



Universidad Nacional Autónoma de México

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES  
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO  
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN DE DISTINTAS REGIONES DE LA PROTEÍNA DE  
SUPERFICIE VP3 DEL ROTAVIRUS SA11, SINTETIZADAS  
EN *E. COLI*.**

Tesis que para obtener el grado de Maestra en  
Investigación Biomédica Básica

presenta

**MARCELA LIZANO SOBERON**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

03062  
2ej.  
7



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## INDICE

<b>I. INTRODUCCION</b> .....	1
<b>II. ANTECEDENTES</b> .....	10
<b>III. OBJETIVO</b> .....	11
<b>IV. MATERIALES Y METODOS</b> .....	12
<b>V. RESULTADOS</b> .....	20
1. Construcción del plásmido pUMA451ML y expresión del gene 4(3').	
2. Detección de epítopes virales en la proteína p57.	
3. Estabilidad en <i>E. coli</i> de las proteínas recombinantes.	
4. Efecto inhibitor del crecimiento bacteriano.	
5. Formación de cuerpos de inclusión por la proteína MS2-VP8'.	
6. Capacidad hemaglutinante de MS2-VP8' y MS2-VP5.	
7. Inmunogenicidad de las proteínas de fusión MS2-VP8' y MS2-VP5'.	
8. Neutralización heterotípica.	
9. Sensibilización de la respuesta inmune.	
<b>VI. DISCUSION</b> .....	30
<b>FIGURAS</b> .....	37
<b>TABLAS</b> .....	51
<b>REFERENCIAS</b> .....	56

## I. INTRODUCCION

La diarrea es una enfermedad tan antigua y común, que tanto la población como los servicios de salud lo ven ya como algo natural e inevitable. La complicación principal de esta enfermedad es la deshidratación, la cual ocasiona un elevado número de defunciones en países donde prevalecen el mal saneamiento y la desnutrición (1). Tan sólo en 1982 la Organización Mundial de la Salud reportó la muerte por diarrea de 4.6 millones de niños menores de 5 años de edad en Asia, Africa y America Latina (2). Ese mismo año en México, las enfermedades infecciosas intestinales ocuparon el primer lugar entre las causas de mortalidad en niños de 1 a 4 años y el segundo en menores de 1 año, superadas solamente por las infecciones respiratorias agudas (3).

Aunque puede ser provocada por causas diversas, en nuestro país predomina la diarrea de etiología infecciosa. Quince años atrás la causa de la mayoría de las diarreas en la población infantil no podía identificarse (4). Sin embargo, el empleo del microscopio electrónico permitió identificar virus asociados a gastroenteritis, los cuales no crecen fácilmente en cultivos celulares. En la actualidad, se sabe que los virus son los agentes infecciosos más comunes que causan diarrea en niños menores de 2 años.

De esta manera se describieron los adenovirus entéricos, los astrovirus, los coronavirus (5), y en 1972 Kapikian (6) logró identificar a los virus Norwalk.

Un año mas tarde, Bishop y colaboradores (7) informaron el hallazgo de rotavirus en células de mucosa intestinal obtenida de biopsias de niños que presentaban gastroenteritis aguda no bacteriana. Desde entonces han aparecido reportes en todo el mundo que acreditan a los rotavirus como el grupo de virus más importante asociado a episodios diarreicos en niños (5,8-12). En algunos países han sido causantes de hasta el 50% de los casos de diarrea infantil (4). Cabe mencionar que estos virus también se han detectado en las crías de otras especies de mamíferos y en aves (13).

Desde la primera descripción de los rotavirus a la fecha, las investigaciones en este campo han avanzado enormemente. En México, R. Espejo y col. realizaron los primeros estudios epidemiológicos sobre este tipo de virus (14,15). En ellos demuestran que los rotavirus son responsables de aproximadamente el 25% de los casos de diarrea en niños menores de 3 años que, por el alto grado de deshidratación que llegan a alcanzar, requieren de hospitalización. Apuntan que la mayor incidencia de gastroenteritis causada por rotavirus se presenta en los meses más fríos del año, provocando brotes epidémicos (16,17).

Los rotavirus son altamente infecciosos y sobreviven períodos largos de tiempo en el medio ambiente (18). Están presentes en gran número en las heces de los pacientes con diarrea y se contagian de persona a persona, aparentemente por medio de la vía oro-fecal. La enfermedad tiene un período de incubación de 1 a 3 días. Las manifestaciones clínicas de la infección incluyen fiebre, vómito y diarrea deshidratante que puede llegar a ser fatal (19).

Las infecciones por rotavirus ocurren en todas las edades, sin embargo, las de sintomatología clínica más severa se presentan en niños de 6 a 24 meses de edad (20). En niños mayores de 3 años las infecciones generalmente son asintomáticas debido, probablemente, a que ya han desarrollado anticuerpos antirotavirus (4).

Ante esta situación aparecen como tareas ineludibles el desarrollo de medidas no sólo terapéuticas, sino también y sobretodo preventivas, tendientes a evitar la diseminación de los rotavirus, tales como: el mejoramiento de las condiciones sanitarias en general; la educación en las zonas de alto riesgo, incluidas las campañas de rehidratación oral; y la obtención de una vacuna eficiente destinada a los niños menores de dos años.

Hasta hace poco resultaba difícil propagar *in vitro* algunos tipos de rotavirus, por ello gran parte de la información con la que se cuenta está basada en el rotavirus de simio SA11, que fue uno de los primeros que logró cultivarse *in vitro* en células de riñón de mono. Sin embargo, ahora el conocimiento de que la infectividad en cultivos celulares puede ser activada con enzimas proteolíticas, ha permitido propagar diversos tipos de rotavirus, incluyendo a los obtenidos de humano (21,22).

Los rotavirus son partículas icosaédricas con un diámetro de aproximadamente 70 nm (23). Pertenecen a la familia *Reoviridae* y están constituidos por un genoma segmentado de RNA de doble cadena, envuelto por una doble cápside protéica (24). El genoma viral consiste en 11 segmentos, que al separarse en geles de poliacrilamida, forman perfiles característicos de la cepa de rotavirus de la cual proceden (25,26).

La infectividad de los rotavirus depende de la presencia de la capa externa, ya que cuando los virus son convertidos a partículas de capa sencilla, mediante el tratamiento con agentes quelantes de metales bivalentes, dejan de ser infecciosos (27). Sin embargo, una vez dentro de la célula, se requiere de la pérdida de la capa externa para que se inicie la transcripción del genoma viral. Esta función la lleva a cabo una polimerasa de RNA asociada a la partícula de capa sencilla (28). El microscopio electrónico ha permitido observar cierto tipo de canales en la capa interna (29), que pudieran estar involucrados en el transporte de

los metabolitos requeridos para la transcripción y en la salida de las cadenas nacientes de RNA.

Los rotavirus se componen de, cuando menos, cinco proteínas estructurales: VP1, VP2 y VP6 corresponden a la capa interna y VP3 y VP7 forman la capa externa (30). Recientemente se ha sugerido que la capa interna contiene 4 y no 3 proteínas (31).

Estudios recientes sobre la estructura de los rotavirus, determinada por microscopía electrónica, han revelado que las partículas virales presentan peplómeros en su superficie (29). Venkataram y col. (29) sugieren que estos peplómeros, con longitud de 45 Å a 60 Å, corresponden a regiones sobresalientes de la molécula de VP3.

Las infecciones por rotavirus inducen un amplio espectro de anticuerpos hacia componentes estructurales y no estructurales del virus. Todas las cepas hasta hoy analizadas comparten al menos un determinante antigénico común, llamado antígeno de grupo, mediante diversos métodos genéticos e inmunológicos, este determinante se ha identificado en el polipéptido más abundante de la capa interna, VP6 (32,33). En forma semejante, en VP6 se han localizado los determinantes específicos de subgrupo (34). Hoy en día se han diferenciado por lo menos dos subgrupos (35).

Por otro lado, los epítopes contra los cuales reaccionan los anticuerpos que neutralizan la infectividad viral se encuentran en las dos proteínas de la capa externa, VP3 y VP7 (36,37). Estos determinantes antigénicos han permitido clasificar a los rotavirus aislados de humano en por lo menos seis serotipos (38,39). Se ha encontrado que ciertos rotavirus de humano y de animales comparten la especificidad de serotipo. Tal es el caso del rotavirus de simio SA11 que es inmunológicamente semejante, si no idéntico, a los virus humanos pertenecientes al serotipo 3.

La electroforesis es un método ampliamente usado para el estudio de la epidemiología de los rotavirus (40,41). El análisis de estos virus se hace en base a la distinta movilidad electroforética que presentan los 11 segmentos de RNA de doble cadena de cada cepa. En las cepas aisladas de humano se ha revelado la existencia de dos patrones característicos de migración del RNA: uno "corto" con desplazamiento lento de los segmentos 10 y 11; y otro "largo", donde el movimiento de dichos segmentos es rápido. Estos dos patrones de RNA están relacionados con las especificidades antigénicas de subgrupo y serotipo: los rotavirus con patrones "cortos" de RNA pertenecen al subgrupo I y al serotipo 2, y aquéllos con patrones "largos", al subgrupo II y serotipos 1, 3 ó 4 (42,43).

Dada la naturaleza segmentada del RNA viral, los genes de rotavirus se intercambian frecuentemente durante una co-infección *in vitro* (44) o *in vivo* (45). El análisis de los rotavirus obtenidos con genes rearrreglados ha brindado mucha de la información que actualmente se tiene sobre las propiedades funcionales de sus productos genómicos (46). Asimismo, la traducción *in vitro* de los segmentos separados de RNA viral ha permitido determinar cuál es la proteína codificada por cada uno de los genes (47,48).

Merced a este análisis se ha demostrado que: el cuarto segmento de RNA viral codifica para VP3, la hemaglutinina del virus (49); el sexto para VP6, el principal antígeno de grupo (50,51,52); y el séptimo, octavo o noveno segmento, dependiendo de la cepa viral, para VP7, el principal antígeno de neutralización (37,50,52) (fig. 1). Las otras proteínas de capa interna, VP1 y VP2, están codificadas por los segmentos 1 y 2, respectivamente (47). Información reciente señala que el gene 3 codifica para una proteína también contenida en la capa interna (31).

En el análisis funcional y estructural de los rotavirus, los anticuerpos monoclonales han sido de gran utilidad. Así, se observa que cuando estos anticuerpos van dirigidos contra VP3 (el producto del cuarto gene viral), presentan actividad neutralizante e inhibidora de la hemaglutinación (37,51,53); cuando los anticuerpos monoclonales son específicos de grupo y subgrupo, reconocen a VP6, producto del gene 6 (36); mientras que cuando están dirigidos contra VP7 presentan una alta actividad neutralizante (37,53,54,55).

Hallazgos más recientes demuestran que no sólo los determinantes de neutralización de VP7 intervienen en la especificidad del serotipo sino que, en forma independiente, VP3 también contiene epítopes que desempeñan un papel importante en esta tipificación (56,57). Esto sugiere la necesidad de una reclasificación, un sistema que permita identificar las diversidades antigénicas presentes en VP3 y en VP7 de cada cepa de rotavirus.

