

03062
lej.5

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS
PROFESIONAL Y DE POSGRADO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES BIOQUÍMICAS
E INMUNOLÓGICAS DE LAS PROTEÍNAS
EXTERNAS DEL ROTAVIRUS SA - 11

LUIS PADILLA NORIEGA

MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1982



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES BIOQUÍMICAS E INMUNOLÓGICAS
DE LAS PROTEÍNAS EXTERNAS DEL ROTAVIRUS SA-11

Tesis para obtener el título de

Maestro en Investigación Biomédica Básica

Presenta

Lic. en I. B. Luis Padilla Noriega

México, D. F.

1982

Esta tesis fue realizada en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, bajo la asesoría del Dr. Romilio Espejo Torres.

INDICE

	Pág.
<u>RESUMEN</u>	1
<u>LISTA DE ABREVIACIONES</u>	3
<u>INTRODUCCION</u>	4
- Replicación de los rotavirus en cultivo de células <u>in vitro</u>	5
- Morfología	5
- Relación entre morfología, infectividad y hemaglutinación	6
- Morfogénesis	6
- Composición del genoma	7
- Composición de polipéptidos	7
- Función de la glicoproteína HA de los mixovirus	9
- Metodología empleada para la identificación de los polipéptidos hemaglutinantes de otros virus	10
- Objetivo del trabajo	11
<u>MATERIAL Y METODOS</u>	12
- Cultivo de células	12
- Virus	12
- Sueros	13
- Purificación del virus	14
- Tratamiento del virus con tripsina	15
- Tratamiento del virus con EDTA	15
- Purificación de las proteínas de la cápside externa de SA-11	16
- Purificación de VP7 por cromatografía en Sephadex	16
- Identificación de las proteínas virales radioactivas que se adsorben a los eritrocitos	16
- Inhibición con antisuero de la adsorción de las proteínas virales radioactivas a los eritrocitos	18

	Pág.
- Identificación de las proteínas virales que se adsorben a -- células MA-104, e inhibición con suero	18
- Separación de distintas partículas virales por velocidad de sedimentación en gradientes de sacarosa	19
- Hemaglutinación	20
- Inhibición de la hemaglutinación (IHA)	20
- Contraelectroforesis (CIEF)	21
- Inmunoprecipitación con <u>Staphylococcus aureus</u> fijado	22
- Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida (Laemli) y fluorografía	23
<u>RESULTADOS</u>	25
- Efecto de tripsina sobre la actividad hemaglutinante de las partículas virales	25
- Recuperación de la actividad hemaglutinante con las proteínas separadas del virus	26
- Identificación de las proteínas virales capaces de unirse a - eritrocitos	30
A) Adsorción a eritrocitos de las proteínas purificadas del virus	30
B) Adsorción a eritrocitos y a células MA-104 de las proteínas obtenidas de células infectadas con el virus SA-11	38
- Medición de la capacidad hemaglutinante de partículas virales con distinta composición de polipéptidos	41
- Determinación de la existencia de proteínas tipo-específicas y su posible correlación con la(s) proteína(s) responsable(s) de la hemaglutinación	42
<u>DISCUSION</u>	54
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	58

RESUMEN

En este trabajo se describen algunas propiedades bioquímicas e inmunológicas de las proteínas externas del rotavirus SA-11. El diseño de los experimentos está orientado a la identificación de el o los polipéptidos responsables de la actividad hemaglutinante.

Inicialmente se intentó aislar a las proteínas de la cápside externa para determinar cuál de ellas era capaz de hemaglutinar. Al hacer esto se observó lo siguiente: 1) al desagregar con EDTA las proteínas de la cápside externa se pierde la actividad hemaglutinante, 2) las proteínas liberadas por EDTA no son capaces de unirse a los eritrocitos y 3) distintos tratamientos para agregar a estas proteínas tampoco permiten recuperar la actividad hemaglutinante.

Por otro lado las proteínas de la cápside externa son insolubles en ausencia de detergente, lo cual sugiere que estas proteínas no pierden la región hidrofóbica que deben tener en cierta fase de la morfogénesis, en la que se encuentran incorporadas a una membrana lipídica.

Al determinar la capacidad hemaglutinante de partículas virales con distinta composición de polipéptidos se encontró que partículas virales producidas en presencia de tunicamicina, que en lugar del polipéptido VP7 presentan su precursor no glicosilado pVP7, son capaces de aglutinar eritrocitos; por lo tanto los carbohidratos de VP7 no son necesarios para la hemaglutinación.

El tratamiento del virus SA-11 con tripsina, que produce un rompimiento de VP3 en VP5 y VP8 además de aumentar la infectividad, no tiene efecto alguno sobre la hemaglutinación, es decir, el rompimiento de VP3 no es necesario para la actividad hemaglutinante del virus.

También se intentó identificar al polipéptido con mayor proporción de determinantes antigénicos tipo específicos entre los rotavirus SA-11 y NCDV. Se observó lo siguiente:

- 1) Las proteínas de la cápside externa presentan una baja reacción cruzada cuando forman parte de partículas virales, pero una alta reacción cruzada cuando se encuentran libres. En base a esto es posible definir dos dominios o zonas -de alta y baja variabilidad antigénica- en estas proteínas; siendo el dominio de baja -- variabilidad una zona no expuesta en el virus completo.
- 2) A pesar del problema metodológico que implica la observación anterior, fué posible identificar al polipéptido VP7 como el que - presenta mayor proporción de determinantes antigénicos tipo-espe cíficos. La técnica que se usó fué la inmunoprecipitación segu ida de la cuantificación de los polipéptidos inmunoprecipitados.

LISTA DE ABREVIACIONES

Para los amortiguadores se incluye la página donde se indica la composición y el pH de los mismos.

		Pág.
BS	Amortiguador boratos-salina	21
CIEF	Contrainmunolectroforesis	
EDTA	Etilendiaminotetraacetato de sodio	
FS	Solución salina amortiguada con fosfatos	17
FSA	Solución salina amortiguada con fosfatos + albúmina	17
IHA	Inhibición de la hemaglutinación	
MA-104	Línea de células de riñón de mono	
MD	Mezcla disruptora	18
MEM	Medio mínimo esencial de Eagle	
NCDV	Rotavirus de bovino (Nebraska Calf Diarrhea Virus)	
PBS	Amortiguador fosfatos-salina-calcio-magnesio	12
RVH	Rotavirus de humano	
SA-11	Rotavirus de mono (Simian Agent 11)	
SDS	Dodecil sulfato de sodio	
SPB	Suero fetal de bovino	
TENT	Amortiguador tris-EDTA-NaCl-tritón	23
TM	Amortiguador tris-magnesio	15
TNA 1x	Amortiguador tris-NaCl-albúmina	23
TNA 2x	Amortiguador tris-NaCl-albúmina	23
TSETA	Amortiguador tris-salina-EDTA-tritón-albúmina	16
TSM	Amortiguador tris-salina-magnesio	14
UHA	Unidades hemaglutinantes	
UI	Unidades internacionales	

INTRODUCCION

En 1942, Light y Hodes señalaron por primera vez la existencia de un agente viral capaz de producir diarrea en becerros recién nacidos al inocular, oralmente, filtrados fecales libres de bacterias provenientes de niños con diarrea (1).

Quince años después, en 1957, Kraft probó que el agente causal de la diarrea epizootica de ratones jóvenes (EDIM) era un virus con un diámetro al microscopio electrónico de 80 nm y cuyo sitio de replicación eran las células epiteliales del intestino delgado (2,3,4).

Posteriormente, en 1969, Mebus et al. describieron la producción experimental de diarrea en becerros, deprivados de calostro, al inocularlos oralmente con filtrados fecales libres de bacterias (5). La caracterización posterior de las numerosas partículas virales que los animales infectados excretaban con las heces, mostró que éstas eran similares, morfológicamente, a las de los reovirus aunque no existía relación antigénica con ellos (6,7).

Este trabajo recibió poca atención hasta que, varios años después, se encontró un virus similar en biopsias duodenales de niños con gastroenteritis aguda no bacteriana (8). A partir de éste momento se informó la detección de partículas virales con las mismas características en animales jóvenes con diarrea de un gran número de especies como terneras (9), lechones (10), aves de corral (11), conejos (12), venados (13), caballos (11), ratones (14) y corderos (15). Actualmente se ha aceptado la -

inclusión de éstos virus en un nuevo género dentro de la familia Reoviridae, llamado rotavirus.

También se incluyeron en éste género al virus SA-11 aislado de un lavado rectal de mono y al agente "O" obtenido de lavados intestinales de bovinos y ovinos. Aunque ambos virus no fueron detectados como -- agentes causales de diarrea, su morfología y composición los ubican dentro de éste grupo (16,17).

Debido a que en éste trabajo se usó principalmente el virus SA-11, la discusión que sigue está centrada en éste virus.

Replicación de los Rotavirus en Cultivo de Células in vitro

A la fecha se ha logrado adaptar al crecimiento en células -- cultivadas in vitro a cinco especímenes del rotavirus de bovino (18), uno de los cuales se usó en éste trabajo, el NCDV (Nebraska Calf Diarrhea -- Virus, 7). También se ha logrado cultivar in vitro a los rotavirus SA-11 y agente O (19) y muy recientemente a un espécimen de rotavirus de humano (20).

Morfología

Al microscopio electrónico (21) los rotavirus presentan una -- región central de aproximadamente 38 nm de diámetro y de contorno hexagonal. Esta zona sólo es visible en partículas vacías en las que ha penetrado el colorante denso a los electrones. Alrededor de ésta zona se observa una línea basal de la que radian subunidades capsoméricas hacia la

periferia que semejan los rayos de una rueda y dan a las partículas un diámetro de 65 nm. Sobre éstos capsómeros internos se encuentra la cápside externa, semejante a un anillo delgado, liso (sin proyecciones) y con un ancho de 4-5 nm, por lo que las partículas completas tienen un diámetro de 70-75 nm.

Relación entre Morfología, Infectividad y Hemaglutinación

Es posible separar las partículas virales sin cápside externa de las partículas completas con cápside externa por la diferencia que presentan en densidad boyante al centrifugarlas a equilibrio isopícnico en gradientes de cloruro de cesio (22).

Bridger y Woode (22) determinaron que las partículas con cápside externa ($\rho = 1.36$) del rotavirus bovino son al menos 1000 veces más infectivas que las partículas sin cápside externa ($\rho = 1.38$) y, por otro lado, Fauvel et al. (23) observaron que sólo las partículas de este virus con cápside externa son capaces de aglutinar los eritrocitos de varias especies de animales.

Morfogénesis

En células cultivadas in vitro e infectadas con rotavirus se observan inicialmente partículas únicamente en el citoplasma y posteriormente dentro de cisternas dilatadas del retículo endoplásmico rugoso (RER, 24) e inclusive es posible observar partículas gemando através del RER (24, 25, 26). Estas observaciones sugieren que las partículas se sintetizan y ensamblan en las cercanías del RER y que la maduración final ocurre durante el proceso de gemación (24).

Composición del Genoma

El genoma de los rotavirus consiste de once segmentos de ARN de cadena doble que se pueden separar electroforéticamente (17,27,28) y cuyos pesos moleculares van de 2.2×10^6 a 0.2×10^6 daltones aproximadamente (27,28). La suma de los pesos moleculares de los segmentos del ARN del genoma de los rotavirus da un total de 1.1 a 1.2×10^7 daltones.

Composición de Polipéptidos

El rotavirus SA-11 está compuesto de 5 polipéptidos estructurales (29) de los cuales 3 forman parte de la cápside interna (VP1, VP2 y VP6) y dos forman la cápside externa (VP3 y VP7). Además de estos polipéptidos estructurales, se han identificado 6 polipéptidos no estructurales, se han identificado 6 polipéptidos no estructurales codificados por el virus (30) y nombrados NCVp1 a NCVp6 (Figura 1).

Recientemente Espejo et al. (29) observaron que el tratamiento del virus SA-11 completo con tripsina produce 2 polipéptidos (VP5 y -- VP8) a partir del polipéptido VP3 de la cápside externa (Figura 1), aumentando considerablemente la infectividad del virus (31). Posteriormente - Clark et al. (32) observaron el mismo efecto de la tripsina sobre el rota virus bovino. Ellos encontraron además, que el virus no tratado con -- tripsina es capaz de adsorberse a la célula huésped tan eficientemente -- como el virus infectivo -tratado con tripsina- pero, a diferencia de este último, presenta considerablemente disminuidos dos eventos tempranos en - el proceso de replicación viral (que son la eliminación de la cápside externa y la síntesis del ARN viral). Estos datos sugieren que el rompimien

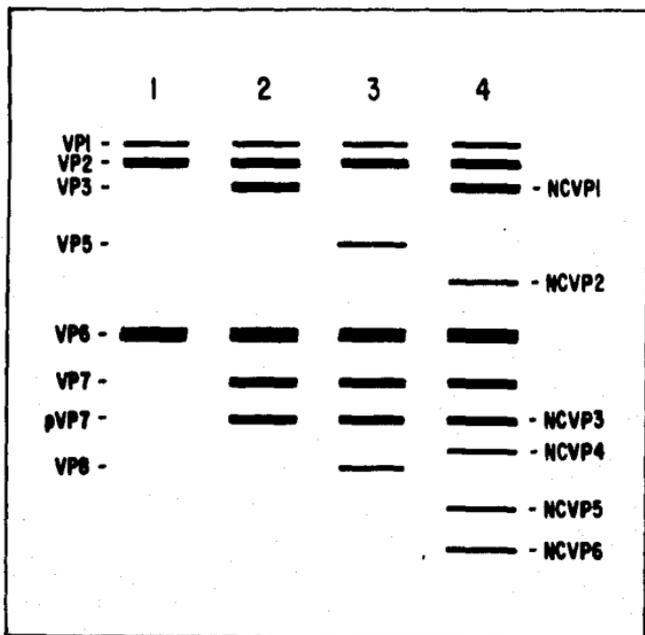


Figura 1. Esquema de la migración electroforética (en gel de poliacrilamida) de los polipéptidos del virus SA-11. Carril 1, SA-11 sin cápside externa; carril 2, SA-11 completo; carril 3, SA-11 completo tratado con tripsina; carril 4, proteínas obtenidas de células infectadas con SA-11. Las iniciales VP (viral protein) seguidas de un número se usan para los polipéptidos estructurales, y las iniciales NCVP (non capsid viral protein) seguidas de un número se usan para los polipéptidos no estructurales. Este esquema se hizo en base al trabajo de Arias et al. (30), y Espejo et al. (29).

to por tripsina del polipéptido VP3 del rotavirus bovino es necesario para la penetración del virión.

