de VP4 de ellos para localizar la mutación que le confiere la resistencia a la neutralización, lo cual en principio permitiría una mejor aproximación para identificar el sitio de unión del anticuerpo monoclonal. En función de la neutralización diferencial que presentan los anticuepos monoclonales N4 y N6, inhibiendo la infectividad del virus Nar de manera mucho más eficiente que la del virus RRV, estos anticuerpos monoclonales son los mejores candidatos para identificar el dominio de VP4 responsable de la interacción con el receptor independiente de ácido siálico, la cual como se mencionó anteriormente, puede ser la responsable, cuando menos en algunos casos, de la especificidad de la infección mostrada por los rotavirus.

**ESTA TESTS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

6. CONCLUSIONES

1. Se seleccionaron 6 hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales contra el virus Nar y son capaces de neutralizar su infección. Los resultados sugieren que estos anticuerpos monoclonales están dirigidos contra la proteína VP4 y reconocen al menos tres regiones diferentes de esta proteína, a juzgar por los tres patrones de inhibición de la HA.

2. Los seis anticuerpos monoclonales aislados neutralizan la infectividad del virus mutante Nar y también a RRV, aunque 2 de ellos (N4 y N6) lo hacen con títulos menores a los observados para el virus mutante Nar.

3. Los anticuerpos monoclonales N4 y N6 probablemente estén dirigidos contra el dominio que está expuesto en Nar y no en RRV, que puede ser el dominio de VP4 que interacciona con el receptor independiente de AS.

7.PRESPECTIVAS

1.Determinar el mecanismo de neutralización de los virus, a través de ensayos de inhibición de la unión del virus utilizando AcM purificados y cuantificados.

2.Mapear el sitio de unión de los AcM a la proteína correspondiente a través de aislar variantes resistentes a la neutralización y secuenciar el gene de estas variantes que codifica para la proteína reconocida por el AcM.

8.BIBLIOGRAFIA

1. **Anthony, I. D., S. Bullivant, S. Dayal, A. R. Bellamy, and J. A. Berriman.** 1991. Rotavirus spike structure and polypeptide composition. *J Virol.* **65**:4334-40.
2. **Arias, C. F., P. Romero, V. Alvarez, and S. Lopez.** 1996. Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *J Virol.* **70**:5832-9.
3. **Blacklow, N. R., and H. B. Greenberg.** 1991. Viral gastroenteritis. *N Engl J Med.* **325**:252-64.
4. **Both, G. W., A. R. Bellamy, and D. B. Mitchell.** 1994. Rotavirus protein structure and function. *Curr Top Microbiol Immunol.* **185**:67-105.
5. **Broor, S., and L. Dar.** 1992. Vaccines against enteric infections. *Trop Gastroenterol.* **13**:96-101.
6. **Brussow, H., P. A. Offit, and J. Sidoti.** 1991. Neutralizing antibodies to heterologous animal rotavirus serotypes 5, 6, 7, and 10 in sera from Ecuadorian children. *J Clin Microbiol.* **29**:869-73.
7. **Burns John, H. G., Robert D. Shaw, and Mary K. Estes.** 1988. Functional and Topographical Analyses of Epitopes on the Hemagglutinin (VP4) of the Simian Rotavirus SA11. *Journal of Virology.* **62**:2164-2172.
8. **Chen, D. Y., M. K. Estes, and R. F. Ramig.** 1992. Specific interactions between rotavirus outer capsid proteins VP4 and VP7 determine expression of a cross-reactive, neutralizing VP4-specific epitope. *J Virol.* **66**:432-9.
9. **Chiba, S., S. Nakata, S. Ukae, and N. Adachi.** 1993. Virological and serological aspects of immune resistance to rotavirus gastroenteritis. *Clin Infect Dis.*
10. **Clapp, L. L., and J. T. Patton.** 1991. Rotavirus morphogenesis: domains in the major inner capsid protein essential for binding to single-shelled particles and for trimerization. *Virology.* **180**:697-708.