Con el fin de entender la respuesta inmune protectora del huésped en una infección por rotavirus, muchos estudios se han avocado a la caracterización de VP3 y VP7. Un conocimiento detallado de estas proteínas, responsables de la neutralización de la infectividad viral *in vitro* y de la protección *in vivo*, puede ser relevante para el desarrollo de una vacuna eficiente.

VP7 es la proteína más abundante de la capa externa, su peso es de 38 KDa y está glicosilada con oligosacáridos de "alta manosa" (47). Ciertos estudios han demostrado que VP7 es la proteína por medio de la cual el virus se adsorbe a células de riñón de mono en cultivo (58,59). VP7 ha sido identificada como el producto de la traducción del segmento

9 de las cepas de rotavirus de simio SA11, de humano Wa y Hu5, de bovino NCDV; del segmento 8 del rotavirus bovino UK; y del segmento 7 del rotavirus de simio MMU (60,61,62). Esta proteína es una de las responsables de la neutralización específica de serotipo *in vitro* e *in vivo* (37,58,63,64).

Trabajos de mapeo con anticuerpos monoclonales neutralizantes han identificado 3 regiones de VP7 que están involucradas en la neutralización (65). Dos de estas regiones, aunque alejadas en la secuencia lineal (aminoácidos 87 a 96 y aminoácidos 211 a 223, respectivamente), parecen formar un epítoto conformacional inmunodominante.

VP3, la otra proteína de la capa externa, tiene un peso de 88 KDa. Es la hemaglutinina viral (49) y está codificada por el gene 4 (47). Se ha demostrado que este polipéptido tiene la misma potencia para inducir anticuerpos neutralizantes que VP7, tanto en inmunizaciones por vía oral, como parenteral (45,56,57,66). Además de producir una inmunidad protectora en animales (86,67), VP3 es inmunogénica en humanos (68,69).

Algunos estudios genéticos han establecido que el cuarto gene de los rotavirus es el responsable de la limitación del crecimiento *in vitro* y que al ser sustituido por el gene correspondiente de la cepa cultivable, se hace posible que los rearreglantes de rotavirus crezcan eficientemente (49,50).

Por otro lado, Offit y col. (70) demostraron en un sistema murino, que el segmento 4 de RNA determina las diferencias de virulencia entre dos cepas de rotavirus animales. Aparentemente este gene también es responsable de la virulencia de distintos rotavirus aislados de humano (71,72).

Cuando las partículas virales son tratadas con tripsina, VP3 se corta específicamente generando dos proteínas: VP5 (60 KDa) y VP8 (28 KDa). Este rompimiento da lugar a un incremento de la infectividad viral (73,74), aparentemente asociado con el paso del virus a través de la membrana plasmática (75).

La secuencia de aminoácidos de la proteína VP3 del rotavirus SA11 se pudo deducir a partir de la secuencia de nucleótidos de una copia de cDNA del gene 4 (76,76a). Con tal información, y junto con la secuenciación del extremo amino terminal de los fragmentos VP5 y VP8, se determinó que el corte con tripsina puede ocurrir en cualquiera de dos argininas localizadas en las posiciones 241 y 247.

Todas las proteínas VP3 hasta hoy estudiadas (provenientes de distintas cepas de rotavirus) contienen ambas argininas en la posición señalada. Por otro lado, las secuencias

de aminoácidos adyacentes a los sitios de corte con tripsina se encuentran altamente conservadas entre rotavirus de distintas especies y serotipos (77). Todo esto sugiere que esta región de VP3 está involucrada en un paso importante durante el proceso de infección de los rotavirus.

No se conoce el mecanismo preciso por el cual este rompimiento proteolítico da lugar al aumento de la infectividad viral. Kaljot y col. (75) proponen que el tratamiento con tripsina convierte a los virus en partículas infecciosas, susceptibles de penetrar directamente en la membrana plasmática.

Análogamente, el tratamiento con quimotripsina del reovirus tipo 3 se asocia con un aumento en la infectividad en células L de ratón (78). La microscopía electrónica, ha evidenciado la correlación entre este aumento y la penetración directa del virus a través de la membrana celular. Por lo tanto, esta manera de infectar, dependiente de proteasas, puede ser un mecanismo común entre la familia *Reoviridae*.

La activación en los rotavirus, debido al rompimiento de VP3 por tripsina, es análoga a la activación de los orto y paramixovirus, donde se requiere que la hemaglutinina y la proteína de fusión, respectivamente, sean procesadas por tripsina para que los virus sean infecciosos (79). Sin embargo, probablemente estos mecanismos sean diferentes, ya que el rompimiento de la proteína de fusión en los paramixovirus expone un nuevo extremo amino altamente hidrofóbico (80). Este extremo amino recién generado está altamente conservado entre los paramixovirus y tiene un papel importante durante la penetración del virus a la célula huésped. Esta afirmación encuentra su sustento en el hecho de que el mencionado proceso puede ser competido por péptidos homólogos al extremo amino (81).

En el caso de los rotavirus, ninguno de los extremos generados en VP3 por el corte con tripsina es netamente hidrofóbico (72,76,77). Además, oligopéptidos que mimetizan la nueva terminal amino, no compiten la entrada del virus infeccioso a la célula (82,83). Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que las interacciones de VP3 con la membrana celular pudieran ocurrir en regiones hidrofóbicas lejanas al sitio de corte. De acuerdo con este punto, Mackow y col. (84) encontraron en VP5 una región cuya secuencia de aminoácidos es similar al sitio propuesto como el responsable de la fusión en proteínas de los virus semliki forest y sindbis. Esto va de acuerdo con la hipótesis de que VP3 está involucrada en la entrada del rotavirus a la célula.

Los anticuerpos dirigidos contra VP3 inhiben la hemaglutinación viral (34,37), neutralizan al virus *in vitro* (34,53) y protegen pasivamente a ratones contra el reto de rotavirus del

mismo y de diferentes serotipos (84). El estudio de los epítopes de neutralización en VP3, especialmente de aquéllos involucrados en la neutralización heterotípica, resulta esencial en el desarrollo de una vacuna efectiva.

Mediante el análisis de variantes antigénicas de rotavirus, seleccionadas por su capacidad de crecer en presencia de anticuerpos monoclonales neutralizantes, Mackow y col. (84) identificaron cinco regiones de neutralización en VP8 y una en VP5. La región en VP5 (aminoácidos 388 y 393) resulta de gran interés puesto que se identificó con tres anticuerpos monoclonales que neutralizaban a varios serotipos de rotavirus y coincide con la zona hidrofóbica que representa al sitio de fusión potencial. Por ello, esta región pudiera estar conservada entre virus de distintos serotipos y desempeñar un papel importante en el inicio de la infección viral.

La identificación de las regiones antigénicamente conservadas en VP3 que participan en la neutralización viral, es importante para el diseño de una futura estrategia de inmunización contra rotavirus, sea con proteínas o con péptidos sintéticos.

Ha habido algunos progresos encaminados a la producción de vacunas para combatir a los rotavirus utilizando los métodos tradicionales. Hasta hoy, la estrategia de vacunación más utilizada ha sido el uso de rotavirus animales que están naturalmente atenuados para el hombre, pero que comparten características antigénicas con rotavirus de humano. Así, se han desarrollado dos posibles vacunas: la primera es RIT 4237, que se deriva de la cepa NCDV de bovino y está adaptada a crecer en cultivo. Esta cepa, induce seroconversión en humanos, pero con títulos relativamente bajos (85). Cuando se probó en niños finlandeses, los resultados obtenidos fueron satisfactorios (86); sin embargo, dada la alta dosis viral requerida, su producción resulta incoesteable en países subdesarrollados. Por otro lado, en las pruebas realizadas en estos países, la efectividad de esta vacuna resultó de un nivel mucho menor (87). Esta disminución se agravó por la aparente interferencia de una previa vacunación con poliovirus (88).

La segunda posible vacuna para humano es la cepa MMU 18006 (RRV), derivada de un rotavirus que fue aislado de un mono rhesus (89). Esta cepa es similar si no idéntica a los rotavirus humanos pertenecientes al serotipo 3 y por ser más inmunogénica que la RIT 4237, puede utilizarse en dosis menores resultando más económica. La cepa RRV está menos atenuada que RIT 4237 y ocasionalmente causa respuestas febriles significativas en niños inmunizados (85,90). En los estudios realizados en Venezuela (91) las reacciones adversas

fueron menores que en las reportadas en E.U.A. debido, presumiblemente, a las diferencias en inmunidad pr existente que presentan las poblaciones.

Actualmente, los estudios con animales de crianza dejan a un lado la inmunización activa y se enfocan primordialmente a la protección pasiva. Esta última consiste en la administración de la vacuna a hembras gestantes para que eleven sus niveles de anticuerpos en el calostro y la leche, esperando que los animales lactantes se protejan pasivamente en el período de mayor sensibilidad a la infección. En becerros y en cerdos, este período parece ubicarse previo al destete. mediante este procedimiento se han obtenido algunos logros, especialmente en ganado vacuno (92,93). Sin embargo, en los niños el período de mayor sensibilidad a la infección ocurre posterior a la lactancia, entre los seis meses y los dos años de edad, por lo que en muchos países esta protección pasiva no resulta práctica.

Los estudios sobre inmunidad activa generalmente reportan una proteccion específica para el serotipo de rotavirus utilizado como vacuna, con una pobre o ninguna protección heteróloga. Dado el problema que representa la complejidad serológica de los rotavirus en la inmunización, recientemente se ha analizado la posible protección, en animales de experimentación, que pueden brindar cepas de virus rearrreglantes que intercambien genes derivados de serotipos distintos (66,67). En estos estudios se ha visto que la infección con un rotavirus rearreglante que contenga los antígenos de neutralización VP3 y VP7 derivados de dos virus de diferentes serotipos, induce inmunidad hacia los dos virus originales.

Hasta el momento, se han aislado rotavirus pertenecientes a once serotipos diferentes (seis de humano). Sin embargo, las cepas de rotavirus aisladas de humano sólo se han logrado crecer a bajo título. Esto constituye un obstáculo técnico importante para el desarrollo de vacunas efectivas, siguiendo las rutas tradicionales con virus atenuados o inactivados.

La tecnología del DNA recombinante, encaminada a la producción de antígenos virales relevantes en la inducción de protección, en bacterias, levaduras o células animales, ofrece posibilidades importantes para la elaboración de inmunógenos efectivos. Este enfoque abre además nuevas perspectivas, tanto para el estudio de las funciones de las proteínas virales, como para el desarrollo de alternativas en ensayos de diagnóstico. Finalmente, esta tecnología apunta a la producción de vacunas de subunidades, en oposición a las vacunas elaboradas con virus completos. Esto trae posibles ventajas en términos de seguridad, ya que siempre existe el riesgo de la reactivación de la virulencia en vacunas atenuadas, o de una inactivación incompleta en las vacunas inactivadas.

En la actualidad se cuenta con la información básica necesaria y con los reactivos biológicos adecuados para explorar la posibilidad de una vacuna contra rotavirus, empleando de la tecnología del DNA recombinante.

Recientemente, mediante diversos vectores de expresión se han obtenido proteínas recombinantes que contienen secuencias tanto del principal polipéptido de capa interna VP6 (94), como de las proteínas de cápside externa, VP3 (95) y VP7 (96,97,98,99). Algunos de estos trabajos resultan alentadores dado que los polipéptidos producidos han sido capaces de inducir en animales de experimentación, la producción de anticuerpos que neutralizan *in vitro* la infectividad de los rotavirus (95,96,97,98).