El polipéptido de cápside externa VP7 es el único que está -- glicosilado en el virión SA-11 (17). Por otro lado, en algunas preparaciones de éste virus se encuentra además de VP7, el polipéptido llamado - pVP7 que es probablemente un precursor no glicosilado o al menos hipoglicosilado de VP7. Esta conclusión se basa en tres tipos de evidencia: -- 1) los patrones electroforéticos de ambos polipéptidos después de la hidólisis parcial con quimiotripsina son similares (29); 2) el virus producido en presencia del inhibidor de glicosilación tunicamicina contiene -- únicamente pVP7 (30); y 3) el tratamiento del virus con endoglicosidasa H produce un polipéptido con migración electroforética similar a pVP7 a par-- tir de VP7 (30).

Función de la Glicoproteína HA de los Mixovirus

Las glicoproteínas de algunos virus con membrana lipídica tie-- nen muchas veces funciones importantes para el virión (33), por ejemplo -- la glicoproteína HA (hemaglutinina) de los mixovirus tiene dos funciones, que son la adsorción (34) y, probablemente, la penetración a la célula -- huésped (35,36). A través de esta misma proteína los mixovirus se adsor-- ben y aglutinan a los eritrocitos (34,37), por lo que se considera a la -- hemaglutinación como un modelo de la adsorción del virus a la célula hués-- ped, el cual es mas fácil de ensayar.

La proteína HA de los mixovirus guarda cierta similitud con -- el polipéptido VP3 de los rotavirus, pues sufre también un rompimiento --

catalizado por tripsina que es necesario para la infectividad del virus. Este rompimiento convierte a la proteína HA en dos polipéptidos unidos -- por puentes disulfuro y es necesario para la penetración pero no para la adsorción del virus a la célula huésped (35,36).

Metodología Empleada para la Identificación de los Polipéptidos Hemaglutinantes de Algunos Virus

Se han utilizado tres enfoques para identificar en algunos - virus al polipéptido responsable de la hemaglutinación. Enseguida se mencionan ejemplos de cada tipo de enfoque.

Através de un enfoque bioquímico se ha identificado la hema-- glutinina de los mixovirus, purificando la proteína de membrana HA y de-- mostrando que esta tiene actividad hemaglutinante (37).

El enfoque inmunológico se basa en la producción de sueros -- monoespecíficos (es decir contra una sola proteína) o anticuerpos monoclo-- nales (contra un solo determinante antigénico de la proteína) y el ensayo de la capacidad de estos sueros o anticuerpos para inhibir la hemaglutina-- ción.

Através de la producción de sueros monoespecíficos se confir-- mó que la proteína HN de los paramixovirus es la responsable de la hema-- glutinación (38) y por otro lado, utilizando anticuerpos monoclonales con-- tra los reovirus se encontró que no solo los anticuerpos contra el poli-- péptido σ 1 -considerado por evidencia genética como la hemaglutinina -- (39)- sino también los anticuerpos contra los polipéptidos σ 3 y λ 2 son --

capaces de inhibir la hemaglutinación causada por este virus (40).

Un enfoque genético para resolver el problema en virus con --
genoma segmentado se basa en la obtención de rearreglantes. En estos ---
rearreglantes se correlaciona el tipo de hamaglutinina -determinado por -
inhibición de la hemaglutinación con suero específico- con el origen de -
los segmentos. En reovirus el segmento de ARN que correlaciona con el --
tipo de hamaglutinina resultó ser S1 (39) que codifica por el polipéptido
σ1 (41).

Objetivo del Trabajo

El objetivo de este trabajo es identificar al polipéptido res
ponsable de la actividad hamaglutinante del rotavirus SA-11, y con este -
fin se siguió un enfoque bioquímico como el descrito anteriormente, con -
algunas variaciones.

MATERIAL Y METODOS

Cultivo de Células

Se utilizó la línea MA-104 de células de riñón de mono, obtenida del Dr. H. H. Malherbe de la Universidad de San Antonio, Texas.

Las células fueron crecidas a 37°C y bajo 5% de CO₂ en Medio Mínimo Escencial de Eagle (MEM) con 250 UI/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomicina y 10% de suero fetal bovino (SFB).

Virus

El rotavirus SA-11 fué obtenido del Dr. H. H. Malherbe de la Universidad de San Antonio, Texas y el rotavirus NCDV fué obtenido del Dr. R. Spendlove de la Universidad del Estado de Utah.

Ambos virus se produjeron infectando células MA-104 en presencia de tripsina (Difco, 10 µg/ml final) durante el período de adsorción - (1 hora), después del cual se lavó con PBS* (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, -- Na₂HPO₄ 8.1 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM; pH 7.5), se añadió MEM sin suero y se cosechó 24 horas después. Para preparar virus marcado radioactivamente, el MEM completo fué reemplazado a las 6 horas post-infección por MEM con bajo contenido de metionina (0.3 µg/ml) y 33 (µCi/ml

*Los componentes de las soluciones amortiguadoras, sus concentraciones y el pH se indican solo al nombrar por primera vez al amortiguador. La lista de abreviaciones (página 3) indica la página en que se encuentran estas características para cada amortiguador.

de L-metionina ³⁵S (> 500 Ci/nmol, New England Nuclear Corp.).

El rotavirus de humano utilizado (RVH-770) fué aislado de -- heces de un niño con diarrea internado en el Hospital de Pediatría del - Instituto Mexicano del Seguro Social de la Ciudad de México.

Sueros

Se utilizaron dos tipos de suero contra el virus SA-11. El primer suero se produjo en conejo utilizando como antígeno al virus semi purificado, es decir, procesado hasta la precipitación con polietilengli col (ver purificación de virus). Este suero fue usado únicamente para - los ensayos de contrainmunolectroforesis (CIEF), inhibición de la hema- glutinación (IHA) y neutralización.

El segundo suero fué producido en cuyo con virus SA-11 obtenido por el proceso de purificación completo.

Para la producción en conejo de los sueron contra SA-11 y - RVH-770, los animales se inocularon por vía intradérmica con una mezcla de virus con adyuvante de Freund (Miles) por tres veces consecutivas a - intervalos de cuatro semanas para SA-11 y de una semana para RVH-770. - Para la producción en cuyo del suero contra SA-11 se inoculó a un animal por vía intradérmica y subcutánea con una mezcla de 20 µg de virus puri- ficado con adyuvante de Freund (Miles) por tres veces consecutivas a in- tervalos de una semana.

En todos los casos se utilizó adyuvante completo en la prime ra inoculación e incompleto para las siguientes y para obtener finalmen-

te el suero se sangró a los animales una semana después de la última inoculación.

El suero hiperimmune contra NCDV producido en conejo nos fué proporcionado por el Dr. R. Spendlove de la Universidad del Estado de Utah.

Se usaron dos sueros de pacientes convalecientes de diarrea -- por rotavirus (anti-RVH 213172 y anti RVH 217677). Estos sueros fueron -- obtenidos de pacientes ingresados al Instituto Nacional de Pediatría de la Ciudad de México.

El suero contra la inmunoglobulina G humana producido en cabra fué obtenido de Miles Co.

Purificación del Virus

Las pocas células que quedan adheridas a la superficie de los -- frascos de cultivo, al cumplirse las 24 horas post-infección, fueron des-- prendidas con gendarme de hule y la suspensión resultante fué agitada du-- rante 10 minutos en presencia de triclorotrifluoroetano vol/vol. Posterior-- mente se centrifugó durante 30 minutos a 10 000 x g; al sobrenadante obte-- nido se le añadió polietilenglicol al 50% para obtener una concentración -- final de 8% y se incubó a 4°C durante la noche. Una vez transcurridas 12 horas, se centrifugó a 4 000 x g durante 30 minutos y después de resuspen-- der el precipitado en 100-200 µl de amortiguador TSM (tris 50 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1 mM; pH 8.2), se sedimentó la resuspensión del virus en un gra-- diente lineal de 15-45% de sacarosa en TSM a 34 000 rpm durante 45 minutos en un rotor SW40 (Beckman). Al terminar la centrifugación, la banda opa--

lescente o radioactiva correspondiente al virus fué recolectada. La fracción conteniendo al virus se puso sobre una solución de CsCl en amortiguador TM (tris 50 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 8.2), con una densidad de 1.36 gr/cm³ y se centrifugó a equilibrio durante 18 horas a 40 000 rpm en un rotor SW 50.1 (Beckman). Después de la centrifugación se recolectó el gradiente y las fracciones que contenían al virus con cápside externa ($\rho = 1.365$) y al virus sin cápside externa ($\rho = 1.385$) se dializaron, por separado, contra amortiguador TSM. La densidad se calculó midiendo el índice de refracción.

El virus con cápside externa presentaba una radioactividad -- específica de aproximadamente 16 mCi/gr. Este cálculo se hizo determinando la cantidad de virus por absorbancia a 260 nm (aplicando la equivalencia establecida para reovirus, 42) y midiendo la radioactividad en un contador de centelleo Searle Mark III (con una eficiencia de 80%).

Para purificar rotavirus de las heces se hizo una suspensión al 10% en TSM y se procesó igual que la suspensión de células que se obtiene después de la infección.

Tratamiento del Virus con Tripsina

El virus se incubó con tripsina (tipo II, Sigma) a una concentración final de 10 μ g/ml, en amortiguador TSM durante 20 minutos a 25°C. Este tratamiento convierte al 100% de VP3 en VP5 y VP8 (29).

Tratamiento del Virus con EDTA

Se añadió al virus tritón X-100 (0.1% final) y solución de -- etilendiaminotetraacetato de sodio (EDTA) 100 mM, pH 7 para obtener una -

concentración final de 10 mM de EDTA, y se incubó durante 15 minutos a -- 20°C.

Purificación de las Proteínas de la Cápside Externa de SA-11

El virus radioactivo (^{35}S metionina) tratado con EDTA en las condiciones descritas se centrifugó en un gradiente lineal de sacarosa -- 15-45% en amortiguador TSETA (tris 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, tritón X-100 0.1% y albúmina bovina 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$; pH 8.2) a 34 000 rpm durante 45 minutos en un rotor SW 40 (Beckman).

Después de la centrifugación se colectó el gradiente y se conservaron las fracciones con mayor radioactividad en la parte superior del gradiente (menisco), conteniendo las proteínas de la cápside externa.

Purificación de VP7 por Cromatografía en Sephadex

Las proteínas de la cápside externa fueron mezcladas con los marcadores azul de dextrano y azul de bromofenol y se aplicó la mezcla en una columna de Sephadex G-100 de 55 x 1.6 cm. Posteriormente se eluyeron las proteínas con un flujo de 26 ml/hora de amortiguador TSETA. Aquellas fracciones del pico de radioactividad que por electroforesis contenían a los polipéptidos VP7 y pVP7 fueron precipitadas con 5 volúmenes de etanol a -20°C durante la noche y posteriormente fueron centrifugadas a 10 000 - rpm durante 30 minutos en un rotor HB4 (Sorvall). El precipitado fué secado con aire y resuspendido en 100 μl de amortiguador TSETA.

Identificación de las Proteínas Virales Radioactivas que se Adsorben a -- Eritrocitos

A 25 μl del virus (^{35}S metionina, 1.5 a 4 x 10⁵ cpm, según se

indica en las figuras), o de las proteínas virales (1×10^3 cpm) purificadas a partir del virus como se describió, o de las proteínas de células infectadas (50) sin purificación posterior; se les añadieron 25 μ l de -- amortiguador FSA (Na_2HPO_4 7.7 mM, NaH_2PO_4 2.6 mM, NaCl 145 mM, albúmina -- bovina 4%; pH 7.4) y 200 μ l de una suspensión de eritrocitos (1.125×10^8 células/ml) en el mismo amortiguador. Después de 1 hora de incubación -- a temperatura ambiente, cuando los eritrocitos ya habían sedimentado, se guardó 1/4 del sobrenadante para hacer electroforesis. Al botón de eritrocitos se les añadió 1 ml de amortiguador FS (Na_2HPO_4 7.7 mM, (NaH_2PO_4 2.6 mM, NaCl 145 mM; pH 7.4), se agitó el tubo para resuspenderlos y se -- centrifugaron 30 segundos a 11 500 rpm en la centrifuga Eppendorff modelo 5413. Después se eliminó el sobrenadante, se lavaron dos veces más los -- eritrocitos y el paquete obtenido al final fué analizado por electroforesis en gel de poliacrilamida, con el sistema discontinuo de Laemli (43) -- y fluorografía según lo descrito por Bonner y Laskey (44).