11. **Cornaglia, E., Y. Elazhary, and B. Talbot.** 1991. Characterization of bovine rotavirus VP6 and VP7 as glycoproteins using monoclonal antibodies. *Fems Microbiol Lett.* **63**:147-51.
12. **Coulson, B. S.** 1993. Typing of human rotavirus VP4 by an enzyme immunoassay using monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol.* **31**:1-8.
13. **Dormitzer, P. R., G. W. Both, and H. B. Greenberg.** 1994. Presentation of neutralizing epitopes by engineered rotavirus VP7's expressed by recombinant vaccinia viruses. *Virology.* **204**:391-402.
14. **Dunn, S. J., L. Fiore, R. L. Werner, T. L. Cross, R. L. Broome, F. M. Ruggeri, and H. B. Greenberg.** 1995. Immunogenicity, antigenicity, and protection efficacy of baculovirus expressed VP4 trypsin cleavage products, VP5(1)* and VP8* from rhesus rotavirus. *Arch Virol.* **140**:1969-78.
15. **Estes, M. K.** 1996. Rotaviruses and their replication, p. 1625-1655. *In* B. N. Fields and D. N. Knipe and P. M. Howley and R. M. Chanock and J. L. Melnick and T. P. Monath and B. Roizman and S. E. Straus (ed.), *Virology*, vol. 2. Raven Press, New York.
16. **Estes, M. K., and J. Cohen.** 1989. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev.* **53**:410-49.
17. **Fiore, L., S. J. Dunn, B. Ridolfi, F. M. Ruggeri, E. R. Mackow, and H. B. Greenberg.** 1995. Antigenicity, immunogenicity and passive protection induced by immunization of mice with baculovirus-expressed VP7 protein from rhesus rotavirus. *J Gen Virol.* **76**:1981-8.
18. **Fiore, L., H. B. Greenberg, and E. R. Mackow.** 1991. The VP8 fragment of VP4 is the rhesus rotavirus hemagglutinin. *Virology.* **181**:553-63.
19. **Fuentes, P. E., S. Lopez, M. Gorziglia, and C. F. Arias.** 1995. Mapping the hemagglutination domain of rotaviruses. *J Virol.* **69**:2629-32.
20. **Fukudome, K., O. Yoshie, and T. Konno.** 1989. Comparison of human, simian, and bovine rotaviruses for requirement of sialic acid in hemagglutination and cell absorption. *Virology.* **172**:196-205.
21. **Giammarioli, A., E. Mackow, L. Fiore, H. Greenberg, and F. Ruggeri.** 1996. Production and Characterization of Murine IgA Monoclonal Antibodies to the Surface Antigens of Rhesus Rotavirus. *Virol.* **225**:97-110.

22. **Hansen, G., F. Mehnert, H. J. Streckert, and H. Werchau.** 1992. Monoclonal antipeptide antibodies recognize epitopes upon VP4 and VP7 of simian rotavirus SA11 in infected MA104 cells. *Arch Virol.* **122**:281-91.
23. **Isa, P., S. López, L. Segovia, and C. Arias.** 1997. Functional and Structural Analysis of the Sialic Acid-Binding Domain of Rotavirus. *J. Virol.* **72**:6749-6756.
24. **Kaljot, K. T., R. D. Shaw, D. H. Rubin, and H. B. Greenberg.** 1988. Infectious rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis. *J Virol.* **62**:1136-44.
25. **Kapikian, A. Z. y. R. M. C.** 1996. Rotavirus, p. 863-906. *In* B. N. Fields and D. N. Knipe and P. M. Howley and R. M. Chanock and J. L. Melnick and T. P. Monath and B. Roizman and S. E. Straus (ed.), *Virology*, vol. 1. Raven Press, New York.
26. **Kobayashi, N., K. Taniguchi, T. Urasawa, and S. Urasawa.** 1991. Preparation and characterization of a neutralizing monoclonal antibody directed to VP4 of rotavirus strain K8 which has unique VP4 neutralization epitopes. *Arch Virol.* **121**:153-62.
27. **Lee, J., L. Babiuk, and D. Yoo.** 1998. A Neutralizing Monoclonal Antibody to Bovine Rotavirus VP8 Neutralizes Rotavirus Infection Without Inhibiting Virus Attachment to MA-104 Cells. *Can. J. Vet. Res.* **62**:63-67.
28. **Lizano, M., S. Lopez, and C. F. Arias.** 1991. The amino-terminal half of rotavirus SA114fM VP4 protein contains a hemagglutination domain and primes for neutralizing antibodies to the virus. *J Virol.* **65**:1383-91.
29. **Lopez, S., I. Lopez, P. Romero, E. Mendez, X. Soberon, and C. F. Arias.** 1991. Rotavirus YM gene 4: analysis of its deduced amino acid sequence and prediction of the secondary structure of the VP4 protein. *J Virol.* **65**:3738-45.
30. **Ludert, J., N. Feng, J. Yu, R. Broome, Y. Hoshino, and H. Greenberg.** 1996. Genetic mapping indicates that VP4 is the rotavirus cell attachment protein in vitro and in vivo. *J. Virol.* **70**:487-493.
31. **Mackow, E. R., J. W. Barnett, H. Chan, and H. B. Greenberg.** 1989. The rhesus rotavirus outer capsid protein VP4 functions as a hemagglutinin and is antigenically conserved when expressed by a baculovirus recombinant. *J Virol.* **63**:1661-8.