## II. ANTECEDENTES

La mayoría de los anticuerpos monoclonales neutralizantes que hasta ahora se han aislado, dirigidos contra la proteína VP3 de los rotavirus SA11 y NCDV (100), reconocen a VP8, producto menor del rompimiento de VP3 (ver Introducción). Por otro lado, la incubación de uno de dichos anticuerpos con los virus, evita el rompimiento de VP3 con tripsina. Esto sugería que el sitio de corte, o una región cercana a éste, era responsable de inducir anticuerpos neutralizantes. Por ello, esta zona parecía importante en el camino hacia la construcción de una vacuna por métodos de DNA recombinante.

En el laboratorio sintetizamos en *E. coli* una porción de la proteína VP3 del rotavirus SA11, la cual contiene a VP8 y a una fracción de la secuencia de VP5 (95). Cerca del 45% del gene 4 se insertó en el plásmido de expresión termoinducible pPLc24, bajo el control del promotor PL del bacteriófago lambda. Este fragmento del gene 4 comprende 346 aminoácidos: del 42 al 387 de VP3. Esto representa el 85% de la secuencia de VP8 y el 35% de la secuencia de VP5. De este modo, el fragmento clonado incluye al sitio de corte con tripsina asociado al aumento de la infectividad viral.

El plásmido construido, pUMA481ML, dirige la síntesis de una proteína híbrida que contiene a los primeros 98 aminoácidos de la polimerasa del fago MS2 seguidos por los 346 aminoácidos de la secuencia de VP3. Esta proteína híbrida termina su traducción 15 aminoácidos dentro de la secuencia del vector. El polipéptido recombinante fue llamado MS2-VP8' y la secuencia esperada se muestra en la figura 2.

Al ser sintetizado, este polipéptido representó el 15% del total de las proteínas bacterianas. Con anticuerpos dirigidos en contra del virus SA11 se pudo corroborar la identidad de MS2-VP8' en el extracto bacteriano.

Dada su insolubilidad, la proteína recombinante MS2-VP8' pudo enriquecerse hasta representar el 45% del extracto celular. De esta manera se pudo obtener hasta 112 mg del polipéptido híbrido por litro de cultivo bacteriano.

### III. OBJETIVO

Información reciente (84,101) ha demostrado que existen epítopes de neutralización en regiones de VP3 (esencialmente en VP5), no comprendidos en el polipéptido MS2-VP8' (ver Antecedentes). Estos epítopes parecen desempeñar un papel importante en la neutralización heterotípica (hacia diferentes serotipos). En este contexto el presente trabajo tiene como objetivo lograr la síntesis en *E. coli* de la mitad carboxilo terminal de VP3 (la cual no está contenida en MS2-VP8') y evaluar la capacidad de esta nueva proteína y de MS2-VP8', tanto de inducir anticuerpos neutralizantes, como de sensibilizar la respuesta inmune hacia una posterior exposición a rotavirus.

Por otra parte, sabemos que VP3 es la hemaglutinina de los rotavirus; sin embargo, la región protéica en que se ubica esta función no ha sido localizada con precisión. Por ello, con el uso de los polipéptidos recombinantes, también se pretende asignar la capacidad hemaglutinante a la mitad amino o carboxilo de VP3.

Para la consecución de estos objetivos generales se plantean las siguientes metas específicas:

- 1) La construcción de un vector que nos permita sintetizar una región de VP3 que contenga primordialmente a VP5. Esta región, aunada a MS2-VP8' nos representaría un 91% de la secuencia de VP3 clonada en vectores de expresión.

- 2) La determinación de algunas características de las proteínas recombinantes producidas en *E. coli*: su estabilidad y toxicidad en la bacteria, así como su capacidad hemaglutinante.

- 3) La obtención de anticuerpos contra los productos de expresión y su detección mediante la interacción con proteínas virales específicas o con el virus completo.

- 4) La determinación del efecto de los anticuerpos en la neutralización *in vitro* de los rotavirus homólogos o heterólogos.

- 5) La determinación de la capacidad de las proteínas recombinantes de sensibilizar la respuesta inmune de ratón hacia un reto posterior con rotavirus.

## IV. MATERIALES Y METODOS

### 1. Virus y células.-

El rotavirus de simio SA11 fue obtenido de H. H. Malherbe (Universidad de Texas). Los rotavirus de humano Wa y ST3 fueron donados por el Dr. Y. Hoshino del NIAID, NIH (Washington).

Los virus se cultivaron en monocapas de células epiteliales MA104, provenientes de riñón de mono, las que después de mostrar del 80 al 100% de efecto citopático fueron procesadas para la obtención de virus de la forma descrita por Espejo y col. (30). Brevemente, el medio con células infectadas se extrajo con un volumen igual de trifluorotricloroetano y el virus obtenido en la fase acuosa se precipitó con 8% (peso/volumen) de polietilén glicol (Union Carbide Corp., New York, N. Y.). Después de incubar a 4°C el precipitado obtenido, y centrifugarlo a 10,000 rpm por 20 min, se resuspendió en 200  $\mu$ l de amortiguador TSM (0.01 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl y 0.001 M MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, pH 8.2). Seguidamente, se colocó sobre una solución de CsCl con una densidad de 1.36 g/cm<sub>3</sub>, que se centrifugó a 40,000 rpm por 17 horas, para obtener un gradiente a equilibrio. El virus, concentrado en una banda, fue colectado, diluido en TSM y centrifugado a 40,000 rpm durante 1 hora, para eliminar los restos de CsCl. Las partículas virales obtenidas en el precipitado se resuspendieron en TM y su absorbancia específica se determinó a 260 nm (5.4 unidades de absorbancia equivalen a 1 mg de RNA viral. El RNA del virus representa aproximadamente el 15% de la partícula, el 85% restante corresponde a las proteínas). Finalmente, los polipéptidos se analizaron mediante electroforesis en geles de poli(acrilamida)-SDS al 10%, teñidos con nitrato de plata.

### 2. Cepas bacterianas.-

La cepa de *E. coli* RR1 ( $\lambda$ )[F<sup>-</sup>, *hsdS20* ( $r_{\beta}^{-}$ ,  $m_{\beta}^{-}$ ), *ara-14*, *proA2*, *lacY1*, *galK2*, *rpsL20* (Sm<sup>r</sup>), *xyt-5*, *mitl-1*, *supE44*,  $\lambda$ ], fue obtenida de A. Covarrubias (Universidad Nacional Autónoma de México). Esta cepa sintetiza constitutivamente, a partir de un gene cromosomal *cI*, al represor para el promotor PL del bacteriófago lambda, manteniendo así reprimida la transcripción a partir de este promotor. La cepa de *E. coli* M5219, reportada por Remaut y col. (102), es la cepa M72 *lacZam*, *trpam*, Sm<sup>r</sup> ( $\lambda$ bio 252*cI857*  $\Delta$ H1). Esta cepa contiene al gene mutante *cI857*, que codifica para un represor termosensible del promotor  $\lambda$ PL. De este modo, con la temperatura adecuada se puede reprimir o activar la expresión a partir de dicho promotor. Así, a 28°C la transcripción de los genes regulados

por el promotor  $\lambda$ PL se encuentra abajo de los límites detectables y el estado totalmente inducido se obtiene a 42°C.

### 3. Plásmidos.-

El plásmido pSR4-4 se obtuvo del banco de genes resultante de la clonación del genoma del rotavirus de simio SA11 (60,76). El inserto de rotavirus contenido en este plásmido representa, aproximadamente, el 49% del gene 4.

El vector pPLc24 cuenta con el promotor PL del bacteriófago lambda y con una porción de DNA que codifica para los primeros 98 aminoácidos del fago MS2 (102).

### 4. Preparación de DNA recombinante.-

El trabajo con el DNA de los plásmidos se llevo a cabo esencialmente de la forma que resúmen Maniatis y col. (103). Las endonucleasas de restricción, la ligasa de DNA del fago T4, y el fragmento grande de la polimerasa I de DNA de *E. coli* (fragmento Klenow) se obtuvieron de New England Biolabs. La fosfatasa alcalina bacteriana fue obtenida de BRL (Bethesda Research Laboratories).

### 5. Secuenciación nucleotídica.-

Mediante la técnica de Maxam y Gilbert (104) se determinó, en el pUMA450ML, la secuencia nucleotídica en la región en que el gene de la polimerasa de MS2 se une con el gene VP5'. Para obtener esta secuencia, el plásmido recombinante se linearizó con la enzima *BamHI*. Seguidamente, se marcó en el extremo 3' con fósforo radiactivo (<sup>32</sup>P-dATP), utilizando el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I. A continuación, la muestra se sometió a la acción de una segunda endonucleasa, con el fin de separar los extremos 3' marcados. La segunda endonucleasa utilizada fue la enzima *PstI*, que corta en la zona del gene de  $\beta$ -lactamasa contenida en el plásmido. Los fragmentos así producidos, se separaron en geles de agarosa de bajo punto de fusión para ser posteriormente secuenciados.

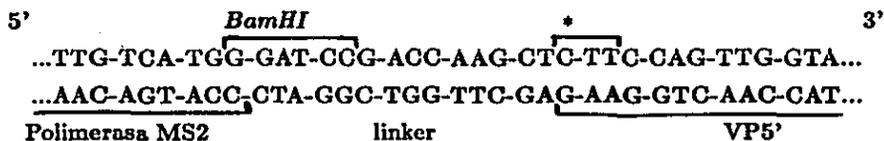
### 6. Construcción de un plásmido para la expresión del gene 4(3') del rotavirus SA11.-

En la construcción del vector de expresión se utilizó el cDNA viral contenido en el plásmido pSR4-4. A este gene lo denominamos 4(3') ya que contiene secuencias de la region 3' del gene 4 de rotavirus SA11, abarcando del nucleótido 1057 al 2252 (ver fig 3a.). El cDNA 4(3') comprende aproximadamente el 75% de la secuencia codificadora de VP5, uno de los dos productos generados por el rompimiento de VP3.

En la construcción se siguió la estrategia general descrita por Arias y col. (95) con algunas modificaciones que se detallan en la fig. 3b. El plásmido de expresión empleado fue el plásmido pPLc24. Este vector contiene al promotor PL seguido por una porción de DNA con el sitio de unión a ribosomas y la secuencia correspondiente a los primeros 98 aminoácidos de la polimerasa del fago MS2. Inmediatamente después de esta secuencia se localiza una región con los sitios de restricción *BamHI* y *HindIII*. De esta manera, cualquier DNA que sea insertado en alguno de estos dos sitios, puede expresarse bajo el control del promotor PL, como una quimera junto con el gene de MS2.

Para la construcción del vector de expresión, el plásmido pSR4-4 fue digerido con *HhaI* y *FnuDII*. Así, se obtuvo el fragmento 4(3') de 1085 pares de bases, que fue ligado al sitio *HindIII* de pPLc24. Este fragmento abarca del nucleótido 1163 al 2247 de VP3, lo que representa el 46% del total de la proteína. Para que pudieran ligarse, los extremos sobresalientes del vector y del inserto fueron rasurados; para los extremos 3' sobresalientes generados por *HhaI* se usó la actividad de exonucleasa del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*, y los extremos 3' recesivos del vector se rellenaron con la actividad de polimerasa de la misma enzima. El plásmido así generado fue recuperado mediante su transformación en la cepa RR1 de *E. coli*.