Cuando se analizó la adsorción a eritrocitos del virus SA-11 desagregado con EDTA, se hizo el tratamiento con este reactivo en las condiciones descritas y se neutralizó al finalizar el período de incubación con una cantidad equimolar de MgCl_2 . Finalmente se completó el volumen a 50 μ l con amortiguador FSA y se siguió el procedimiento de adsorción ya -- descrito. Por otro lado no se utilizaron mas de 20 μ l de virus tratado -- con EDTA (en presencia de tritón) para no rebasar una concentración de -- 100 μ g de tritón/ml durante la incubación con los eritrocitos, ya que se ha observado que concentraciones de 125 o más μ g/ml de tritón interfieren con el ensayo de hemaglutinación por lisis parcial o total de los eritrocitos.

Inhibición con Antisero de la Adsorción de las Proteínas Virales Radioactivas a los Eritrocitos

Se incubaron 25 μ l de proteínas de células infectadas (3×10^5 cpm) con 25 μ l de suero (dilución 1/5 en amortiguador FS) durante 1 hora a temperatura ambiente y después de esta incubación se procesó la mezcla -- exactamente igual que en los ensayos de adsorción de las proteínas virales, como ya se describió.

Identificación de las Proteínas Virales que se Adsorben a Células MA-104, e Inhibición con Suero

A un frasco (25 cm^2) de células MA-104 confluentes y lavadas 2 veces con MEM se les añadió 50 μ l de proteínas radioactivas (^{35}S metionina, 6×10^5 cpm) de células infectadas con SA-11 y 450 μ l de MEM. Posteriormente se incubó durante 75 minutos a 4°C, agitando suavemente el frasco -- cada 5 a 10 minutos.

Después de la incubación las células se lavaron dos veces con PBS. A la monocapa de células lavadas se le añadió 200 μ l de MD (mezcla disruptora: dodecil sulfato de sodio (SDS) 2%, mercaptoetanol 2%, EDTA -- 4.2 mM, glicerol 10%, tris 50 mM, azul de bromofenol 0.015%). Esta adición convierte a las células en un líquido muy viscoso debido a la liberación del DNA, por lo que se hizo pasar repetidamente a este líquido por -- una jeringa de 1 ml con aguja No. 27 hasta eliminar la viscosidad. Una -- vez hecho esto se siguió el procedimiento de electroforesis en gel de poli--acrilamida y fluorografía para determinar que proteínas radioactivas se habían adsorbido a las células.

Para determinar la inhibición por suero de la adsorción de las proteínas virales a sus células huésped, se incubaron 50 μ l de las proteínas virales radioactivas (6×10^5 cpm) con 50 μ l de suero (diluciones 1/5 y 1/50 en amortiguador FS) y se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 1 hora. Una vez hecha esta incubación se siguió el mismo procedimiento indicado al inicio de este inciso.

Separación de Distintas Partículas Virales por Velocidad de Sedimentación en Gradientes de Sacarosa

Se usó esta técnica para la separación de las distintas partículas obtenidas al tratar a las células infectadas con el antibiótico tunicamicina.

Se infectaron 2.5×10^6 células MA-104 con el virus SA-11 en las condiciones ya descritas, excepto que se incluyó ^{35}S metionina al terminar el período de adsorción y se añadió tunicamicina (5 $\mu\text{g/ml}$ final) -- a las 6 horas post-infección. Posteriormente (a las 24 horas post-infección), las células fueron tratadas con triclorotrifluoroetano como se indicó en el inciso de purificación del virus. 200 μ l de la fase acuosa que resulta (equivalentes a 1/5 del total) fueron depositados sobre un gradiente de sacarosa 15-45% en amortiguador TSM, y el gradiente fue centrifugado a 34 000 rpm durante 60 minutos en un rotor SW 40 (Beckman). Después de la centrifugación se colectó el gradiente y se determinó la posición de las distintas partículas tomando alícuotas de cada fracción para medir radioactividad.

Hemaglutinación

Se siguió la técnica descrita por Casals (45), y se usaron -- dos tipos de muestras: 1) virus purificado que debía ser titulado para -- usarlo en los ensayos de inhibición de la hemaglutinación, y 2) alícuo-- tas de las fracciones obtenidas de gradientes de sacarosa en los que se -- separaron los distintos tipos de partículas virales.

Se hicieron diluciones seriadas 1:2 de la muestra en amortigua-- dor FSA, en placas de microtitulación con fondo en "V" (Lux, 96 pozos). A 50 μ l de cada dilución se añadieron 50 μ l de la suspensión de eritrocitos 0 humanos al 0.5% (45) en amortiguador FSA y después de 1 hora de incuba-- ción a temperatura ambiente se leyeron los resultados. Por definición, la última dilución en la que se observa hemaglutinación contiene 1 unidad he-- maglutinante (UHA).

A las muestras que contenían EDTA se le añadió previamente una cantidad equimolar de $MgCl_2$ para neutralizarlo y, por otro lado, con las -- muestras que contenían tritón (1 mg/ml) no se utilizaron más de 10 μ l por ensayo para no rebasar una concentración de 100 μ g de tritón/ml en la mez-- cla.

Inhibición de la Hemaglutinación (IHA)

Se siguió la técnica descrita por Casals (45).

Los sueros usados en la inhibición de la hemaglutinación y en la recuperación de la hemaglutinación de SA-11 tratado con EDTA por incu-- bación con sueros heterólogos, fueron adsorbidos con caolín y eritrocitos

para eliminar sustancias que interfieren en el ensayo (45), y además fueron calentados a 56°C durante 30 minutos para inactivar el complemento (45).

A un volumen de suero sin diluir se añadieron 5 volúmenes de caolín al 25% en amortiguador BS (borato de sodio 50 mM, NaCl 120 mM; pH 9). Esta mezcla fué incubada a temperatura ambiente durante 20 minutos y luego centrifugada a 2500 rpm durante 30 minutos en un rotor SS-34 (Sorvall).

Posteriormente, a 5 ml del sobrenadante obtenido se le añadieron 0.1 ml de eritrocitos O humanos previamente lavados con amortiguador FS. La mezcla se incubó a 4°C durante 20 minutos y luego se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos en un rotor SS-34 (Sorvall). Finalmente el sobrenadante fué incubado a 56°C durante 30 minutos. Se consideró que el suero había sido diluido 1:5 durante todo el proceso.

Para cuantificar la inhibición de la hemaglutinación por suero, se hicieron diluciones seriadas 1:2 del suero en placas de microtitulación con fondo en V, utilizando amortiguador FSA como diluyente.

A 25 µl de cada dilución se agregaron 25 µl de antígeno conteniendo 4 UHA. Después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente se añadieron 50 µl de suspensión de eritrocitos al 0.5% en FSA y se incubó 1 hora más antes de leer los resultados.

Contrainmunolectroforesis (CIEF)

La CIEF fué realizada en geles de agarosa hechos sobre placas de vidrio de 12 x 7 cm. Se pusieron 20 ml de agarosa al 1% en amortigua--

dor barbital 33 mM, pH 8.6 en cada placa, y después que el agar solidificado, se perforaron 14 pares de agujeros ("pozos") de 5 mm de diámetro. La distancia entre los centros de cada par de pozos fué de 15 mm.

El suero se colocó en el ánodo y el virus en el cátodo y se corrió a 7 mA por gel durante 15 horas. El amortiguador de corrida fué barbital 33 mM, pH 8.6. Una vez terminada la electroforesis los geles fueron lavados con salina al 1%. Posteriormente se tñieron con bromuro de etidio 1 µg/ml durante 1 hora y luego se observaron las bandas fluorescentes bajo la luz ultravioleta de onda corta (220 nm).

Inmunoprecipitación con Staphylococcus aureus Fijado

Las inmunoprecipitaciones se hicieron aprovechando la capacidad de la proteína A presente en la superficie del Staphylococcus aureus para unirse a la IgG (46). Se siguió la técnica de Strauss (47) y se usaron 4 tipos de muestras: 1) Proteínas de la cápside externa purificadas (5×10^3 cpm por ensayo); 2) Polipéptido VP7 purificado (2×10^3 cpm por ensayo); 3) virus SA-11 tratado con EDTA (5×10^5 cpm por ensayo); 4) proteínas de células infectadas con el virus SA-11 y tratadas con SDS al 0.1% (5×10^5 cpm por ensayo).

Los procedimientos para obtener las muestras 1 a 3 fueron los ya expuestos, y la muestra No. 4 se obtuvo infectando 2.5×10^6 células MA-104 en las condiciones descritas, excepto que se lavaron las células a las 10 horas post-infección con PBS, y después de eliminar el PBS, se solubilizaron las células en 200 µl de PBS + SDS 0.1% y luego se diluyeron 10 veces en el amortiguador en que se lleva a cabo la inmunoprecipitación:

TNA 1x (NaCl 200 mM, tris 50 mM, EDTA 1 mM, albúmina bovina 0.1%, tritón X-100 2 µg/ml; pH 7.6).

Se mezclaron 10 µl de muestra con 10 µl de TNA 2x (NaCl 400 mM, tris 100 mM, EDTA 2 mM, albúmina bovina 0.1%, tritón X-100 1%; pH 7.6) y 30 µl de TNA 1x. Luego se añadieron 10 µl de las distintas diluciones -- del suero en TNA 1x y la mezcla se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Al terminar esta incubación se añadieron 50 µl de Staphylococcus aureus fijado (Pansorbina, Calbiochem) al 10% peso/volumen y se incubó 10 minutos mas a temperatura ambiente.

Posteriormente se lavó la Pansorbina del material no adsorbido con amortiguador TNA 1x y después con amortiguador TENT (NaCl 200 mM, Tris 50 mM, EDTA 1 mM, tritón 0.1%; pH 7.6).

La pastilla que quedó después de la última centrifugación se resuspendió en 100 µl de MD. Una vez resuspendida, se agitó con Vortex y después de calentarla durante 2 minutos en un baño de agua en ebullición (96°C) se centrifugó a 11 500 rpm durante 1 minuto (en la centrifuga --- Eppendorff modelo 5413) para analizar finalmente el sobrenadante por electroforesis en gel de poliacrilamida (Laemli).

Electroforesis de Proteínas en Gel de Poliacrilamida (Laemli) y Fluoro--- grafía

Los polipéptidos virales se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (11% peso/volumen de acrilamida y 0.3% peso/volumen de bis-acrilamida, en placa) usando el sistema discontinuo de Laemli (43).

Inicialmente las muestras son mezcladas vol/vol con MD y calentadas en baño hirviente durante 2 minutos.

Después de aplicar las muestras se corre la electroforesis a 10 mA por gel hasta que el colorante (azul de bromofenol) rebasa al gel - concentrador y entonces se continúa a 20 mA por gel hasta que el colorante sale por completo del gel.

Posteriormente los geles son fijados en ácido acético al 10% y metanol al 30% y procesado para fluorografía según lo descrito por -- Bonner y Laskey (44).

Cuando así se indica se hicieron curvas densitométricas de -- los fluorogramas de 560 nm usando un espectrofotómetro Gilford modelo 250 equipado con un transportador lineal Gilford modelo 2410s.

RESULTADOS

En esta sección se describen cuatro procedimientos que permitieron definir algunas propiedades bioquímicas e inmunológicas de las proteínas externas del rotavirus SA-11. El diseño de los experimentos está orientado a la identificación de el o los polipéptidos responsables de la actividad hemaglutinante. Los cuatro procedimientos utilizados fueron -- los siguientes:

- 1) La determinación de la actividad hemaglutinante directamente en las proteínas aisladas del virus, 2) la identificación de las proteínas virales capaces de adsorberse a los eritrocitos, 3) la determinación de la actividad hemaglutinante de las partículas virales -- con distinta composición de polipéptidos que se obtienen de células infectadas en presencia de tunicamicina y 4) la determinación de la reacción cruzada entre los polipéptidos cognatos de distintos virus.

Efecto de Tripsina sobre la Actividad Hemaglutinante de las Partículas -- Virales

Con el fin de establecer la importancia de la ruptura del polipéptido VP3 en la capacidad hemaglutinante del virus SA-11, se determinó el efecto de la tripsina sobre esta capacidad. Las diversas determinaciones probaron que aunque este tratamiento aumenta la infectividad del virus, no tiene efecto en la actividad hemaglutinante. Por esta razón, -- en el trabajo subsecuente se usó indistintamente virus tratado o no con tripsina.

Recuperación de la Actividad Hemaglutinante con las Proteínas Separadas del Virus

Para aislar las proteínas de la cápside externa, entre las --
cuales se encuentra probablemente la responsable de la hemaglutinación, --
se trató al virus purificado con EDTA, ya que se sabía que este tratamien--
to convierte a las partículas completas en partículas sin cápside externa
(48); y es posible obtener las proteínas de la cápside externa centrifu--
gando al virus tratado con EDTA en un gradiente de sacarosa (Figura 2).

Para probar la recuperación de actividad hemaglutinante en --
cada paso del proceso de purificación de las proteínas externas, se deter--
minó previamente el efecto de distintas cantidades de las sustancias usa--
das en el proceso de purificación (y de mezclas de estas) que podían in--
terferir con el ensayo, como son el EDTA y el detergente no iónico tritón
X-100; y en los experimentos que se describen se usaron cantidades de es--
tos reactivos que no interfirieran con el ensayo (un máximo de 25 $\mu\text{g/ml}$ de
EDTA ó 125 $\mu\text{g/ml}$ de tritón). Además se observó que es posible exceder la
cantidad máxima de EDTA, si éste se "neutraliza" con una cantidad equimo--
lar de MgCl_2 .