32. **Mendez, E., C. F. Arias, and S. Lopez.** 1993. Binding to sialic acids is not an essential step for the entry of animal rotaviruses to epithelial cells in culture. *J Virol.* **67**:5253-9.
33. **Mendez, E., C. F. Arias, and S. Lopez.** 1996. Interactions between the two surface proteins of rotavirus may alter the receptor-binding specificity of the virus. *J Virol.* **70**:1218-22.
34. **Padilla, N. L., S. J. Dunn, S. Lopez, H. B. Greenberg, and C. F. Arias.** 1995. Identification of two independent neutralization domains on the VP4 trypsin cleavage products VP5* and VP8* of human rotavirus ST3. *Virology.* **206**:148-54.
35. **Padilla-Noriega, L., R. Werner-Eckert, E. R. Mackow, M. Gorziglia, G. Larralde, K. Taniguchi, and H. B. Greenberg.** 1993. Serologic analysis of human rotavirus serotypes P1A and P2 by using monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol.* **31**:622-628.
36. **Patton, J. T., J. Hua, and E. A. Mansell.** 1993. Location of intrachain disulfide bonds in the VP5* and VP8* trypsin cleavage fragments of the rhesus rotavirus spike protein VP4. *J Virol.* **67**:4848-55.
37. **Prasad, B. V., J. W. Burns, E. Marietta, M. K. Estes, and W. Chiu.** 1990. Localization of VP4 neutralization sites in rotavirus by three-dimensional cryo-electron microscopy. *Nature.* **343**:476-9.
38. **Raj, P., D. O. Matson, B. S. Coulson, R. F. Bishop, K. Taniguchi, S. Urasawa, H. B. Greenberg, and M. K. Estes.** 1992. Comparisons of rotavirus VP7-typing monoclonal antibodies by competition binding assay. *J Clin Microbiol.* **30**:704-11.
39. **Ruggeri, F. M., and H. B. Greenberg.** 1991. Antibodies to the trypsin cleavage peptide VP8 neutralize rotavirus by inhibiting binding of virions to target cells in culture. *J Virol.* **65**:2211-9.
40. **Shaw, A. L., R. Rothnagel, D. Chen, R. F. Ramig, W. Chiu, and B. V. Prasad.** 1993. Three-dimensional visualization of the rotavirus hemagglutinin structure. *Cell.* **74**:693-701.
41. **Tamura, G., M. Dailey, W. M. Gallatin, M. McGrath, I. Weissman, and E. Pillemer.** 1984. Isolation of Molecules Recognized by Monoclonal Antibodies and Antisera: the Solid Phase Immunoisolation Technique. *Anal. Bioch.* **136**:458-464.

42. **Ward, R. L., M. M. McNeal, D. S. Sander, H. B. Greenberg, and D. I. Bernstein.** 1993. Immunodominance of the VP4 neutralization protein of rotavirus in protective natural infections of young children. *J Virol.* **67**:464-8.
43. **Zhou, Y. J., J. W. Burns, Y. Morita, T. Tanaka, and M. K. Estes.** 1994. Localization of rotavirus VP4 neutralization epitopes involved in antibody-induced conformational changes of virus structure. *J Virol.* **68**:3955-64.