La secuencia de este plásmido en el sitio de unión del vector con el inserto, se estableció como se describe en la sección anterior. La secuencia indicó que el gene 4(3') no estaba en el marco de lectura adecuado con respecto a la secuencia del gene de la polimerasa MS2. A este vector fuera de fase se le llamó pUMA450ML. La secuencia obtenida se muestra a continuación:



\*Fase correcta de traducción del gene VP5'

Para corregir el marco de lectura del gene híbrido en el pUMA450ML, el plásmido se digirió con *BamHI*, los extremos sobresalientes se rellenaron con Klenow, y el plasmido se

recircularizó con ligasa de DNA del fago T4. De este proceso resultó una inserción de 4 pares de bases, que dejó al gene 4(3') en la misma fase de lectura que el gene de la polimerasa MS2. A este plásmido le llamamos pUMA451ML.

El nuevo vector se recuperó primero en la cepa RR1 y luego fue transferido a la cepa M5219 que, gracias al represor termosensible de PL que contiene, permite la regulación de la expresión de genes bajo el control del promotor PL.

De las secuencias conocidas del gene de MS2 (105); del gene 4 de rotavirus SA11 (76); y de pBR322 (106), podemos predecir que la traducción de la proteína híbrida se va a iniciar en el primer codón AUG de la polimerasa MS2, y terminará en el codón UGA de pBR322 localizado a 150 nucleótidos después del gene 4(3'). Con esto tendríamos un polipéptido de fusión de 517 aminoácidos: 98 de la polimerasa MS2; 6 codificados por el vector en la unión de MS2 con VP5'; 361 aminoácidos de VP5 (del aminoácido 389 al 749 de VP5); 2 aminoácidos del linker y 50 de pBR322 (ver fig.4).

#### **7. Crecimiento e inducción de bacterias recombinantes.-**

Las bacterias fueron crecidas a 28 °C en medio máximo de inducción MX (peptona de caseína al 3.2%, extracto de levadura al 2%, 0.1 mM MgSO<sub>4</sub>, sales M9 1x -42mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 22mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.5mM NaCl y 18mM NH<sub>4</sub>Cl-) hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 1. En este momento, mediante un cambio de temperatura, se indujo la expresión de genes a partir del promotor PL del bacteriófago lambda. Primero, se añadió al cultivo de bacterias un volumen igual de medio de inducción precalentado a 65°C y luego se incubó a 42°C durante 12 horas o más.

**8. Electroforesis en geles de poliacrilamida.-** Para detectar las proteínas híbridas MS2-VP5' y MS2-VP8' expresadas en nuestro sistema y calcular su porcentaje, las muestras se analizaron en geles de poliacrilamida-SDS de acuerdo al método descrito por Laemmli (107).

Las proteínas bacterianas se solubilizaron en un baño de agua hirviendo por 3 min en amortiguador de Laemmli (50 mM Tris pH 6.8, 10% glicerol, 1% SDS, 2mM EDTA, azul de bromofenol y 10 µl/ml de β-mercaptoetanol). Antes de colocarse en el gel, las muestras se centrifugaron a 12,000 x g por 5 min para quitar los restos insolubles. Después de la electroforesis el gel fue teñido con azul de Coomassie.

Para medir el porcentaje de las proteínas de interés, con respecto al total de las proteínas sintetizadas en *E. coli*, se hizo un análisis densitométrico de los geles teñidos, a una longitud de onda de 600 nm.

#### 9. Inmunoelectrotransferencia.-

Para comprobar la identidad de los polipéptidos de fusión, las proteínas bacterianas se analizaron por el método de inmunoelectrotransferencia descrito por Tsang y col. (108). Las proteínas se separaron por electroforesis y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (NC) (BA85 de Schleicher y Schuell, con un tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ ). Para evitar uniones inespecíficas, los filtros de NC se bloquearon con TNTG (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.9% NaCl, 0.3% gelatina); seguidamente fueron incubados por 60 min a 37°C, con una dilución 1/500 de suero hiperinmune anti-rotavirus SA11, producido en conejo (con un título neutralizante de 1:30,000). Los filtros se lavaron con TNTG y se incubaron con 0.5  $\mu\text{Ci/ml}$  de proteína A marcada con  $^{125}\text{I}$ . Después de lavar la marca libre, los filtros se secaron y se expusieron para autorradiografía.

Para determinar la especificidad de los sueros de los ratones hiperinmunizados con las proteínas MS2-VP8' y MS2-VP5', se utilizó el proceso anterior con algunas variaciones. Las proteínas estructurales de SA11 separadas por electroforesis, se transfirieron a la membrana de nitrocelulosa. Posteriormente se hicieron reaccionar con los antisueros de interés (en una dilución aproximada de 1/250), para luego incubarlos con anti-IgG de ratón unido a peroxidasa (Sigma), diluido 1/1500. La reacción se reveló con cloronaftol (Sigma).

#### 10. Enriquecimiento de la proteína híbrida.-

La proteína recombinante MS2-VP5' se sintetiza en *E. coli* en una cantidad aproximada de 2% del total de las proteínas bacterianas. Sin embargo, mediante repetidos lavados y centrifugaciones a baja velocidad, la proteína puede enriquecerse hasta representar el 15%

El método utilizado para ello, es el reportado por Kleid y col. (109), que aprovecha la insolubilidad de las proteínas recombinantes. Brevemente, las bacterias transformadas e inducidas se colectan por centrifugación a 4,000 x g. Se resuspenden en 1/10 del volumen inicial de TEN (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5 mM EDTA, 0.3 M NaCl), se añade 1 mg/ml de lisozima y se incuba por 15 min en hielo. Posteriormente, se añade NP40 a una concentración final de 0.5%. Después de 10 min, se agrega NaCl y  $\text{MgCl}_2$  para dar una concentración final de 0.9 M y 7.2 mM, respectivamente, y 2  $\mu\text{g/ml}$  de DNasa I, para incubarse en hielo por

60 min . La proteína MS2-VP5' se recupera mediante centrifugación a 4,000 x g por 15 min, se resuspende y se lava 3 veces con TEN.

### 11. Microscopía electrónica.-

La proteína MS2-VP8' anteriormente sintetizada (95), se expresa en altas proporciones dentro de *E. coli* (15%). Por este motivo se quiso observar si dada su concentración, como se ha visto para otras proteínas de fusión (110, 111,112), este polipéptido forma cuerpos de inclusión dentro de la bacteria recombinante. En colaboración con M. Merchant (IIBM, Universidad Nacional Autónoma de México), las bacterias se fijaron por 2 horas en suspensión de Karnosky y se lavaron durante 1 hora en solución amortiguadora de Cacodilato 0.1 M pH 7.3 (113). Posteriormente se fijaron durante 2 horas en tetraóxido de osmio al 1% en amortiguador Cacodilato. Después de deshidratar las muestras en alcoholes progresivos desde el 70% hasta el absoluto, se procedió a fijarlas en epón. Para la microscopía electrónica se llevó a cabo la tinción de Reynolds (114): las rejillas con los cortes finos de las muestras respectivas, se colocaron en acetato de uranilo al 5% durante 10 min y en citrato de plomo durante 2 min. Se utilizó un microscopio Joel 100-B en el que se tomaron fotografías con una amplificación de 3,000 veces.

### 12. Toxicidad y estabilidad de la proteína híbrida.-

Para resolver si los productos MS2-VP8' y MS2-VP5' son tóxicos para *E. coli*, se hicieron curvas de crecimiento bacteriano con la inducción, a etapas tempranas, de la expresión de las bacterias transformadas con los vectores pUMA451ML y pUMA481ML. La cinética de crecimiento se siguió a 42°C en medio máximo de inducción con 100 µg/ml de ampicilina. Para mantener la selectividad del medio, cada hora se añadieron 100 µg/ml de AMP.

Con el objeto de determinar la estabilidad de las proteínas recombinantes dentro de *E. coli*, se efectuó un experimento de pulso y caza de las proteínas bacterianas en estado de inducción. Las bacterias con el pUMA481ML, el pUMA451ML o el pPLc24, se crecieron a 28°C hasta alcanzar una D.O.<sub>600</sub> = 1. Entonces se les agregó un volumen igual de medio a 65 °C y se incubaron a 42°C. Después de 2 horas, las bacterias se centrifugaron a baja velocidad, se resuspendieron en medio mínimo que contenía aminoácidos sin metionina y se incubaron de nuevo a 42°C por 2 horas. Luego, las bacterias se marcaron con 15 µCi/ml de metionina <sup>35</sup>S durante 30 min. A continuación, se agregó metionina fría a una concentración final de 50 µg/ml y se tomaron alícuotas a distintos tiempos de la incubación. Las muestras

colectadas se centrifugaron y se resuspendieron en amortiguador de Laemmli. Después de hervirse por 5 min, se corrieron en un gel de poliacrilamida-SDS al 10%, el cual fue tratado para fluorografía con dimetilsulfóxico y PPO (115).

### 13. Esquemas de inmunización.-

Se utilizaron ratones machos BALB/c de 7 a 9 semanas de edad. Se probó que los sueros preinmunes de estos animales tuvieran títulos bajos de anticuerpos neutralizantes e inhibidores de la hemaglutinación de SA11. Los animales cuyos sueros tenían títulos de inhibición de la hemaglutinación menores de 1/200 y títulos de neutralización menores de 1/50, fueron inoculados por vía subcutánea con 200  $\mu$ l de una emulsión de antígeno y adyuvante en proporciones iguales. En la primera inmunización se usó adyuvante completo de Freund; para las inmunizaciones subsecuentes, se utilizó adyuvante incompleto.

Según el antígeno aplicado los ratones se dividieron en grupos. Para la obtención de sueros hiperinmunes contra las proteínas recombinantes, cada grupo recibió 5 inmunizaciones que se suministraron en los días 0, 14, 29, 44 y 59. Una semana después de cada inmunización, los ratones se sangraron mediante la punción del plexo capilar retroorbital. Los sueros se inactivaron a 56°C por 30 min y mientras se analizaban, fueron almacenados a -20°C.

Para evaluar la sensibilización de la respuesta inmune, los grupos de ratones recibieron una dosis del antígeno respectivo y a los 15 días, otra con rotavirus purificado. Los sueros se colectaron cada semana. En cada uno de los sueros obtenidos se buscó la presencia de anticuerpos neutralizantes o inhibidores de la hemaglutinación.

### 14. Ensayos de neutralización.-

Los títulos de anticuerpos neutralizantes en sueros de ratón, se midieron de acuerdo al método descrito por Shaw y col. (116), con algunas modificaciones. Brevemente, volúmenes iguales de rotavirus SA11, Wa o ST3 (a diluciones tales que tuvieran 100 a 200 partículas virales infecciosas por 50  $\mu$ l de solución), pretratados con tripsina (Difco, a una concentración final de 10  $\mu$ g/ml), se mezclaron con diluciones seriadas de los sueros de ratón y se incubaron 1 hora a 37°C. 50  $\mu$ l de cada mezcla se añadieron a monocapas de células MA104 (en cajas de cultivo de 96 pozos), y se dejaron adsorber por 1 hora a 37°C. Seguidamente, se retiró el inóculo y se añadieron a los pozos 200  $\mu$ l de medio mínimo esencial. Las células se incubaron por 12 horas a 37°C, después de lo cual se lavaron con buffer PBS y se fijaron en 80% acetona- PBS, por 15 min. Posteriormente, se lavaron y se incubaron 1 hora a 37°C

con suero anti-SA11 de cuyo o de ratón (con un título neutralizante de 1:30,000), diluido mil veces. Luego de ser lavadas dos veces, se incubó a las células con una dilución 1/2500 de proteína A peroxidasa (Amersham) durante 2 horas a 37°C. Las células se lavaron y se aplicó el sustrato, 3-amino-9-etilcarbazol (Sigma). Después de aproximadamente 10 min, los pozos se lavaron con H<sub>2</sub>O, se dejaron secar y se leyeron en un microscopio invertido.