Al tratar distintas cantidades de virus SA-11 purificado con
EDTA y neutralizar este con MgCl_2 , solo se recuperó el 3% de la actividad
hemaglutinante, sin embargo, no se recuperó en absoluto esta actividad en
las proteínas de la cápside externa purificadas. Por lo tanto la activi--
dad hemaglutinante residual que se detecta en el virus tratado con EDTA --
probablemente se debe a que este reactivo no es completamente efectivo --

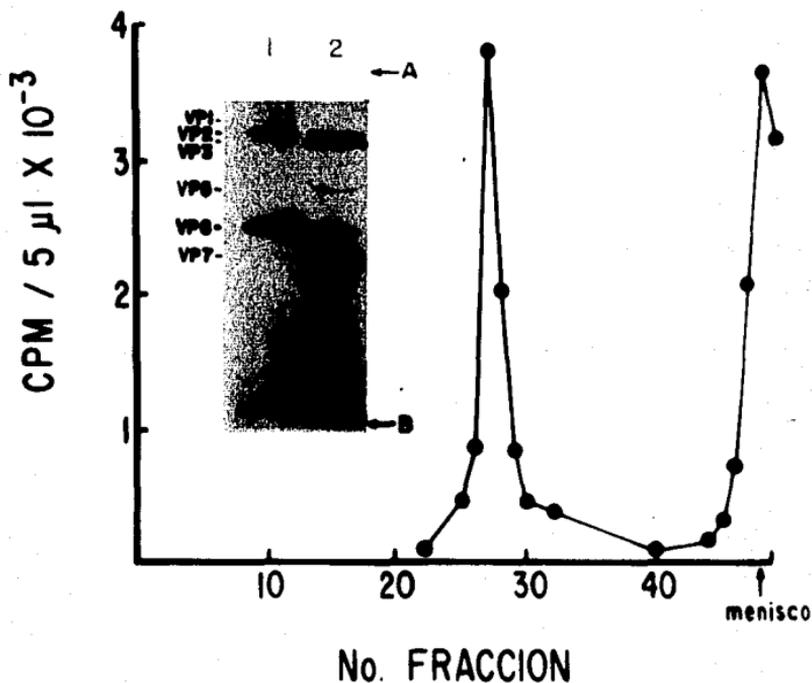


Figura 2. Distribución de la radioactividad, incorporada en proteínas, del virus SA-11 tratado con EDTA, después de centrifugar en un gradiente de sacarosa. Se trató al virus SA-11 radioactivo (³⁵S metionina, 1.5 x 10⁶ cpm) con EDTA 10 mM y tritón 0.1% durante 15 minutos. Posteriormente la mezcla fué centrifugada en un gradiente de sacarosa 10-45% a 34 000 rpm durante 45 minutos (en rotor Beckman SW40). Finalmente se colectaron 49 fracciones y se contaron alícuotas de cada una en un contador de centelleo. El inserto a la izquierda es la electroforesis en gel de poliacrilamida (según Laemli, 43) de las fracciones 28 (carril 1) y 48 (carril 2). Las flechas A y B indican el inicio y final del gel separador, respectivamente.

para desagregar la cápside externa y prevalece un poco de virus completo después del tratamiento.

Para probar si la pérdida de la actividad hemaglutinante se debe a la desaparición del sitio responsable -por cambios en la estructura terciaria de la proteína- ó a la desagregación de la cápside externa en unidades aún capaces de unirse a los eritrocitos pero "monovalentes", y -por lo tanto incapaces de formar los puentes de unión que requiere la hemaglutinación, se intentó recuperar la actividad incubando las preparaciones de virus SA-11 -previamente tratadas con EDTA- con sueros preparados contra rotavirus heterólogos. Este procedimiento ha funcionado bien con adenovirus, donde se ha demostrado que anticuerpos heterólogos son capaces de unir monómeros pentón-fibra de éste virus y de ésta manera al producir agregados multivalentes regenerar la actividad hemaglutinante perdida por desagregación (49).

Con éste objeto se utilizaron varios sueros heterólogos cuya eficiencia para reaccionar contra determinantes antigénicos comunes de -- los rotavirus había sido probada por contrainmunoelectroforesis (CIEF) -- pero cuyo título para inhibir la hemaglutinación del virus SA-11 era al -- menos 20 veces menor que el del suero anti-SA-11 (Cuadro 1). Sin embargo, al tratar 25 UHA de virus SA-11 con EDTA en presencia de tritón e incubar luego con distintas concentraciones (Cuadro 1) de los sueros heterólogos, no se recuperó la actividad hemaglutinante, ni tampoco cuando se utilizó además anti-IgG en el mismo ensayo (en diluciones seriadas 1:5 entre -- los límites 1:10 y 1:7250) para aumentar aún más el efecto polimerizante de los sueros heterólogos.

CUADRO 1

TITULACION DE VARIOS SUEROS POR CONTRAINMUNOELECTROFORESIS (CIEF) VERSUS SA-11 SCE⁽¹⁾ Y POR INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION (IHA) - VERSUS SA-11.

Origen del suero	Suero contra	Técnica		Diluciones usadas en RHA ⁽²⁾
		CIEF	IHA	
Hiperimmune	SA-11	512 ⁽³⁾	7500	
"	NCDV	256	320	10 - 6050
"	RVH770	256	40	20 - 320
Inf. natural	RVH213172	8	20	25 - 1600
"	RVH217677	4	40	50 - 3200

(1) SCE = sin cápside externa

(2) RHA = experimentos de recuperación de la hemaglutinación - (de SA-11 tratado con EDTA) por incubación con los - sueros heterólogos

(3) Los números son los valores recíprocos del título de los - antisueros o de las diluciones usadas.

Estos resultados sugieren que la pérdida de la actividad hemaglutinante por el tratamiento con EDTA no se debe a que este reactivo próduzca unidades monovalentes incapaces de aglutinar pero capaces de adsorberse a los eritrocitos.

Identificación de las Proteínas Virales Capaces de Unirse a Eritrocitos

A) Adsorción a eritrocitos de las proteínas purificadas del virus

La capacidad que muestre una proteína para unirse a eritrocitos es el origen o fundamento de la capacidad hemaglutinante del virus -- por lo que la identificación de tal proteína ayudaría a identificar la -- proteína responsable de la hemaglutinación. Por ésta razón se decidió -- determinar si las proteínas de la cápside externa liberadas por EDTA eran aún capaces de unirse a eritrocitos a pesar de no ser hemaglutinantes.

El procedimiento consistió en la adsorción a los eritrocitos de las proteínas virales radioactivas purificadas a partir del virus completo y su identificación posterior por electroforesis y fluorografía.

Para estandarizar el método se determinó inicialmente la capacidad del virus SA-11 completo para unirse a los eritrocitos. La curva - de adsorción de virus SA-11 radioactivo (³⁵S metionina) contra distintas cantidades de eritrocitos (Figura 3) permitió determinar la cantidad de - eritrocitos necesaria para el ensayo.

En los ensayos subsecuentes se usó 10 veces la cantidad necesaria para adsorber el 50% del virus radioactivo. Como el virus no se --

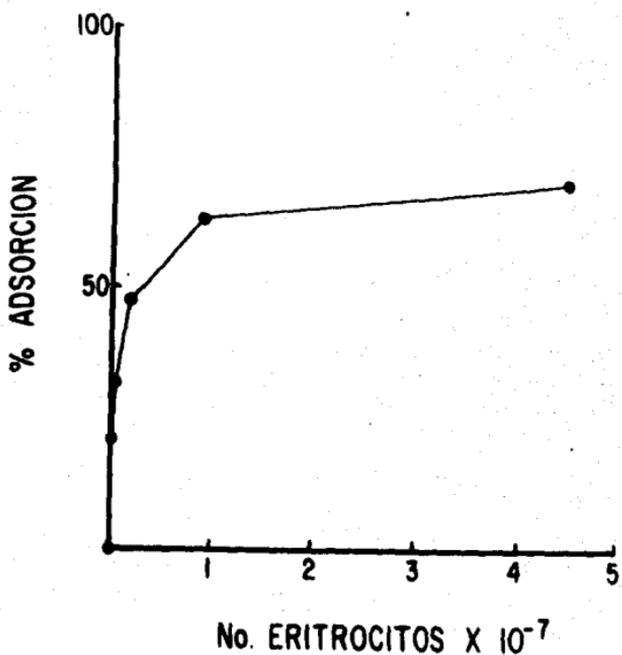


Figura 3. Perfil de la adsorción del virus SA-11 a -- distintas cantidades de eritrocitos. El virus SA-11 - radioactivo (³⁵S metionina, 2.5 x 10³ cpm) fué incubado con distintas cantidades de eritrocitos durante 1 hora a 20°C. Después los eritrocitos fueron lavados 3 veces y secados en papel filtro para finalmente determinar radioactividad en un contador de centelleo. En las abscisas se indica el porcentaje de la radioactividad total adsorbida por los eritrocitos.

adsorbió totalmente, se determinó por electroforesis la composición proteica del virus adsorbido y no adsorbido. Como era de esperarse el virus adsorbido tiene la composición del virus completo mientras que el virus no adsorbido no tiene cápside externa (VP3 y VP7, Figura 4), la cual probablemente contiene los antígenos hemaglutinantes.

Este resultado está de acuerdo con la observación de que el virus SA-11 sin cápside externa -purificado por densidad boyante al centrifugar virus SA-11 tratado con EDTA en un gradiente de cloruro de cesio prácticamente no es capaz de adsorberse a eritrocitos (es decir, se adsorbe menos del 5%).

Para determinar la capacidad de adsorción a los eritrocitos de las proteínas aisladas se desagregó a los componentes de la cápside externa por tratamiento con EDTA y posteriormente se separaron de las partículas virales sin cápside externa por sedimentación en gradiente de sacarosa. La Figura 2 muestra una separación preparativa de las proteínas radioactivas (^{35}S metionina) del virus SA-11 por éste procedimiento. En éstas preparaciones se utilizó Tritón X-100, pues si se excluye éste detergente no iónico en cualquier paso del procedimiento, no se obtiene el pico del menisco que corresponde a las proteínas de la cápside externa (datos no mostrados). En ausencia de Tritón se ha observado que las proteínas quedan adheridas a las paredes de los tubos en que se maneja al virus luego del tratamiento con EDTA. No sabemos la causa de éste comportamiento de las proteínas externas, pero es posible que se deba a que estas sean muy hidrófobas.

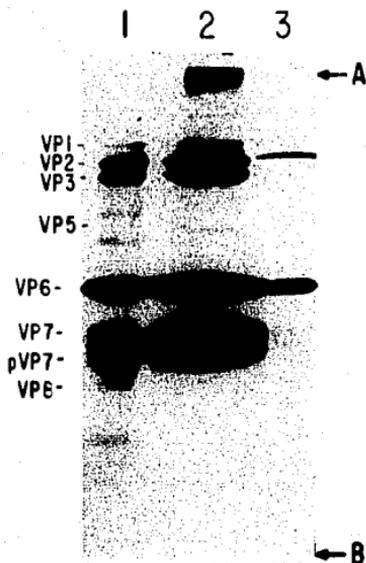


Figura 4. Electroforesis en gel de poliacrilamida del virus SA-11 adsorbido a eritrocitos. El virus SA-11 -- radioactivo (^{35}S metionina, 2.5×10^3 cpm) fué incubado con 2×10^7 eritrocitos durante 1 hora a 20°C . Después de la incubación se centrifugó la mezcla y se hizo electroforesis (según Laemli, 43) del sobrenadante y de los eritrocitos (lavados con FS). Carril 1, virus SA-11; - carril 2, virus SA-11 adsorbido a eritrocitos; carril 3, sobrenadante de la adsorción (1/4 del volumen total). Las flechas A y B indican el inicio y final del gel separador, respectivamente.

Una vez separados los polipéptidos de la cápside externa, se determinó la capacidad de éstos para adsorberse a eritrocitos, empleando el mismo procedimiento que con el virus completo. Sin embargo, se encontró que no hay adsorción a los eritrocitos de ninguno de los componentes de la cápside externa VP7 y VP3 o de su producto VP5 (Figura 5).

Debido a que una posible modificación de las proteínas de la cápside externa durante el procedimiento de purificación podría eliminar la capacidad de éstas para adsorberse a los eritrocitos, se hicieron experimentos de adsorción con virus tratado con EDTA sin purificaciones posteriores (Figura 6). El análisis de las proteínas adsorbidas revela la presencia de todas las proteínas de las partículas virales completas, pero los polipéptidos de la cápside externa se encuentran considerablemente disminuidos, especialmente el polipéptido VP7 (Figura 7).

En otros experimentos de adsorción con virus tratado con tripsina y luego con EDTA, se observa que el polipéptido VP8 no es detectable en el "virus incompleto" que se une a eritrocitos, sino permanece en el sobrenadante del medio de adsorción (datos no mostrados).