El título neutralizante de un anticuerpo se define como el inverso de la dilución más alta, en que el número de focos infecciosos se reduce en un 60%, con respecto al control.

#### **15. Ensayos de hemaglutinación,-**

En cajitas de microtitulación de 96 pozos (de fondo en pico), se hicieron diluciones seriadas del rotavirus SA11 o del lisado de bacterias transformadas, preparadas como antes se describió. A estas diluciones se añadieron eritrocitos tipo O de humano a una concentración final de 0.4% (v/v), diluidos en PBS con 0.2% de albúmina de conejo (RSA). Las cajitas se incubaron a temperatura ambiente por 90 minutos antes de determinarse los títulos de hemaglutinación.

Para los estudios de inhibición de la hemaglutinación, los sueros a probar se diluyeron seriadamente en cajitas de microtitulación en PBS/0.2% RSA. A continuación, se mezclaron con 4 unidades hemaglutinantes del rotavirus SA11 o, en su caso, de lisado bacteriano transformado con el pUMA481ML o el pUMA451ML. Las cajitas se incubaron a temperatura ambiente por espacio de una hora y luego, se agregó un volumen igual de eritrocitos tipo O de humano, diluidos al 0.4% en PBS/0.2% RSA. El análisis se efectuó después de una incubación de 60 minutos a temperatura ambiente.

#### **16. Análisis estadístico.-**

Se utilizó la prueba t de Student para series pequeñas ( $n < 30$ ) con distribución normal (117). A través de ésta se determinó el significado de las diferencias entre las medias de los títulos de neutralización o de inhibición de la hemaglutinación, obtenidas de los sueros de ratones inoculados con proteínas recombinantes o proteínas control.

## V. RESULTADOS

### 1. Construcción del plásmido pUMA451ML y expresión del gene 4(3').

En "Materiales y Métodos" se describe la estrategia empleada para la construcción del plásmido de expresión pUMA451ML (ver fig. 3). Dicho plásmido contiene un fragmento del gene de VP3 (el 46% del gene completo, correspondiente al 68% de VP5) fusionado con los primeros 98 aminoácidos de la polimerasa del fago MS2. La expresión del gene híbrido se encuentra bajo el control del promotor PL del bacteriófago lambda (fig. 4).

Entre el pUMA481ML previamente construido (95), el cual contiene el 85% de la secuencia carboxilo terminal de VP8 y el 35% de la secuencia amino terminal de VP5, y el pUMA451ML, se cuenta con un total del 91% del gene de VP3 clonado en vectores de expresión. La caracterización de los productos de ambos plásmidos pudiera permitir un conocimiento más preciso de los determinantes antigénicos de VP3.

Para poder controlar la transcripción del gene híbrido a partir del promotor PL, el plásmido pUMA451ML se introdujo por transformación en la cepa M5219. Esta cepa de *E. coli* contiene integrado a su genoma un profago mutado de lambda que es capaz de producir un represor termosensible de PL. De este modo, la transcripción a partir de dicho promotor se induce cuando la temperatura del cultivo bacteriano se eleva de 28°C a 42°C.

Las proteínas sintetizadas por las células M5219 transformadas con el pUMA451ML se analizaron en geles de poliacrilamida-SDS. En las muestras colectadas desde 5 hasta 12 horas después de efectuar la inducción, se observó que aparecían proteínas que no estaban presentes en las bacterias incubadas a 28°C.

Se sabe que varios genes de *E. coli* se activan con choques de calor (118). Para diferenciar aquellos genes que se activan a 42°C de aquél regulado por el promotor PL, se comparó, después de la inducción por 12 horas a 42°C, el patrón protéico de la cepa que contiene el plásmido pUMA451ML (fig. 5A, carril 3) con el de las bacterias transformadas con el pUMA481ML (carril 1) o el vector pPlc24 (carril 2). En estos geles se pudieron distinguir dos proteínas no sintetizadas por la cepa que contiene el vector pPlc24: una de 52 KDa sintetizada por la cepa transformada con el pUMA481ML (carril 1), correspondiente a la ya identificada MS2-VP8' (95), y otra de 57 KDa (en adelante p57) en la cepa con el plásmido pUMA451ML (carril 3) y cuyo peso es muy cercano al esperado para la nueva proteína recombinante, que es de 56 KDa.

Para conocer que proporción representa p57 del total de las proteínas bacterianas, éstas se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, y se tiñeron con azul de Coomassie. Los geles así teñidos fueron analizados por densitometría a 600 nm. El análisis mostró que p57 constituye aproximadamente un 2% de las proteínas. Esta proporción resulta ser considerablemente menor que el 15% que MS2-VP8' constituye en *E. coli* (95).

Como sucede con MS2-VP8', p57 resultó ser altamente insoluble pues apareció en el sedimento de un lisado bacteriano centrifugado a baja velocidad (fig. 5B). Las proteínas bacterianas obtenidas en el sedimento, se separaron por electroforesis y el gel se analizó nuevamente por densitometría. La proteína p57 representó el 15% del total de las proteínas insolubles, pudiéndose obtener hasta 40 mg del polipéptido por litro de cultivo bacteriano.

## 2. Detección de epítopes virales en la proteína p57.

Con el objeto de confirmar si p57 contenía determinantes antigénicos relacionados con el rotavirus SA11, se analizó su capacidad de reaccionar con un antisuero anti-rotavirus SA11. Para ello, de la manera anteriormente descrita, se indujo la expresión de las cepas de *E. coli* transformadas con el pPLc24, el pUMA481ML o el pUMA451ML. Las proteínas de los lisados bacterianos enriquecidos (ver "Materiales y Métodos") fueron separados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (fig. 6, carriles A-F); y se tiñeron con azul de Coomassie (carriles A, B y C); o se transfirieron a papel de nitrocelulosa (carriles D, E y F). Las proteínas en los filtros de nitrocelulosa se incubaron con suero anti-rotavirus SA11 producido en conejos y posteriormente se incubaron con proteína A marcada con <sup>125</sup>I. La autorradiografía de la inmunoelectrotransferencia (carriles D, E y F) muestra que el antisuero reaccionó específicamente con la proteína MS2-VP8' producida por las bacterias con el plásmido pUMA481ML (carril D) y con p57 sintetizada en las bacterias transformadas con el plásmido pUMA451ML (carril E), lo que sugiere que ésta última es la proteína MS2-VP5' esperada en la construcción. Es interesante ver que en los carriles E y D también se observan bandas de menor peso molecular que reaccionaron con el antisuero; ello sugiere la posibilidad de que representen productos de degradación de las proteínas recombinantes, señales internas de iniciación de la traducción, o bien de una terminación temprana de la transcripción.

### 3. Estabilidad en *E. coli* de las proteínas recombinantes.

La cantidad del polipéptido MS2-VP5' detectada en células M5219 transformadas con el plásmido pUMA451ML, es aproximadamente 7 veces menor que la que se obtiene de la proteína MS2-VP8', sintetizada a partir del mismo vector. Para explorar si esta diferencia se debía a una mayor inestabilidad del producto MS2-VP5' en el citoplasma de *E. coli*, se recurrió a un método que permitiera determinar y comparar la estabilidad intracelular de ambas proteínas recombinantes.

Con el fin de facilitar el seguimiento de las proteínas recombinantes sintetizadas en un corto lapso de tiempo, los polipéptidos se marcaron radiactivamente. Después de crecer las cepas transformadas con el pUMA481ML y el pUMA451ML e inducir su expresión durante 2 horas, se dió un pulso de metionina-<sup>35</sup>S durante 30 min. Al término de este tiempo se agregó un exceso de metionina fría para diluir la incorporación de la metionina marcada radiactivamente y se tomaron alícuotas a diferentes tiempos de incubación. El procedimiento descrito permitiría el seguimiento de la integridad de los polipéptidos sintetizados en los 30 min de marcaje.

El comportamiento de las proteínas recombinantes, se siguió mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS y su posterior fluorografía. En la figura 7 se observa que la proteína MS2-VP8' resulta ser muy estable, puesto que su proporción no disminuye después de una caza de la marca de 12 horas; tampoco aparecen productos de degradación en el mismo lapso de tiempo. Desafortunadamente, el polipéptido híbrido MS2-VP5' no se pudo detectar bajo estas condiciones de marcaje, lo que impidió determinar su estabilidad.

### 4. Efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano.

Para evaluar el efecto de la síntesis de MS2-VP8' y MS2-VP5' sobre el crecimiento bacteriano, células M5219 transformadas con los plásmidos pUMA481ML, pUMA451ML, pPLc24, o sin transformar, se crecieron a baja densidad, dando de inmediato un choque térmico de 42°C. Para evitar el crecimiento de las bacterias que habían segregado los plásmidos recombinantes, se mantuvo la selectividad del medio agregando ampicilina cada hora.

Como se puede observar en la figura 8, las cepas transformadas con pUMA481ML o con pUMA451ML fueron incapaces de continuar su crecimiento, mientras que las células

transformadas con pPLc24 o sin transformar sí fueron capaces de crecer, aunque aparentemente con tiempos de duplicación prolongados en relación al crecimiento a 37°C.

La ausencia de crecimiento en células M5219 produciendo activamente MS2-VP8', no es sorprendente dada la carga metabólica extra que puede causar la síntesis de una proteína sin utilidad que representa el 15% del total de las proteínas de la bacteria. Sin embargo, ésta no parece ser la explicación más plausible para la inhibición del crecimiento de las células que sintetizan la otra proteína recombinante, MS2-VP5', ya que solo representa aproximadamente el 2% de la proteína total. En este último caso, pudiera más bien tratarse de un efecto tóxico específico de las secuencias virales.

## 5. Formación de cuerpos de inclusión por la proteína MS2-VP5'

Tomando en cuenta la alta concentración de la proteína MS2-VP8' en las células bacterianas y su demostrada insolubilidad, decidimos estudiar su distribución en *E. coli* mediante microscopía electrónica. Varios reportes han mostrado que ciertas proteínas recombinantes altamente concentradas en *E. coli* se agregan en el citoplasma en masas electrodensas e insolubles llamadas cuerpos de inclusión (110,111,112). En nuestro caso, cotejando las proteínas de fusión de VP3 de los lisados celulares, hemos visto que éstas sedimentan mediante centrifugación a baja velocidad. Esta insolubilidad pudiera deberse a la formación de agregados protéicos intracelulares.

Los datos de microscopía electrónica (fig. 9) mostraron que la proteína MS2-VP8' forma agregados que se organizan en masas irregulares localizadas en los polos de la bacteria. Estos agregados representan típicos cuerpos de inclusión y llegan a ocupar hasta una cuarta parte del área total. Algunas células tienen una inclusión cerca de cada uno de los polos. Bajo las mismas condiciones, no se encuentran cuerpos semejantes en las células que contienen al plásmido pPLc24.

El extracto celular enriquecido logró solubilizarse mediante un tratamiento con Urea 8 M, utilizando como agente reductor  $\beta$ -mercaptoetanol al 0.1 M. Sin embargo, independientemente a la concentración salina, al retirar la Urea las proteínas se precipitaron de nuevo aun en presencia del  $\beta$ -mercaptoetanol. Probablemente las proteínas en los agregados se empaquetan tan densamente, que para lograr su solubilidad se requiere de la acción de un fuerte agente desnaturizante que mantenga la accesibilidad al agente reductor. De este modo vemos que los puentes disulfuro pueden ser un componente importante, aunque no

el único, que participa en la insolubilidad del agregado protéico. Por otro lado, cuando los extractos celulares se analizan por electroforesis calentándolos previamente a 95°C en una solución amortiguadora de Tris-SDS sin  $\beta$ -mercaptoetanol, observamos que existe cierto grado de desagregación de los polipéptidos recombinantes. Esto apoya que otro tipo de fuerzas intermoleculares también juegan un papel en la formación de los agregados.

## 6. Capacidad hemaglutinante de MS2-VP8' y MS2-VP5'.

El análisis de rearrreglantes virales ha demostrado que además de estar involucrada en la penetración del virus a la célula hospedera (75), la proteína VP3 es también la hemaglutinina de los rotavirus (49).

Para explorar la conservación de sitios funcionales de VP3 en las dos proteínas recombinantes y a su vez asignarlos a una de las dos regiones estudiadas, se determinó la capacidad hemaglutinante de MS2-VP8' y MS2-VP5'. Dado que estas dos proteínas se producen en forma de agregados, consideramos que estos agregados podrían actuar como entidades multivalentes capaces de mantener la capacidad de aglutinar eritrocitos. La aglutinación con proteínas recombinantes aisladas, ya ha sido reportada para la hemaglutinina de reovirus (119).

De este modo, al analizar si los extractos de las bacterias transformadas con pPLc24, pUMA451ML o pUMA481ML podían aglutinar eritrocitos tipo O de humano, vimos que hemaglutinaron sólo los extractos que contenían al polipéptido MS2-VP8' (fig. 10). Los lisados de células transformadas con el pUMA481ML consistentemente mostraron un título de hemaglutinación entre 1:32 y 1:64, lo que corresponde a un equivalente de 20 a 40  $\mu\text{g/ml}$  del polipéptido MS2-VP8'.

El efecto hemaglutinante del lisado enriquecido para la proteína MS2-VP8' es específico, ya que esta hemaglutinación se inhibe cuando el extracto protéico se incuba previamente con anticuerpos dirigidos contra el rotavirus SA11 (fig 11).

De acuerdo a estos datos concluimos que la capacidad hemaglutinante de VP3 está localizada en su mitad amino terminal y que este sitio de interacción está preservado en la proteína recombinante MS2-VP8'.

## 7. Inmunogenicidad de las proteínas de fusión MS2-VP8' y MS2-VP5'.

Al considerar la posibilidad de utilizar a los polipéptidos recombinantes como inmunógenos que puedan proteger contra la diarrea causada por rotavirus, resulta importante determinar si logran inducir una respuesta inmune funcional en animales de experimentación. De igual forma es necesario comparar su eficacia en relación a la respuesta provocada por el virus completo.

Para determinar la inmunogenicidad de los polipéptidos híbridos, estos fueron administrados a ratones, con objeto de producir sueros hiperinmunes. Se trabajó con animales que estuvieron libres de anticuerpos anti-rotavirus SA11, con títulos de neutralización  $\leq 1:50$  y de inhibición de la hemaglutinación  $\leq 1:200$ . El esquema de inmunización se detalla en la tabla I.

Dos grupos de ratones recibieron 5 inmunizaciones a intervalos de 15 días, con lisados bacterianos conteniendo 40  $\mu\text{g}$  de MS2-VP8' o MS2-VP5', según fuera el caso (los 40  $\mu\text{g}$  contienen aproximadamente 30  $\mu\text{g}$  de la porción viral de la proteína híbrida). Se incluyeron además dos grupos control: uno inoculado con antígeno bacteriano, carente de proteínas recombinantes y otro con 50  $\mu\text{g}$  de rotavirus SA11.

Previendo la posibilidad de una infección por rotavirus ajena al experimento, en cada grupo se incluyeron dos ratones sin inmunizar, cuyos sueros también fueron objeto de análisis. Durante los cinco sangrados realizados, estos ratones "vigilantes" no mostraron aumento sobre el nivel basal de anticuerpos neutralizantes e inhibidores de la hemaglutinación de SA11.

El análisis de los sueros hiperinmunes generados fue encaminado a contestar dos preguntas: primero, si las proteínas de fusión contenían epítopes que pudieran inducir anticuerpos capaces de reaccionar con las partículas virales completas; y segundo, si estos anticuerpos lograban neutralizar la infectividad viral.

La existencia de anticuerpos que reaccionaron con el virus completo se determinó mediante ensayos de inhibición de la hemaglutinación. En la tabla II se presentan los resultados obtenidos.

Encontramos que tanto MS2-VP8' como MS2-VP5' fueron capaces de inducir anticuerpos que interaccionan con las partículas virales a diferencia del grupo control, inmunizado con antígeno bacteriano, que no indujo anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación

de SA11. Los anticuerpos inducidos por las proteínas híbridas alcanzan un título equiparable al inducido por la partícula viral completa, aproximadamente de 1:2000, que es 10 veces mayor al del suero preinmune.

Por otro lado, la determinación de la capacidad de neutralización viral por estos antisueros, es importante en el camino hacia la construcción de una vacuna efectiva. Este segundo punto se estudió empleando un ensayo de neutralización de focos infecciosos de SA11 en monocapas celulares (ver tabla II).

El estudio mostró un incremento aproximado de 30 veces en los títulos neutralizantes de los sueros hiperinmunes, inducidos por MS2-VP8' frente a lo detectado en los sueros preinmunes y en los controles con antígeno bacteriano.

A las 5 semanas de iniciado el estudio, cuando ya se habían suministrado 3 dosis de las proteínas híbridas, los sueros anti- MS2-VP8' ya presentaban anticuerpos neutralizantes. Estos fueron aumentando hasta alcanzar un título de 1:1600 después de la quinta inmunización. Este título es similar al reportado por Arias y col. (96), obtenido al inmunizar ratones con un polipéptido de fusión derivado de VP7 (la otra proteína de capa externa del rotavirus). Sin embargo, al compararlo con los anticuerpos neutralizantes inducidos por la partícula viral completa (1:34,000), el título de anticuerpos es aproximadamente 20 veces menor.

Por otro lado, los sueros anti-MS2-VP5' no mostraron actividad neutralizante, permaneciendo al mismo nivel que el que muestran los sueros de los ratones control ( $\leq 1:50$ ), aun después de las 5 inmunizaciones.

Para determinar la especificidad de los sueros hiperinmunes generados frente a las proteínas virales, se realizó un ensayo de inmunoelectrotransferencia. Las proteínas del virus SA11 purificado, separadas por electroforesis y transferidas a papel de nitrocelulosa, se incubaron con los distintos antisueros. En la figura 12 se observa que el ensayo mostró un fondo de reacción inespecífico aun en ausencia de suero (carril 6). Sin embargo, a pesar de ser negativos para anticuerpos neutralizantes de SA11, los sueros preinmunes reconocen de forma ligeramente más intensa al patrón de proteínas virales (carril 5). Cabe entonces la posibilidad de que la cepa de ratones utilizada hubiera tenido algún contacto previo con un rotavirus murino distinto al serotipo 3.

A pesar de este fondo inespecífico, se logró ver un reconocimiento preferencial para los productos de rompimiento de VP3: VP5 y VP8. Es decir, la inmunización con MS2-VP8' induce una clara respuesta hacia VP8 (fig. 12 carril 2), mientras que MS2-VP5' induce

una respuesta más intensa para VP5 (fig. 12 carril 3). Parece entonces que los sueros hiperinmunes son capaces de reaccionar con las proteínas virales adecuadas.

## 8. Neutralización heterotípica.

Los sueros hiperinmunes producidos contra partículas de rotavirus completas, generalmente neutralizan de manera específica la infectividad del rotavirus empleado en la inmunización, o de rotavirus pertenecientes al mismo serotipo. Esto se conoce como una neutralización homotípica.

Se sabe que la glicoproteína de capa externa VP7 es la principal responsable de la especificidad de serotipos (56,57). Sin embargo, recientemente también a VP3 se le ha atribuido un papel en esta especificidad.

Por otro lado, dos grupos de investigación han obtenido anticuerpos monoclonales dirigidos contra VP3 y VP7 que son capaces de neutralizar a rotavirus *in vitro* en forma heterotípica (53,64). Esto es, que son capaces de neutralizar a rotavirus pertenecientes a cuando menos dos serotipos diferentes. Algunos de estos anticuerpos han sido capaces de proteger pasivamente a ratones lactantes retados con tres diferentes serotipos de rotavirus (64).

Para evaluar la posibilidad de que los anticuerpos generados por el polipéptido MS2-VP8' neutralizan además del rotavirus SA11 (serotipo 3) a rotavirus pertenecientes a otros serotipos, analizamos su capacidad de neutralizar a los rotavirus de humano, ST3 (serotipo 4) y Wa (serotipo 1).

Se probaron los sueros de 4 ratones inoculados con el polipéptido MS2-VP8' (con títulos de neutralización para SA11 de 1/1600) y se encontró que ninguno neutralizó al rotavirus Wa (con títulos < 1:50). Sin embargo, estos neutralizaron la infectividad del rotavirus ST3 (serotipo 4), en un título promedio de 1/400. Este título resulta aproximadamente 4 veces menor que aquél con el que neutralizan a SA11. También se analizaron dos de los sueros del grupo control con antígeno bacteriano y dos del grupo inoculado con virus. Ninguno de ellos neutraliza a los virus heterólogos.

Esto indica que aunque la respuesta inducida por MS2-VP8' es primordialmente específica para SA11, presenta cierta neutralización cruzada con un virus del serotipo 4.

## 9. Sensibilización de la respuesta inmune.

El potencial que tiene una proteína de ser un inmunógeno adecuado para vacunación, generalmente se ha determinado por su capacidad de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes. Sin embargo, existen evidencias con péptidos y proteínas de origen viral (120, 121, 122), que muestran que estos pueden sensibilizar al sistema inmune en forma específica y eficiente, aunque se administren en dosis subinmunizantes o sean incapaces de inducir anticuerpos neutralizantes por sí mismos. Esto se debe a que provocan el establecimiento de células de memoria, que dan lugar a una respuesta inmune secundaria ante un contacto posterior con el mismo antígeno o antígenos relacionados.

Por otro lado, los experimentos realizados por Milich y col. (123) con antígenos derivados del virus de la hepatitis B, muestran que la respuesta inmune hacia una proteína de envoltura (presentada en el virus completo), puede sensibilizarse con la previa administración de un determinante de células T derivado de la nucleocápside del virus, no obstante que este determinante no esté localizado en la proteína de envoltura.