El material del virus tratado con EDTA que se adsorbe a eritrocitos probablemente consiste de partículas virales incompletas pero aún capaces de adsorberse a los glóbulos rojos, ya que las proteínas de la cápside externa -libres de partículas- o las partículas virales sin cápside externa no presentan esta capacidad. Estos resultados indican que las proteínas de la cápside externa requieren estar formando parte de las partículas virales para que sean capaces de mediar la adsorción a los

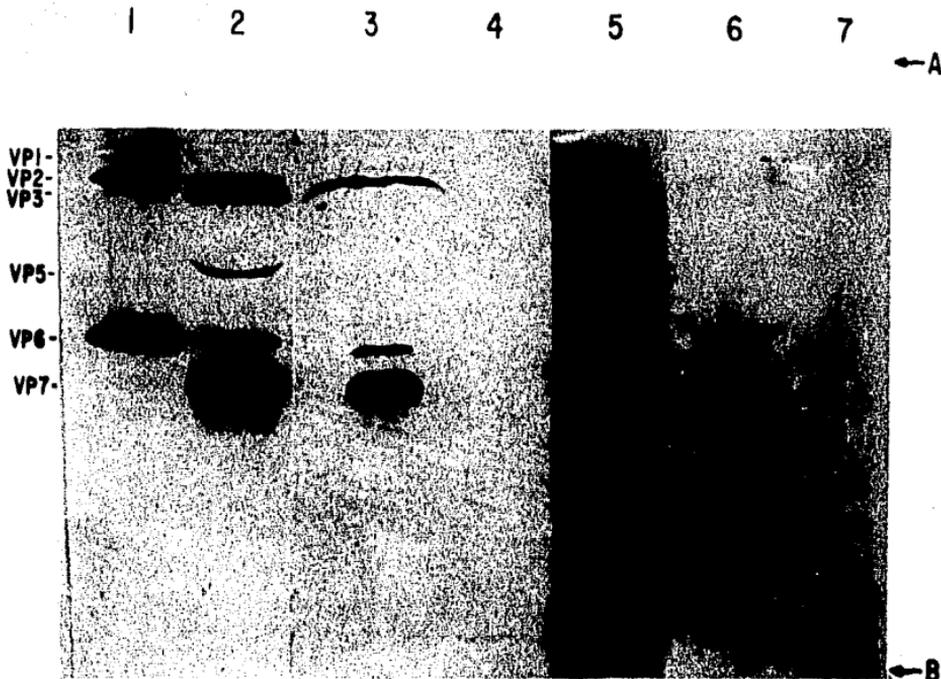


Figura 5. Electroforesis en gel de poliacrilamida de las proteínas de la cápside externa adsorbidas a eritrocitos. Se siguió el mismo procedimiento que en la figura 4. Carril 1, virus SA-11 sin cápside externa; carriles 2 y 5, proteínas de la cápside externa obtenidas a partir de virus no tratado y tratado con tripsina, respectivamente; carriles 4 y 7, proteínas adsorbidas a eritrocitos después de la incubación con proteínas de la cápside externa (^{35}S metionina, 1000 cpm) del virus no tratado y tratado con tripsina, respectivamente; carriles 3 y 6, sobrenadantes (1/4 del volumen total) de las adsorciones mostradas en los carriles 4 y 7, respectivamente (en estos carriles, la gran cantidad de albúmina presente distorsiona a VP3 y VP5). Las flechas A y B indican el inicio y final del gel separador, respectivamente. El carril 5 corresponde a una electroforesis (según Laemli, 43) hecha por separado.

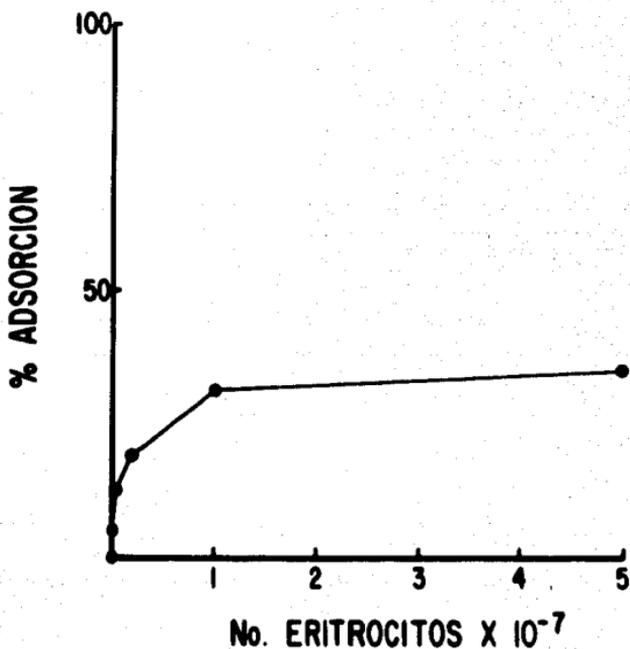


Figura 6. Perfil de la adsorción del virus SA-11 tratado con EDTA a distintas cantidades de eritrocitos. El virus radioactivo (³⁵S metionina, 4 x 10³ cpm) fué tratado con EDTA 10 mM durante 15 minutos en presencia de tritón 0.1%. Posteriormente se añadió MgCl₂ para lograr una concentración de 10 mM, y luego la mezcla fué incubada durante 1 hora con distintas cantidades de eritrocitos. Finalmente los eritrocitos fueron lavados y se determinó la radioactividad adsorbida.

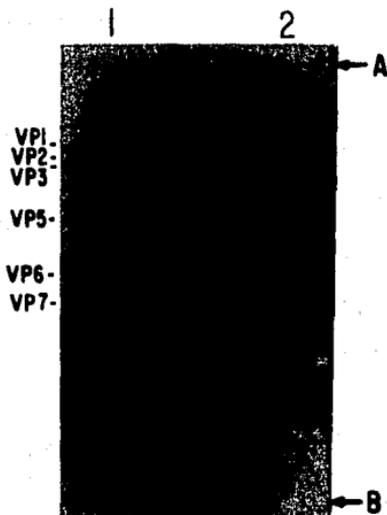


Figura 7. Electroforesis en gel de poliacrilamida del virus SA-11 tratado o sin tratar con EDTA y adsorbido a eritrocitos. El virus SA-11 radioactivo (^{35}S metionina, 1.5×10^3 cpm) fué tratado con EDTA (10 mM) y tritón (0.1%) durante 15 minutos. Posteriormente se añadió MgCl_2 para obtener una concentración de 10 mM, y la mezcla fué incubada con 2×10^7 eritrocitos durante 1 hora a 20°C . Finalmente se lavaron los eritrocitos y se les hizo electroforesis (según Laemli, 43). Carril 1, proteínas adsorbidas del virus tratado con EDTA; carril 2 proteínas adsorbidas del virus no tratado. Las flechas A y B indican el inicio y final del gel separador, respectivamente.

eritrocitos y, además, impide la identificación de la hemaglutinina del virus a través de la medición de la capacidad de los polipéptidos aislados para unirse a los eritrocitos.

B) Adsorción a Eritrocitos y a Células MA-104 de las Proteínas Obtenidas de Células Infectadas con el virus SA-11

Para evitar una posible modificación de las proteínas hamaglutinantes por la desagregación del virus con EDTA en presencia de detergente - que pudiera ser la causa de la pérdida de sus capacidades de adsorción o aglutinación de los eritrocitos - se determinó la capacidad de adsorción a glóbulos rojos de las proteínas estructurales presentes en células infectadas pero no ensambladas en viriones.

Este procedimiento se ha empleado para demostrar (Lee, P. et al., 50) que la proteína $\sigma 1$ de reovirus es responsable de la unión del virus a la célula huésped.

La técnica para liberar de partículas virales a las células infectadas es una modificación de la de Lee, P. et al. y consiste brevemente en sonicar y después ultracentrifugar por tres veces consecutivas. Es necesario observar que éstos sobrenadantes tienen una cantidad baja de VP7 (Figura 8) pues la mayoría de este sedimento con el virus.

Todos los polipéptidos estructurales que componen al virus se adsorbieron a los eritrocitos (Figura 9) y la proporción en que se encuentran indica que se trata de partículas virales. Como la eficiencia de adsorción fué de solo el 0.3% de las proteínas radioactivas presentes, es posible que el material adsorbido esté compuesto exclusivamente de par

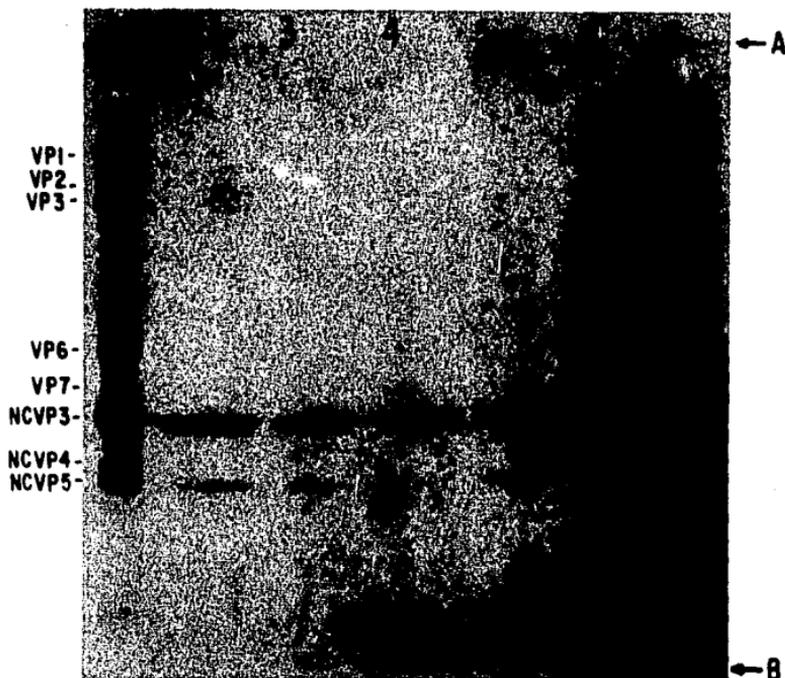


Figura 8. Electroforesis en gel de poliacrilamida de las proteínas de células infectadas con el virus SA-11 y adsorbidas a células MA-104, e inhibición de la adsorción con suero. Las proteínas radioactivas (^{35}S metionina) de células infectadas fueron ultracentrifugadas (3 veces consecutivas a $178\ 000 \times g$) y después -- fueron incubadas (6×10^5 cpm) con distintos sueros (dilución -- $1/5$) o con MEM durante 1 hora a 20°C . Posteriormente se añadió -- la mezcla a una monocapa de células MA-104 confluentes ($25\ \text{cm}^2$) y se incubó a 4°C durante 75 minutos. Finalmente la monocapa se lavó con PBS y se solubilizó con MD para hacer electroforesis (según Laemli, 43) de $1/3$ del volumen total. Carriles 1 y 6, proteínas de células infectadas (ultracentrifugadas); carril 7, proteínas de células infectadas; carriles 2 a 5, proteínas ultracentrifugadas adsorbidas a células MA-104: sin pretratamiento, carril 2; preincubadas con anti-SA-11 $1/5$, carril 3; preincubadas con anti-SA-11 $1/50$, carril 4; preincubadas con suero normal $1/5$, carril 5. Las flechas A y B indican el inicio y final del gel separador, -- respectivamente.

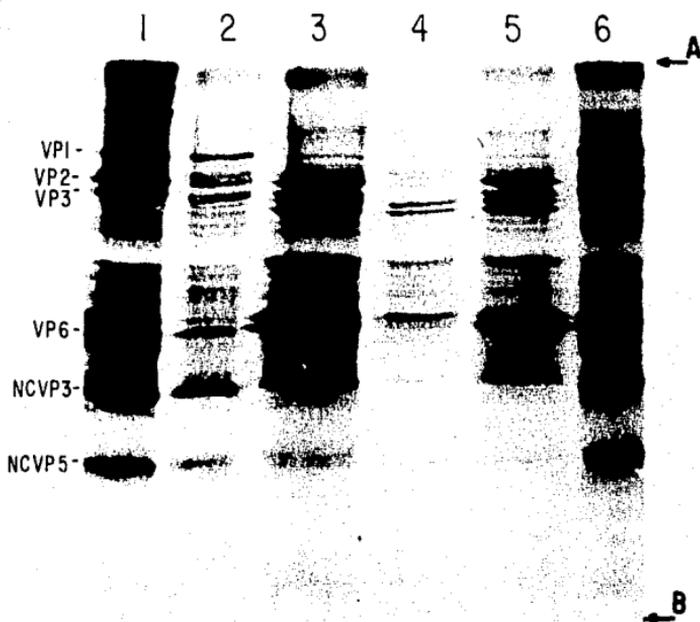


Figura 9. Electroforesis en gel de poliacrilamida de las proteínas de células infectadas con el virus SA-11 y adsorbidas a eritrocitos, e inhibición de la adsorción con suero. Las proteínas radioactivas (^{35}S metionina) de células infectadas fueron ultracentrifugadas (3 veces consecutivas a $178\ 000 \times g$) y después fueron incubadas (3×10^5 cpm) con distintos sueros (dilución 1/5) o con amortiguador FS durante 1 hora a 20°C . Posteriormente se lavaron los eritrocitos y se corrieron en electroforesis (según Laemli, 43). Carriles 1 y 6, proteínas de células infectadas no centrifugadas; carriles 3 a 5, proteínas centrifugadas adsorbidas a eritrocitos: sin tratamiento adicional, carril 3; preincubadas con anti-SA-11 1/5, carril 4- preincubadas con suero normal 1/5, carril 5.

tículas virales que prevalecen a pesar de la centrifugación.

Se determinó también la capacidad de adsorción de las proteínas de células infectadas a las células huésped MA-104, pues el virus usa probablemente el mismo receptor para unirse a ambos tipos de células. Causó sorpresa encontrar que a éstas células se adsorbieron los polipéptidos no estructurales NCV3 y NCV5 con una alta eficiencia (Figura 8). Esta adsorción es extraña en virtud de que son dos polipéptidos no estructurales y probablemente se trata de una adsorción no relacionada con la adsorción del virus.

Se confirmó que la adsorción de NCV3 y NCV5 a las células - MA-104 no está relacionada con la adsorción del virus por ensayos de inhibición de la adsorción de éstos polipéptidos con suero contra el virus purificado. En presencia de antisuero contra el virus no se observó inhibición de la adsorción de NCV3 y NCV5 con la cantidad máxima usada en - el ensayo (dilución 1:5, Figura 8), a pesar de que con ésta cantidad se - inhibió la adsorción de las proteínas estructurales del virus a los eritrocitos (Figura 9).

Podemos resumir que no hubo adsorción a los eritrocitos ni a las células MA-104 de las proteínas virales estructurales que no han sido ensambladas en partículas. Estos resultados coinciden con los que se obtuvieron al analizar la adsorción a eritrocitos de las proteínas de la -- cápside externa purificadas, por lo que la conclusión anotada en ambos -- casos se ve reforzada.