De acuerdo a lo anterior, quisimos analizar la capacidad de las proteínas híbridas MS2-VP8' y MS2-VP5' para sensibilizar la respuesta inmune de ratones hacia un posterior contacto con el virus SA11. Para esto fue necesario encontrar un intervalo de tiempo óptimo entre la inyección primaria de antígeno y la inoculación subsecuente del virus. Este es el tiempo que probablemente requiere el sistema inmune del ratón para producir células de memoria capaces de reconocer, en su momento, a las partículas virales (121). En el presente estudio, el intervalo elegido (15 días) se estableció basado en experimentos preliminares.

Con base en lo anterior, se diseñó el experimento esquematizado en la tabla III. En la tabla IV y la figura 13 se muestran los títulos de anticuerpos neutralizantes obtenidos como resultado de este protocolo de inmunización. Se observa que no hay presencia de anticuerpos neutralizantes en ninguno de los grupos al momento de la inoculación del segundo antígeno (virus completo). Sin embargo, una semana después de haber suministrado el virus, hay una diferencia estadísticamente significativa entre la media de los títulos de sueros de ratones previamente inoculados con la proteína MS2-VP8' (1:2,360), y la del grupo control inmunizado con proteína bacteriana (1:430), o la del grupo inmunizado con MS2-VP5' (1:460). Después de inmunizar con el virus, los anticuerpos neutralizantes van aumentando en todos los grupos, pero la diferencia en relación al que recibió MS2-VP8' como inmunógeno primario se sigue manteniendo hasta 4 semanas después. Hasta este momento no llega a verse un decremento en la respuesta inmune.

Los datos parecen indicar que tanto en el grupo control como en aquel primoinmunizado con MS2-VP5', la respuesta hacia el virus es de tipo primario, mientras que la respuesta de anticuerpos neutralizantes hacia el rotavirus SA11 es secundaria para el grupo sensibilizado con la proteína MS2-VP8'.

Para analizar la inducción de anticuerpos totales generados contra rotavirus en este ensayo de sensibilización, se eligió la medición de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación (IHA). En la tabla V y la figura 14 podemos apreciar que a los 14 días de haber sido suministrada la proteína MS2-VP8', los ratones ya muestran títulos de anticuerpos IHA equiparables a los obtenidos con el suero hiperinmune anti-rotavirus SA11 (entre 1/1600 y 1/3200). Parece claro que una sola dosis de proteína MS2-VP8' es suficiente para despertar una buena respuesta de anticuerpos contra rotavirus, aunque esta no sea de anticuerpos neutralizantes. Sin embargo, el título de anticuerpos IHA no varía significativamente a lo largo del tiempo, después de inmunizar con el virus. Por ello, este método no parece ser el adecuado para hacer un seguimiento del aumento de anticuerpos totales.

Por otro lado, el grupo de ratones inmunizados con MS2-VP5' a las dos semanas presenta títulos de anticuerpos IHA que están casi al nivel basal o que son equiparables al grupo control (inoculado con antígeno bacteriano). Los títulos de anticuerpos IHA aumentan únicamente una semana después de haber inoculado el virus. Esto implica que una sola dosis de este polipéptido de fusión resulta menos inmunogénica que la misma cantidad de MS2-VP8'.

En suma, los resultados sugieren que la proteína MS2-VP8', además de contener alguno o varios epítopes importantes de neutralización, probablemente puede iniciar su propia respuesta sensibilizante. Es decir, con una única dosis de la proteína, se establecen células de memoria que producen una respuesta inmune secundaria de anticuerpos neutralizantes, ante un contacto posterior con el virus homólogo.

## VI. DISCUSION

La producción en gran escala de proteínas virales ofrece nuevos caminos al estudio de sus funciones y al desarrollo de ensayos de diagnóstico y vacunas. Aunque las proteínas de algunos virus pueden obtenerse a partir de cultivar al virus *in vitro*, el proceso resulta costoso y en ocasiones complicado. De ahí la necesidad de implementar otros sistemas para la producción de proteínas de origen viral.

El papel que VP3 desempeña en la infectividad viral y en la inducción de una respuesta inmune neutralizante, hace deseable su análisis biológico e inmunológico. Dicho análisis resulta ahora más viable merced a la relativa facilidad de producción de altos niveles de las proteínas híbridas MS2-VP8' y MS2-VP5'. Asimismo, el contar con estas proteínas de fusión nos permitió caracterizar las regiones virales contenidas en ambas y establecer y analizar sus diferencias, así como localizar, en una de ellas, la función de hemaglutinación de VP3.

A las 12 horas después de la inducción del cultivo bacteriano, la proteína recombinante MS2-VP5', representa aproximadamente el 2% de la proteína total. Esto contrasta con MS2-VP8', que en las mismas condiciones representa aproximadamente el 15% de las proteínas bacterianas. De acuerdo a los resultados mostrados en la figura 6, consideramos que esta diferencia puede deberse esencialmente a una de dos posibles causas. La primera sería una inestabilidad de MS2-VP5', aunque esto no lo hayamos podido demostrar con los experimentos realizados (fig. 7). Sin embargo, hemos observado que a las 5 horas de iniciada su producción MS2-VP5' alcanza un nivel que se mantiene constante, al menos 12 horas después de la inducción. Esto último puede representar la estabilidad de MS2-VP5' o un proceso de degradación y síntesis que mantiene un nivel constante de la proteína.

Una segunda alternativa, consiste en que la proteína MS2-VP5' no se acumule en proporciones mayores al 2% debido a terminaciones tempranas, en la transcripción del gene quimera o en la traducción del RNA mensajero híbrido, dando lugar a los productos protéicos relacionados con MS2-VP5' que se observan en la figura 6. Finalmente, el inicio de traducción en codones internos del RNA mensajero híbrido también podría explicar este resultado y el rendimiento final que se obtiene de la proteína MS2-VP5' completa. Sin embargo, para entender cual o cuales factores influyen principalmente en la baja acumulación de MS2-VP5' y en la generación de productos parciales relacionados, se requiere de una mayor investigación.

La insolubilidad de las proteínas híbridas, generalmente considerada como una cualidad poco deseable, nos ayudó en cambio a demostrar la actividad hemaglutinante de la proteína híbrida MS2-VP8'. La interacción de esta proteína con los eritrocitos es específica, ya que la hemaglutinación es inhibida con anticuerpos dirigidos contra el virus completo. En contraste, la proteína MS2-VP5', analizada en las mismas concentraciones que su homóloga, no es capaz de hemaglutinar. Estas observaciones sugieren que MS2-VP8' contiene dominios estructurales conservados en relación a VP3 y que la actividad hemaglutinante es una función localizada en la mitad amino terminal de esta proteína. Esto había sido sugerido previamente, mediante el uso de anticuerpos monoclonales (132).

El aislamiento en forma soluble de las proteínas expresadas puede requerir el uso de agentes caotrópicos o desnaturalizantes. Será interesante determinar si las proteínas presentan actividades biológicas después de tales tratamientos. La disponibilidad de cantidades abundantes de nuestras proteínas híbridas en forma soluble, sin duda puede facilitar el entendimiento de VP3 en términos de sus características bioquímicas, y funcionales.

El trabajo de mapeo con anticuerpos monoclonales ha permitido identificar diferentes regiones en VP3 que están involucradas en la neutralización (84,101). Estas regiones se encuentran tanto en VP8 (aminoácidos 87-89, 100, 114-135, 148-150, 173-188) como en VP5 (aminoácidos 388-393). Además, el aminoácido 393 forma parte de un determinante antigénico capaz de inducir anticuerpos que neutralizan a varios serotipos. Con esta información resultaba interesante determinar la capacidad de los determinantes antigénicos contenidos en MS2-VP8' y en MS2-VP5' para inducir anticuerpos neutralizantes, y así evaluar su posible uso como vacuna.

Los resultados obtenidos con los ensayos de inhibición de hemaglutinación y con la inmunoelectrotransferencia, indican que los anticuerpos inducidos tanto por MS2-VP5' como por MS2-VP8' reconocen al rotavirus SA11. Esto implica que estas proteínas híbridas son capaces de adoptar, al menos en algunas regiones, la conformación correcta y de presentar al sistema inmune epítopes similares a los de las partículas virales completas.

Por otro lado, sólo los anticuerpos inducidos por MS2-VP8' son capaces de neutralizar la infectividad de SA11. Los animales inoculados con MS2-VP8' presentan un título de anticuerpos neutralizantes de 1/1,600. Este resulta equiparable al inducido por una proteína híbrida derivada de VP7 (96), suministrada a ratones con un esquema de inmunización semejante al que se utilizó en este trabajo.

Vemos que mientras las proteínas recombinantes derivadas de VP7 (VP7-Bgal; ref.96) y VP3 (MS2-VP8') estimulan la producción de anticuerpos neutralizantes en títulos similares, la partícula completa de SA11 induce un título aproximadamente 20 veces mayor. Esta diferencia puede deberse a que en el virus las proteínas de la capa externa adquieren una conformación que les permite exponer ciertos epítopes de neutralización que permanecen ocultos o en conformaciones incorrectas en las proteínas recombinantes. Además, en la conformación de VP3 o de VP7 en el virión probablemente influyen tanto interacciones con moléculas adyacentes como interacciones de las diferentes regiones de una misma proteína.

Los anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación inducidos por MS2-VP5' y MS2-VP8' alcanzan títulos de 1/2,000. Estos, a diferencia del título neutralizante inducido por MS2-VP8', es semejante al obtenido con la partícula viral completa.

Las diferencias en los títulos de neutralización y las similitudes en los de inhibición de la hemaglutinación que aparecen entre el virus y MS2-VP8', pudieran deberse a que los epítopes de neutralización se encuentran menos accesibles en MS2-VP8' que los de hemaglutinación. Por otro lado, para que el virus sea neutralizado, aparentemente los anticuerpos deben reaccionar con regiones muy específicas de VP3 (epítopes de neutralización). Mientras que pudiera ser que los anticuerpos dirigidos contra VP3 logren inhibir la hemaglutinación ya sea reconociendo al epítope hemaglutinante, o logrando causar un cambio conformacional de la hemaglutinina o un impedimento estérico que bloquee su actividad. De hecho, se ha observado que anticuerpos policlonales y monoclonales dirigidos contra VP7 también son capaces de inhibir la hemaglutinación (37).

Observamos que una semana después de inmunizar con MS2-VP8' aparece una buena respuesta de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación (fig. 14), pero todavía no se detectan anticuerpos neutralizantes (fig.13). Esto puede deberse a que son pocos los epítopes de neutralización que existen en la proteína y que un inóculo no resulta suficiente para inducir una respuesta de esta forma detectable; o, tal vez se requieren clonas productoras de anticuerpos de mayor afinidad para llevar a cabo la neutralización.

Los anticuerpos inducidos por MS2-VP5' no fueron capaces de neutralizar la infectividad del rotavirus SA11, pero sí de interaccionar con él, basados en el ensayo de inhibición de la hemaglutinación y de inmunoelectrotransferencia. Esto sugiere que el determinante antigénico que comprende al aminoácido 393 no se encuentra en la conformación adecuada en la proteína de fusión o no está accesible para interaccionar con el sistema inmune de

los ratones. Mientras tanto, otros epítopes no relacionados con neutralización permanecen íntegros.