Médición de la Capacidad Hemaglutinante de Partículas Virales con Distinta Composición de Polipéptidos

También se intentaron otros dos enfoques, menos directos que los anteriores, con el objeto de entender el papel de los distintos poli-

péptidos estructurales en la hemaglutinación causada por SA-11.

El primero se basa en que es posible obtener partículas virales que carecen del polipéptido VP7 pero presentan un precursor no glicosilado de éste (pVP7) cuando se inhibe la glicosilación con el antibiótico tunicamicina en las células infectadas con SA-11 (51).

Las distintas partículas obtenidas de células infectadas en presencia de tunicamicina se purificaron por velocidad de sedimentación en un gradiente de sacarosa, y posteriormente se les determinó su actividad hemaglutinante (Figura 10) y su composición de polipéptidos (Figura 11). Las partículas del pico 3 que carecen de VP7 y contienen pVP7 son capaces de hemaglutinar, indicando que al menos los oligosacáridos de éste polipéptido no están implicados en la hemaglutinación.

Determinación de la Existencia de Proteínas Tipo Específicas y su Posible Correlación con la(s) Proteína(s) Responsable(s) de la Hemaglutinación

Los rotavirus aislados de distintas especies presentan una -- fuerte reacción antigénica cruzada por ensayos de fijación de complemento, contraimunoelectroforesis, etc. (48,52,53) pero pueden distinguirse claramente en ensayos de neutralización o de inhibición de la hemaglutinación (48,53). Esto indica que hay tanto determinantes antigénicos de grupo como determinantes antigénicos tipo específicos entre los rotavirus. - Los mismos resultados anteriores indican que la actividad hemaglutinante está constituida por antígenos tipo específicos. Por lo tanto se estudió la relación antigénica entre dos rotavirus con el fin de definir las proteínas con determinantes antigénicos de grupo y aquellas con determi--

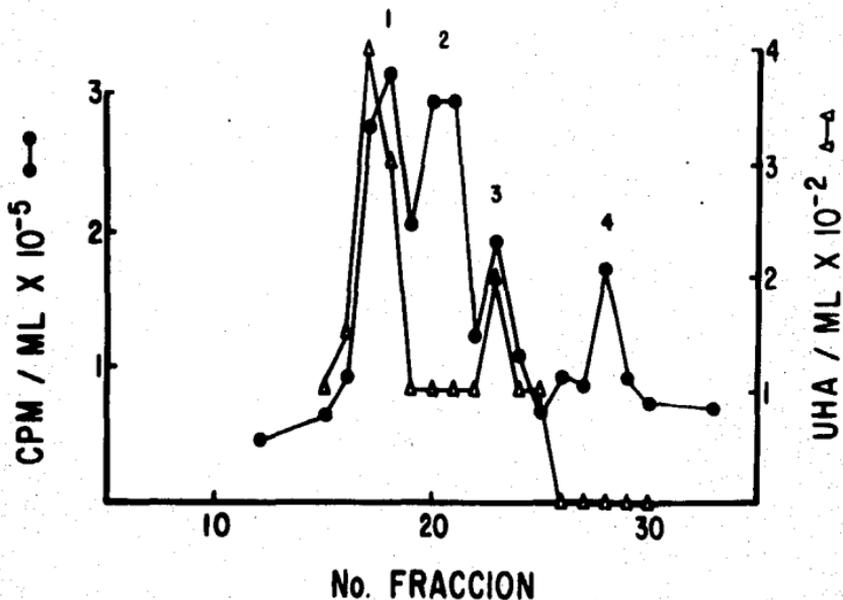


Figura 10. Distribución de las partículas virales (obtenidas de células infectadas con SA-11 en presencia de tunicamicina) y de su actividad hemaglutinante después de centrifugar en un gradiente de sacarosa. Las células fueron infectadas con SA-11 y al terminar el período de adsorción se les añadió ³⁵S metionina (33 µCi/ml). Seis horas después se les añadió tunicamicina (5 µg/ml). Finalmente, a las 24 horas -- post-infección, las células fueron homogenizadas y centrifugadas en un gradiente lineal de sacarosa 15-45% durante 1 hora a 34 000 rpm (en rotor SW40, Beckman). Después de la centrifugación se colectaron 45 fracciones y se dividió en tres partes -- cada una, para determinar radioactividad (cpm), actividad hemaglutinante (UHA) y -- composición de polipéptidos (Figura 11).

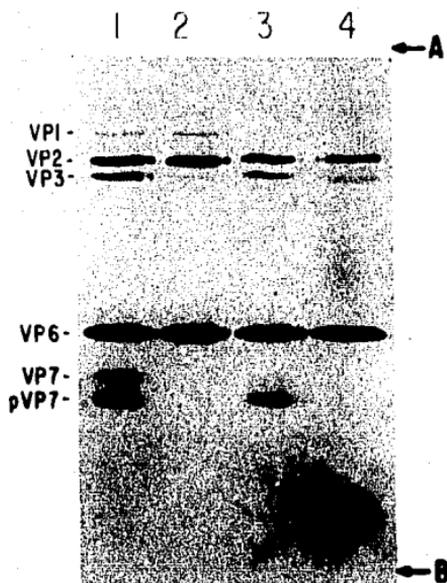


Figura 11. Electroforesis en gel de poliacrilamida (según Laemli, 43) de las partículas virales obtenidas de células infectadas con SA-11 en presencia de tunicamicina. - Se muestran los picos 1 al 4 -separados por centrifugación en gradiente de sacarosa- que muestra la figura 10. Las flechas A y B indican el inicio y final del gel separador, respectivamente.

nantes antigénicos tipo específicos, entre las cuales se encontraría la hemaglutinina.

En 1979 observamos (48) por contrainmunolectroforesis que los sueros contra distintos rotavirus presentan el mismo título al reaccionar contra los virus sin la cápside externa, por lo que al menos las proteínas -de la cápside interna- que quedan expuestas en el virus sin la cápside externa tienen principalmente determinantes antigénicos comunes. Por otro lado, al utilizar virus con cápside externa, encontramos una gran diferencia en título, por lo que las proteínas de la cápside externa presentan una reacción cruzada muy baja.

Con objeto de determinar el grado de reacción cruzada entre - cada una de las proteínas cognatas (equivalentes) de dos rotavirus, se hicieron ensayos de inmunoprecipitación utilizando proteínas virales desagregadas o proteínas virales aún no ensambladas, obtenidas de células infectadas.

Las proteínas marcadas con metionina ³⁵S obtenidas por uno de los tres métodos señalados en seguida, se hicieron reaccionar con los sueros, que en este caso fueron anti-SA-11 y anti-NCDV. Después de reaccionnar las proteínas con el suero, se precipitó la IgG con Staphylococcus -- aureus fijado y posteriormente se identificaron los polipéptidos immunoprecitados por electroforesis y fluorografía.

El primer método de obtención de proteínas desagregadas consistió en la purificación de las proteínas de la cápside externa de SA-11 por el procedimiento indicado anteriormente (ver Material y Métodos). Al reac

cionar contra estas proteínas, ambos sueros -usados a una sola concentración- mostraron una eficiencia de inmunoprecipitación similar (Figura 12).

A partir de la preparación de proteínas de la cápside externa, se aislaron los componentes VP7 y pVP7 por cromatografía en Sephadex -- (Figura 13). En la inmunoprecipitación de estos polipéptidos con distintas diluciones de anti-SA-11 y anti-NCDV encontramos que el suero heterólogo tuvo un título igual o ligeramente superior (Figura 14).

Posteriormente se utilizó, para la inmunoprecipitación, virus SA-11 tratado con EDTA, para liberar las proteínas de la cápside externa. Se observó que los componentes de la cápside externa precipitan en forma independiente de las partículas sin cápside externa (VP1, VP2 y VP6) cuyas proteínas obviamente precipitan unidas (Figura 15). En estas condiciones el título de ambos sueros -es decir la última dilución capaz de inmunoprecipitar- hacia los componentes de la cápside externa (VP7 y pVP7 - y VP3 o sus productos VP5 y VP8) es similar. Sin embargo, es posible diferenciar entre los sueros al comparar la avidéz de los anticuerpos, representada por las diluciones de los sueros que inmunoprecipitan el 50% de la cantidad máxima (la cantidad que precipita con la mayor concentración de suero usada en el ensayo). A través de este valor, Gaillard y -- Joklik compararon la reacción cruzada entre las proteínas cognatas de los reovirus (54) y concluyeron que el polipéptido σ 1 de estos virus -el cuál es la hemaglutinina (39,41) y el que determina el tipo en ensayos de neutralización (41,55)- es el que presenta la mayor cantidad de determinantes antigénicos tipo-específicos.

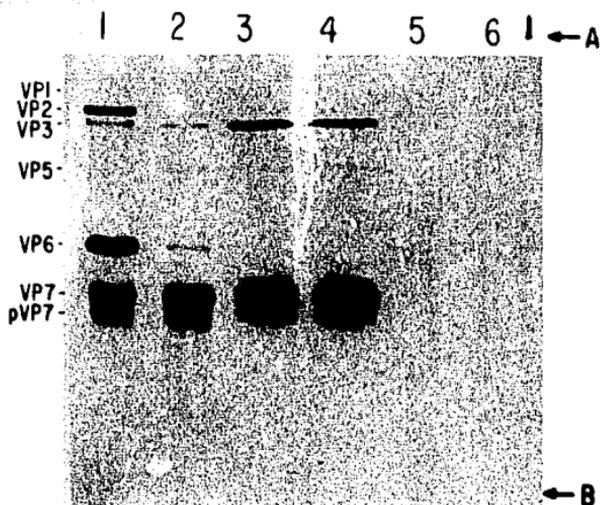


Figura 12. Electroforesis en gel de poliacrilamida de las proteínas de la cápside externa del virus SA-11 inmunoprecipitadas. Las proteínas de la cápside externa (^{35}S metionina, 5×10^3 cpm) provenientes de las fracciones 47-49 de la figura 2 fueron incubadas con distintos sueros (dilución 1/20) durante 1 hora a 20°C . Posteriormente se inmunoprecipitó la IgG con proteína A-Staphylococcus aureus, y se hizo electroforesis (según Laemmli, 43) a los inmunoprecipitados. Carril 1, virus SA-11; carril 2, proteínas de la cápside externa; carriles 3 a 6 inmunoprecipitación de las proteínas de la cápside externa con anti-SA-11, carril 3; anti NCDV, carril 4; anti RVH770, carril 5; suero normal, carril 6. Las flechas A y B indican el inicio y final del gel separador, respectivamente.

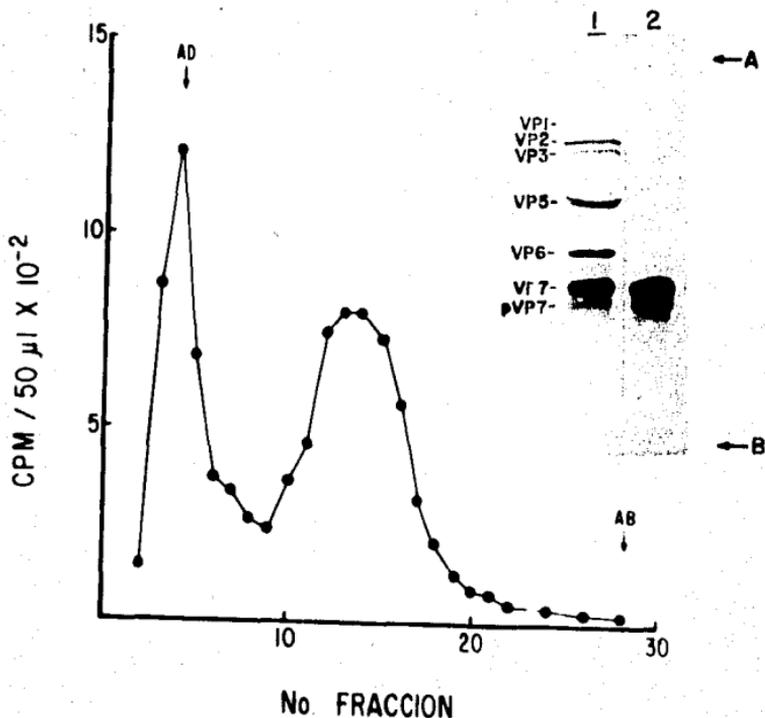


Figura 13. Cromatografía en Sephadex de las proteínas del virus SA-11 liberadas por EDTA. Las proteínas (³⁵S metionina, 4×10^5 cpm), obtenidas de las fracciones 47-49 de la figura 2, fueron aplicadas a una columna de Sephadex G-100 de 56×1.6 cm y eluidas con un flujo de 26 ml por hora en amortiguador TSETA. Se colectaron 28 fracciones de 1.3 ml. Las flechas AD y AB señalan la posición de los marcadores azul de dextrano y azul de bromofenol. El inserto a la derecha es la electroforesis en gel de poliacrilamida (según Laemli, 43) de las fracciones 4 (carril 1) y 14 (carril 2). Las flechas A y B indican el inicio y final del gel separador, respectivamente.

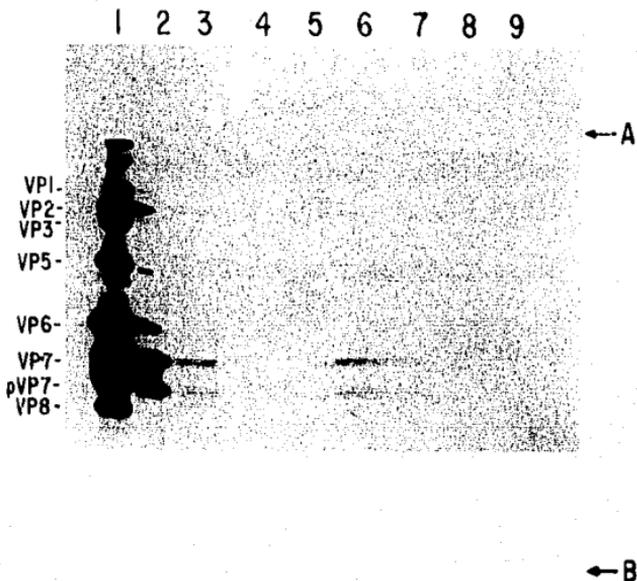


Figura 14. Electroforesis en gel de poliacrilamida de los polipéptidos VP7 y pVP7 inmunoprecipitados. Los polipéptidos VP7 y pVP7 (^{35}S metionina, 2×10^3 cpm) provenientes de las fracciones 12-15 de la figura 13, fueron incubados con distintas concentraciones de los antisueros durante 1 hora a 20°C . Posteriormente se inmunoprecipitó la IgG con proteína A-Staphylococcus aureus y se hizo electroforesis (según Laemmli, 43) de los inmunoprecipitados. Carril 1, virus SA-11; carril 2, polipéptidos VP7 y pVP7 (nótese que hubo contaminación del carril 1); carriles 3 a 9, inmunoprecipitaciones de los polipéptidos VP7 y pVP7 con: anti SA-11 1/200, carril 3; anti SA-11 1/2000, carril 4; anti SA-11 1/20000, carril 5; anti NCDV 1/200, carril 6; anti NCDV 1/2000, carril 7; anti NCDV 1/20000, carril 8; suero normal 1/200, carril 9. Las flechas A y B indican el inicio y final del gel separador, respectivamente.

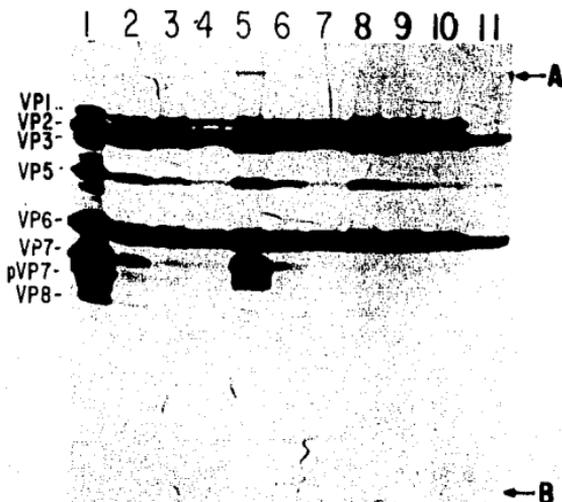


Figura 15. Electroforesis en gel de poliacrilamida del virus SA-11 tratado con EDTA e inmunoprecipitado. El virus radioactivo (^{35}S metionina, 5×10^5 cpm) fué tratado con EDTA 10 mM y tritón 0.1% durante 15 minutos. Posteriormente la mezcla fué incubada con varias diluciones de los sueros e inmunoprecipitada con proteína A-Staphylococcus aureus durante 1 hora. Finalmente se hizo electroforesis (según Laemli, 43) de las proteínas inmunoprecipitadas. Carril 1, virus SA-11; carriles 2 a 11, inmunoprecipitaciones del virus SA-11-EDTA con: anti-SA-11 1/200, carril 2; anti-SA-11 1/2000, carril 3; anti-SA-11 1/20000, carril 4; anti NCDV 1/200, carril 5; anti NCDV 1/2000, carril 6; anti NCDV 1/20000, carril 7; anti RVH770 1/200, carril 8; anti RVH770 1/2000, carril 9; anti RVH770 1/20000, carril 10; suero normal 1/200, carril 11. Las flechas A y B indican el inicio y final del gel separador, respectivamente.

Para determinar el título del suero que precipita el 50% del máximo, se cuantificaron las inmunoprecipitaciones del virus SA-11 tratado con EDTA, midiendo el perfil de absorbancia a 560 nm del fluorograma. Las diferencias que se obtienen al comparar de esta manera son aún bajas (cuadro 2), sin embargo, entre los polipéptidos de la cápside externa los polipéptidos VP7 y pVP7 son los que difieren en mayor grado.

El tercer procedimiento fué hecho con proteínas obtenidas de células infectadas con SA-11 y posteriormente tratadas con el detergente SDS para obtener tanto a los polipéptidos de la cápside externa como de la interna, libres de interacciones entre ellos. Sin embargo, el detergente SDS inhibe considerablemente la reacción antígeno-anticuerpo (56), por lo que fué necesario disminuir la concentración del detergente a 0.01%, ya que en estas condiciones la inhibición de la reacción antígeno-anticuerpo es mínima (57). De esta manera se observó que los títulos (es decir la última dilución capaz de precipitar) de los sueros anti-SA-11 y anti-NCDV contra los polipéptidos VP3 y VP6 fueron prácticamente iguales (Figura 16).

Resumiendo los resultados de inmunoprecipitación, concluimos que los distintos polipéptidos una vez desagregados mostraron casi igual reacción con el suero homólogo y heterólogo, pero a pesar de esto, los datos sugieren a VP7 y pVP7 como los polipéptidos con mayor proporción de determinantes antigénicos tipo-específicos.

CUADRO 2

CUANTIFICACION DE LA RELACION ANTIGENICA
ENTRE LAS PROTEINAS DE LA CAPSIDE EXTERNA
DE LOS ROTAVIRUS SA-11 Y NCDV

Proteína del virus SA-11	Antisuero contra	
	SA-11	NCDV
VP3	1830	1415
VP5	1271	1159
VP7	1218	754
pVP7	1307	702
VP8	1007	745

Los números son los recíprocos de las -
diluciones del suero que precipitan al
50% de la cantidad máxima (es decir, la
cantidad que precipita con la mayor con-
centración de suero usada en el ensayo).

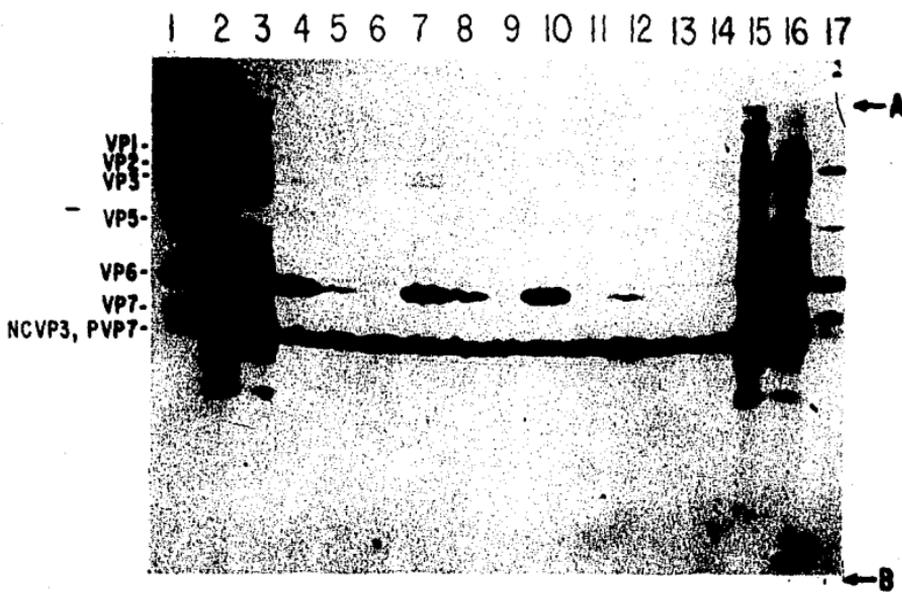


Figure 16. Electroforesis en gel de poliacrilamida de las proteínas de células infectadas con SA-11, tratadas con SDS 0.1% e inmunoprecipitadas. Las proteínas (³⁵S metionina, 5 x 10⁵ cpm) de células infectadas con SA-11 fueron tratadas con SDS 0.1%. Después de diluir 10 veces estas proteínas, se incubaron con distintas diluciones de los sueros durante 1 hora a 20°C y luego fueron inmunoprecipitadas con proteína A-Staphylococcus aureus. Finalmente se hizo electroforesis (según Laemli, 43) a los inmunoprecipitados. Carriles 1 y 17, virus SA-11; carriles 2 y 16, proteínas de células infectadas con SA-11; carriles 3 y 15, proteínas de células infectadas con SA-11 y tratadas con SDS (en estos carriles se omitió la mezcla disruptora); -- carriles 4 a 14, inmunoprecipitaciones (en SDS 0.01%) de las proteínas de células infectadas, en presencia de: anti SA-11 1/200, carril 4; anti SA-11 1/2000, carril 5; anti SA-11 1/20000, carril 6; anti-NCDV 1/200, carril 7; anti-NCDV 1/2000, carril 8; anti NCDV 1/20000, carril 9; anti RVH770 1/200, carril 10; suero normal 1/200, carril 11; anti RVH 213172, carril 12; anti RVH213172 1/2000, carril 13; anti RVH213172 1/20000, carril 14. El polipéptido NCPV3 precipitó en ausencia de antisuero por lo que posiblemente se adsorbe al Staphylococcus aureus. Las flechas A y B indican el inicio y final del gel separador, respectivamente.

DISCUSION

La desagregación de las proteínas de la cápside externa del virus SA-11 es condición suficiente para que estas pierdan tanto la actividad hemaglutinante que tenían al estar integradas en partículas como la capacidad de adsorberse a eritrocitos. Lo mismo se puede decir de las proteínas de la cápside externa presentes en el extracto de células infectadas y sin más tratamiento que la ultracentrifugación para liberar de partículas virales.

Hay dos explicaciones plausibles para estos resultados: la primera es que el sitio de unión esté formado por más de un polipéptido y la segunda, sugerida por la insolubilidad de las proteínas de la cápside externa en ausencia de detergente, es que estas proteínas tengan una conformación muy distinta cuando no forman parte de partículas virales debido a la exposición de una región hidrofóbica. Esta región hidrofóbica induciría cambios en la conformación de la proteína que permitieran minimizar su interacción con el agua.

La insolubilidad de proteínas estructurales en ausencia de detergente no había sido descrita en virus sin membrana lipídica y la posesión de glicoproteínas es sólo compartida con los reovirus (58) que pertenecen a la misma familia que los rotavirus, y posiblemente con otra familia de virus sin membrana, los adenovirus (59). Sin embargo, en estos dos últimos virus la glicosilación es menor y el enlace es de tipo O-glicosídico, a diferencia de las glicoproteínas de los rotavirus en los cuales es de tipo N-glicosídico (30). Estas características de los rotavirus, usuales

en virus con membrana, están de acuerdo con el modelo -basado en estudios de microscopía electrónica- que postula la adquisición de la cápside externa de los rotavirus através de su paso por una estructura membranosa, el retículo endoplásmico (24,25,26). Si las proteínas de cápside externa requieren estar incorporadas en el retículo endoplásmico, tanto para glicosidarse como para que pasen a formar parte de la cápside externa, deben tener una región hidrofóbica.

El método de obtención de las proteínas de la cápside externa por tratamiento con EDTA liberó también una baja cantidad de polipéptidos de la cápside interna. Estos polipéptidos se encuentran asociados en estructuras con peso molecular mayor que 100 000 daltones pues eluyen junto con el marcador azul de dextrano en Sephadex G-100.

No es necesaria la ruptura de VP3 en VP5 y VP8 para la hemaglutinación del virus SA-11 a pesar de que este rompimiento aumenta la infectividad. Tampoco son necesarios los carbohidratos de VP7 de los que carece pVP7. Esta última observación confirma los experimentos de Bastardo et al. que encontraron que el tratamiento del virus con RDE (enzima destructora del receptor de Vibrio colera) o periodato no eliminan la capacidad hemaglutinante del virus SA-11, a pesar de hidrolizar o modificar los carbohidratos y ser capaces de eliminar esta capacidad en otros virus que sí interaccionan con el eritrocito através de sus carbohidratos (60).

La aparente contradicción entre la baja reacción cruzada que muestran las proteínas de la cápside externa cuando forman parte de partículas virales y la alta reacción cruzada observada al utilizar las protef-

nas libres puede explicarse por la aparición de determinantes antigénicos comunes ocultos en las partículas virales pero expuestos en las proteínas libres. La posible causa de la alta reacción cruzada entre estos determinantes antigénicos es que a través de ellos interaccionan las proteínas de la cápside externa con las de la cápside interna, y estas son antigénicamente muy parecidas entre los distintos rotavirus. Esta explicación implica que los sueros hiperinmunes contienen anticuerpos contra una región de las proteínas de la cápside externa no expuesta en las partículas virales completas. El virus usado para inmunizar no contenía proteínas libres ya que fué purificado por densidad en gradientes de cloruro de cesio, pero es posible que haya ruptura dentro del animal de al menos una parte del virus inoculado.

A pesar de la pérdida de sensibilidad que se observó al medir la inmunoprecipitación de las proteínas libres, la comparación a través del título del suero que precipita al 50% del máximo, sugiere que los polipéptidos VP7 y pVP7 son los que presentan al menos la mayor proporción de determinantes antigénicos tipo específicos. La posibilidad de que la proteína hemaglutinante sea también la que presenta mayor cantidad de determinantes tipo específicos queda como una especulación para ser probada o, en su caso, descartada.

Podemos resumir que las propiedades bioquímicas e inmunológicas de las proteínas de la cápside externa que se han discutido sugieren que estas proteínas presentan tres dominios que son la zona hidrofóbica y las zonas de alta y de baja variabilidad antigénica; cada una de estas --

zonas tendría obviamente ubicación y funciones distintas.

El problema original no pudo ser resuelto por las circunstancias anotadas. Revisando otras metodologías posibles, cabe mencionar que una de ellas, la producción de sueros monoespecíficos, no parece muy apropiada porque requiere -de acuerdo con el esquema más socorrido- la purificación de las proteínas virales y la producción con estas proteínas de -- sueros hiperinmunes. Estas proteínas difícilmente serán buenas inductoras de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación debido a las alteraciones -aquí descritas- que sufren al ser separadas de las partículas virales. Con el conocimiento actual, parece que el enfoque de tipo inmunológico más adecuado para identificar tanto la proteína viral responsable de la hemaglutinación como la que reacciona con los anticuerpos neutralizantes, es la obtención de anticuerpos monoclonales capaces de inhibir la -- hemaglutinación o de neutralizar el virus, y determinar posteriormente con cuál o cuales proteínas reaccionan estos anticuerpos.

Recientemente Kalica et al. (61) demostraron que la proteína con la que reaccionan los anticuerpos neutralizantes segrega junto con el segmento de ARN 9 de los rotavirus de humano y bovino. Por otro lado, -- Arias et al. (30) demostraron que los segmentos de ARN 7, 8 y 9 codifican in vitro por dos proteínas no estructurales y por el precursor no glicosilado de VP7. Estas dos observaciones en conjunto sugieren fuertemente -- que la proteína con la que reaccionan los anticuerpos neutralizantes es -- la glicoproteína VP7. Por analogía con otros virus (33), esta proteína -- probablemente también sería la responsable de la hemaglutinación.

BIBLIOGRAFIA

1. Light, J. S. y Hodes, H. L. (1943). Studies on epidemic diarrhoea of the newborn: Isolation of a filterable agent causing diarrhoea in calves. *Am. J. Publ. Hlth.* 33, 1451-1454.
2. Kraft, L. M. (1957). Studies on the etiology and transmission of epidemic diarrhoea of infant mice. *J. Exp. Med.* 106, 743-745.
3. Adams, W. R. y Kraft, L. M. (1963). Epizootic diarrhoea of infant mice: identification of the etiologic agent. *Science* 141, 359-360.
4. Kraft, L. M. (1966). Epizootic diarrhoea of infant mice and lethal intestinal infection of infant mice. En: *Viruses of laboratory rodents*. Nat. Cancer Inst. Monogr. 20, 55-61.
5. Mebus, C. A., Underdahl, N. R., Rhodes, M. B. y Twiehaus, M. J. (1969). Calf diarrhoea (scours): Reproduced with a virus from a field outbreak. *Bull. Neb. Agric. Exp. Statn.* 233, 1-16.
6. Welch, A. B. (1971). Purification, morphology and partial characterization of a reovirus-like agent associated with neonatal calf diarrhoea. *Canadian J. of Comp. Med.* 35, 195-202.
7. Fernelius, A. L., Ritchie, A. E., Classick, K. G., Norman, J. O. y Mebus, C. A. (1972). Cell culture adaptation and propagation of a reovirus-like agent of calf diarrhoea from a field outbreak in Nebraska. *Archiv. für die gesamte Virusforschung* 37, 114-130.
8. Bishop, R. F., Davidson, G. P., Holmes, I. H. y Ruck, B. J. (1973). Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet* ii, 1281-1283.
9. Woode, G. N., Bridger, J. C., Hall, G. A. y Dennis, M. J. (1974). The isolation of a reovirus-like agent associated with diarrhoea in colostrum deprived calves in Great Britain. *Res. Vet. Sci.* 16, 102-105.

10. Woode, G. N., Bridger, J., Hall, G. A., Jones, J. M. y Jackson, G. (1976). The isolation of reovirus-like agents (rotaviruses) from acute gastroenteritis in piglets. *J. Med. Microbiol.* 9, 203-209.
11. Flewett, T. H., Bryden, A. S. y Davies, H. (1975). Virus diarrhea in foals and other animals. *Vet. Rec.* 96, 477.
12. Bryden, A. S., Thouless, M. E. y Flewett, T. H. (1976). Rotavirus in rabbits. *Vet. Rec.* 99, 323.
13. Tziposi, S. y Caple, J. W. (1976). Isolation of a rotavirus from deer. *Vet. Rec.* 99, 398.
14. Much, D. H. y Bajac, I. (1972). Purification and characterization of epizootic diarrhoea of infant mice virus. *Infect. Immun.* 6, 1019-1024.
15. McNulty, M. S., Allan, G. M., Pearson, G. R., McFerran, J. B., Curran, W. L. y McCracken, R. M. (1978). Reovirus like agent (rotavirus) from lambs. *Infect. Immun.* 14, 1332-1338.
16. Els, H. J. y Lecastas, G. (1972). Morphological studies on simian virus SA-11 and the related O agent. *J. Gen. Virol.* 17, 129-132.
17. Rodger, S. M., Schnagl, R. D. y Holmes, I. H. (1977). Further biochemical characterization, including the detection of surface glycoproteins, of human, calf and simian rotaviruses. *J. Virol.* 24, 91-98.
18. Flewett, T. H. y Woode, G. N. (1978). The rotaviruses. Brief review. *Arch. of Virology* 57, 1-23.
19. Malherbe, H. H. y Strickland-Cholmeley, M. (1967). Simian virus SA-11 and related O agent. *Arch. ges Virusforsch* 22, 235-245.
20. Wyatt, R. B., James, W. D., Bohl, E. H., Theil, K. W., Saif, L. J., Kalica, A. R., Greenberg, H. B., Kapikian, A. Z. y Chanock, R. M. (1980). Human rotavirus type 2: Cultivation in vitro. *Science* 207, 189-191.

21. Palmer, E. L., Martin, M. L. y Murphy, F. A. (1977). Morphology and stability of infantile gastroenteritis virus: Comparison with reovirus and bluetongue virus. *J. Gen. Virol.* 35, 403-414.
22. Bridger, J. C. y Woode, G. N. (1976). Characterization of two particle types of calf rotavirus. *J. Gen. Virol.* 31, 245-250.
23. Fauvel, M., Spence, L., Babiuk, K. A., Petro, R. y Bloch, S. (1978). Hemagglutination and hemagglutination-inhibition studies with a strain of Nebraska Calf Diarrhea Virus (bovine rotavirus). *Intervirology* 9, 95-105.
24. Carpio, M. M., Babiuk, L. A., Misra, V. y Blumenthal, R. M. (1981). Bovine rotavirus-cell interactions: Effect of virus interactions on cellular integrity and macromolecular synthesis. *Virology* 114, 86-97.
25. Altenburg, B. C., Graham, D. Y. y Estes, M. K. (1980). Ultra-structural study of rotavirus replication in cultured cells. *J. Gen. Virol.* 46, 75-85.
26. Holmes, I. H., Ruck, B. S., Bishop, R. F. y Davidson, G. P. (1975). Infantile enteritis viruses: Morphogenesis and morphology. *J. Virol.* 16, 937-943.
27. Rodger, S. M., Schnagl, R. D. y Holmes, I. H. (1975). Biochemical and biophysical characteristics of diarrhoea viruses of human and calf origin. *J. Virol.* 16, 1229-1235.
28. Schnagl, R. D. y Holmes, I. H. (1976). Characteristics of the genome of human infantile gastroenteritis virus (rotavirus). *J. Virol.* 19, 267-270.
29. Espejo, R. T., Lopez, S. y Arias, C. (1981). Structural polypeptides of simian rotavirus SA-11 and the effect of trypsin. *J. Virol.* 37, 156-160.

30. Arias, C. F., López, S. y Espejo, R. T. (1982). Gene protein products of SA-11 simian rotavirus genome. *J. Virol.* 41, 42-50.
31. Graham, D. Y. y Estes, M. K. (1980). Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: Biologic mechanisms. *Virology* 101, 432-439.
32. Clark, S. M., Roth, J. R., Clark, M. L., Barnett, B. B. y Spendlove, R. S. (1981). Trypsin enhancement of rotavirus infectivity: Mechanism of enhancement. *J. Virol.* 39, 816-822.
33. Choppin, P. R. y Scheid, A. (1980). The role of glycoproteins in adsorption, penetration and pathogenicity of viruses. *Reviews of Inf. Dis.* 2, 40-61.
34. Hirst, G. K. (1942). Quantitative determination of influenza virus and antibodies by means of red cell agglutination. *J. Exper. Med.* 75, 49-64.
35. Lazarowitz, S. G. y Choppin, P. W. (1975). Enhancement of the infectivity of influenza A and B viruses by proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide. *Virology* 68, 440-454.
36. Maeda, T., Kawasaki, K. y Shun-ichi, O. (1981). Interaction of influenza virus hemagglutinin with target membrane lipids is a key step in virus induced hemolysis and fusion at pH 5.2. *Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.)* 78, 4133-4137.
37. Laver, W. G. (1964). Structural studies on the protein subunits from three strains of influenza virus. *J. Mol. Biol.* 9, 109-124.
38. Merz, D. C., Scheid, A. y Choppin, P. W. (1981). Immunological studies of the functions of paramyxovirus glycoproteins. *Virology* 109, 94-105.
39. Weiner, H. L., Ramig, R. F., Mutsoe, T. A. y Fields, B. N. (1978). Identification of the gene coding for the hemagglutinin of reoviruses. *Virology* 86, 581-584.

40. Hayes, E. C., Lee, P. W., Miller, S. E. y Joklik, W. K. (1981). The interaction of a series of hybridoma IgGs with reovirus particles. Demonstration that the core protein λ 2 is exposed on the particle surface. *Virology* 108, 147-155.
41. Mutsoe, T. A., Ramig, R. F., Sharpe, A. H. y Fields, B. N. (1978). Genetics of reovirus: Identification of the dsRNA segments encoding the polypeptides of the μ and σ size classes. *Virology* 89, 594-604.
42. Smith, R., Zweerink, H. y Joklik, W. (1969). Polypeptide components of virus, top component and cores of reovirus type 3. *Virology* 39, 791-810.
43. Laemli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227, 680-685.
44. Bonner, W. M. y Laskey, R. A. (1974). A film detection method for tritium-labeled proteins and nucleic acids in polyacrilamide gels. *Eur. J. Biochem.* 46, 83-86.
45. Casals, J. (1967). Immunological techniques for animal viruses. En: *Methods in Virology* (editores: Maramorosch, K. y Koprowsky, H.) vol. III, pp 163-174. Academic Press, New York.
46. Kessler, S. W. (1975). Rapid isolation of antigens from cells with a staphylococcal protein A -antibody adsorbent: Parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A. *J. Immunol.* 115, 1617-1624.
47. Strauss, J. H. (1980). Técnicas de laboratorio para el I Curso Internacional de Virología. Inst. de Inv. Biomédicas, U.N.A.M.
48. Padilla, L. N. (1979). Estudio de la relación antigénica entre los rotavirus de humanos y los rotavirus de animales. Tesis para obtener el título de Licenciado en Investigación Biomédica, presentado en: Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado del Colegio de Ciencias y Humanidades, Universidad Nacional Autónoma de México.

49. Norrby, E. (1966). The relationship between the soluble antigens and the virion of adenovirus type 3. II. Identification and characterization of an incomplete hemagglutinin. *Virology* 30, 608-617.
50. Lee, P. W., Hayes, E. C. y Joklik, W. K. (1981). Protein σ 1 is the reovirus cell attachment protein. *Virology* 108, 156-163.
51. Musalem, C. Y. (1981). Efecto de la inhibición de la glicosilación en la replicación del rotavirus de simio SA-11. Tesis para obtener el título de Licenciada en Investigación Biomédica, presentada en: Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado del Colegio de Ciencias y Humanidades, Universidad Nacional Autónoma de México.
52. Kapikian, A. Z., Cline, W. L., Kim, H. W., Kalica, A. R., Wyatt, R. G., Vankirk, D. H., Chanock, R. M., James, H. D. y Vaughn, A. L. (1976). Antigenic relationships among five reovirus-like (RVL) agents by complement fixation (CF) and development of new substitute CF antigens for human RVL agent of infantile gastroenteritis. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 152, 535-539.
53. Thouless, M. E., Bryden, A. S., Flewett, T. H., Woode, G. N., Bridger, J. C., Snodgrass, D. R. y Herring, J. A. (1977). Serological relationships between rotaviruses from different species as studied by complement-fixation and neutralization. *Arch. Virol.* 53, 287-294.
54. Gaillard, G. K. y Joklik, W. K. (1980). The antigenic determinants of most of the proteins coded by the three serotypes of reovirus are highly conserved during evolution. *Virology* 107, 533-536.
55. Weiner, H. L. y Fields, B. N. (1977). Neutralization of reovirus: The gene responsible for the neutralization antigen. *J. Exper. Med.* 147, 1305-1310.
56. Qualtiere, L. F., Anderson, A. G. y Meyers, P. (1977). Effects of ionic and non ionic detergents on antigen-antibody reactions. *J. Immun.* 119, 1645-1651.

57. Dimitriadis, G. J. (1979). Effect of detergents on antibody-antigen interactions. *Ann. Biochem.* 98, 445-451.
58. Krystal, G., Perrault, J. y Graham, A. F. (1976). Evidence for a glycoprotein in reovirus. *Virology* 72, 308-321.
59. Ishibashi, M. y Maizel, J. V. Jr. (1974). The polypeptides of adenovirus. VI. Early and late glycopeptides. *Virology* 58, 345-361.
60. Bastardo, J. W. y Holmes, I. H. (1980). Attachment of SA-11 rotavirus to erythrocyte receptors. *Inf. Imm.* 29, 1134-1140.
61. Kalica, A. R., Greenberg, H. B., Wyatt, R. G., Flores, J., Sereno, M. M., Kapikian, A. Z. y Chanock, R. M. (1981). Genes of the human (strain Wa) and bovine (strain UK) rotaviruses that code for neutralization and subgroup antigens. *Virology* 112, 385-390.