En la figura 14 se aprecia que una sola inmunización con MS2-VP8' induce anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación en títulos de alrededor de 1/2000. Mientras tanto, para llegar a estos niveles con MS2-VP5' se requieren dos inmunizaciones. Esto parecería indicar que MS2-VP8' es más inmunogénica que MS2-VP5'. Sin embargo, es difícil sustentar este tipo de explicación, dado que en nuestros ensayos, las proteínas híbridas no están puras y cada una va acompañada de distintas cantidades de proteína bacteriana. Por este motivo, el extracto con MS2-VP5' se inoculó en una dosis de proteína total 3 veces mayor que el extracto con MS2-VP8'. Como se ha demostrado en otros casos (124), esto podría resultar en un efecto de competencia antigénica que oscureciera la respuesta inmune hacia MS2-VP5' en particular, o hacia ambas proteínas de fusión.

La reacción de los sueros antiMS2-VP8' y antiMS2-VP5' con los polipéptidos de SA11 separados y fijados a papel de nitrocelulosa, corroboró la inmunogenicidad de ambas proteínas híbridas. Como se esperaba, estos sueros hiperinmunes estaban claramente enriquecidos en anticuerpos dirigidos contra VP8 o VP5, según fuera el caso. Por su parte, los sueros preinmunes reaccionaron sobre todo con VP6 y VP2. Esto aparece como un fondo inespecífico propio del ensayo, dado que en controles en donde no se añadió suero de ratón, algunas de las proteínas virales también se tiñeron con el sustrato de la peroxidasa. Sin embargo, cabe la posibilidad de que al inicio del experimento, nuestros ratones hubieran sido ya infectados por rotavirus de origen murino. Sin embargo, si este fuera el caso, el rotavirus infectante pertenecería a un serotipo diferente al 3, ya que no se encontraron anticuerpos neutralizantes contra este serotipo en los sueros preinmunes.

Aunque los anticuerpos neutralizantes inducidos por MS2-VP8' están dirigidos principalmente contra SA11 (serotipo 3), son capaces de neutralizar, aunque en menor medida (1/400), al rotavirus ST3 (serotipo 4). Descartamos el hecho de que esta reacción cruzada se deba a anticuerpos inducidos por algún rotavirus murino, puesto que los sueros del grupo control con antígeno bacteriano, no neutralizaron a ST3. En cambio, puede ser que los rotavirus de serotipo 3 y 4 compartan algún determinante de neutralización que se encuentre contenido y sea presentado por MS2-VP8'.

La administración, a ratones, de una sola dosis de la proteína MS2-VP8' no indujo anticuerpos neutralizantes contra el rotavirus SA11; sin embargo, sí fue capaz de sensibilizar al sistema inmune de los animales para una respuesta secundaria, de la misma manera como

ha sido mostrado con péptidos sintéticos derivados de la hemaglutinina de influenza (121); la proteína VP1 de poliovirus (120) y el virus de la fiebre aftosa (121); la proteína VP7 de rotavirus (133); y con un polipéptido de fusión sintetizado en *E. coli* derivado de la proteína VP1 del virus de la hepatitis A (122).

La rápida conversión de los sueros de los ratones inmunizados con MS2-VP8' de no neutralizantes a neutralizantes en títulos altos después de administrar el virus completo, es consistente con el clásico modelo de hapteno-acarreador (134). Pensamos que esta proteína recombinante actúa como acarreador para inducir una respuesta de linfocitos T ayudadores (Th), la cual facilita la respuesta de anticuerpos neutralizantes anti-virus dirigida contra epítopes específicos (haptenos) después de administrar al virus.

En ratones inmunizados tanto con una de las glicoproteínas purificadas del virus del herpes simple (125), como con virus vaccinia recombinante que expresa el gene env del retrovirus de la leucemia Friend (135), se han inducido respuestas proliferativas específicas de células T en ausencia de una respuesta humoral detectable. En ambos casos hubo un aumento significativo de anticuerpos neutralizantes, después de retar a los animales con el virus completo. Es todavía más importante el hecho de que estos animales no desarrollaron los síntomas clínicos inducidos en los ratones control.

La sensibilización con el polipéptido MS2-VP8' induce una respuesta humoral aumentada de anticuerpos neutralizantes contra el rotavirus SA11. Esta respuesta puede estar dirigida únicamente contra los epítopes que MS2-VP8' comparte con la VP3 viral, o bien contra estos y otros que no fueron presentados al sistema inmune por la proteína híbrida. Esto último iría de acuerdo con el trabajo de Milich y col. (123) quienes reportan que un péptido de la proteína de nucleocápside del virus de la hepatitis B es capaz de sensibilizar la respuesta inmune hacia epítopes presentes en la proteína de superficie. Estos investigadores postulan que cuando los inmunógenos son agregados protéicos, como son los virus, el sistema inmune los procesa como si fueran una sola molécula. Así, la estructura polimérica es internalizada por células B, cuyo receptor ha interactuado con uno de los epítopes del virus. En consecuencia, en la superficie de estas células B aparecen los determinantes de células T-ayudadoras de cada una de las proteínas virales, asociados a antígenos de histocompatibilidad de clase II, provocando que estas células B interactúen con las células T previamente sensibilizadas con una proteína de nucleocápside. Esto desencadena la producción de anticuerpos contra antígenos tanto de envoltura como de nucleocápside, dependiendo de la especificidad de las células B que internalizaron al virus.

Por otro lado, MS2-VP5' no produce un efecto sensibilizador de la respuesta inmune. Esto puede ser debido a que la proteína MS2-VP5' no contiene epítopes para células T ayudadoras; a que esta región de VP3 tiene epítopes para células supresoras; o a otro mecanismo que no conocemos.

En relación a la sensibilización del sistema inmune por MS2-VP8', es interesante notar que aparentemente la primera infección por rotavirus es la causante de diarreas más severas que requieren de hospitalización, mientras que las subsecuentes infecciones suceden de manera asintomática o con sintomatología leve (126). Esto sugiere que una vacuna, capaz de sensibilizar la respuesta inmune, podría causar que una infección primaria por rotavirus se comportara como secundaria. Esta estrategia de vacunación estaría dirigida no a prevenir la infección, sino a reducir o eliminar los síntomas de la misma, lo que sería de gran utilidad para reducir, principalmente, el alto índice de mortalidad causado por rotavirus. Sin embargo, es importante mencionar que para que una vacuna contra rotavirus sea efectiva, debe estimular la respuesta inmune local (ver adelante), y que todos los experimentos aquí descritos fueron realizados utilizando la vía parenteral (subcutánea) para la administración del inmunógeno.

En el análisis de inmunógenos contra rotavirus también se ha trabajado con péptidos sintetizados de secuencias de VP3 (127). Uno de estos péptidos, comprende los aminoácidos 220 a 233 de VP3, región también contenida en MS2-VP8'. Resulta interesante que este péptido es capaz de sensibilizar la respuesta inmune contra SA11 y contra ST3 (serotipo 4) pero no contra rotavirus de serotipos 1 y 2, lo cual está de acuerdo con los resultados de neutralización obtenidos con los sueros anti-MS2-VP8'.

En la actualidad ya se está probando la capacidad de ciertas proteínas recombinantes como inmunógenos contra enfermedades específicas (109,125). Recientemente se realizaron pruebas en humanos para analizar la protección, que podría brindar una proteína viral construída en *E. coli*, contra *Plasmodium Falciparum* (128). Si bien los resultados no son conclusivos, sí resultan alentadores en cuanto a que las personas que fueron inmunizadas con dicho antígeno y expuestas al patógeno, desarrollaron síntomas clínicos de menor severidad que los controles no inoculados con la proteína recombinante. En el caso de las proteínas recombinantes de rotavirus, todavía se está lejos del terreno de la aplicación. El trabajo que aquí se presenta plantea únicamente los primeros pasos en la posible realización de una vacuna por métodos de DNA-recombinante. Quedan muchas interrogantes por resolverse.

Sabemos que las infecciones por rotavirus están confinadas al tracto gastrointestinal, por lo que para que una vacuna contra este patógeno sea efectiva, debe generar una respuesta inmune local. Todos los experimentos aquí descritos fueron realizados administrando el inmunógeno por vía parenteral. Esto implica que, aunque los resultados obtenidos hasta ahora son prometedores, es de suma importancia evaluar la capacidad de la proteína MS2-VP8' para sensibilizar la respuesta de anticuerpos IgA secretores en el intestino. En este sentido, surge la posibilidad de sintetizar las regiones importantes de VP3 en cepas atenuadas de Salmonella (129), ya sea a partir de plásmidos recombinantes o mediante la incorporación de estos genes quimera en el genoma de la bacteria, para probar las cepas recombinantes como vacunas vivas orales.

Las contribuciones relativas de las proteínas VP3 y VP7 a la generación global de protección, está todavía por establecerse. Pudiera ser que un buen inmunógeno debiera estar constituido de una mezcla de antígenos derivados de ambas proteínas, por lo que los datos obtenidos con esta caracterización de antígenos derivados de VP3, deben sumarse a los resultados que hasta hoy se tienen de caracterizaciones inmunológicas de proteínas recombinantes derivadas de VP7. Además, no sólo las proteínas de la capa externa del rotavirus deben considerarse como candidatos de vacuna. En algunos estudios se ha observado que, aunque la mayoría de los anticuerpos neutralizantes se producen contra VP3 y VP7, los componentes internos del virus también presentan esta actividad inductora (93). Otros investigadores han reportado la presencia de epítopes menores de neutralización en VP6 (130). Por ello no se descarta la posibilidad de que esta proteína de capa interna también pueda desempeñar algún papel en la protección contra la infección o la enfermedad.

Por otra parte, existen evidencias, utilizando becerros como sistema experimental, de que se puede obtener protección heterotípica aun en ausencia de anticuerpos neutralizantes para el rotavirus heterotípico (131). Esto indica que pueden y muy probablemente existen, otros mecanismos, diferentes a la actividad neutralizante, también importantes en la protección contra rotavirus.

Queda aun mucho trabajo por hacer para determinar el significado que la inmunogenicidad de MS2-VP8' pueda tener en la protección contra la infección o la enfermedad causada por rotavirus. Sin embargo, la expresión de niveles altos de un antígeno viral capaz de inducir anticuerpos neutralizantes y de sensibilizar la respuesta inmune contra rotavirus, representa un paso adelante en el camino hacia la posible obtención de una vacuna efectiva contra rotavirus basada en la ingeniería genética.

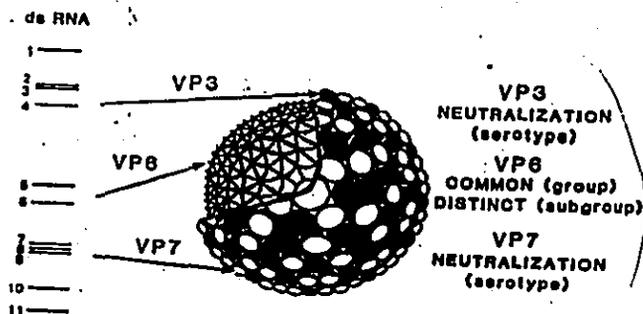


Figura 1.-

Estructura esquemática del rotavirus. Proteínas estructurales y asignamiento genético.

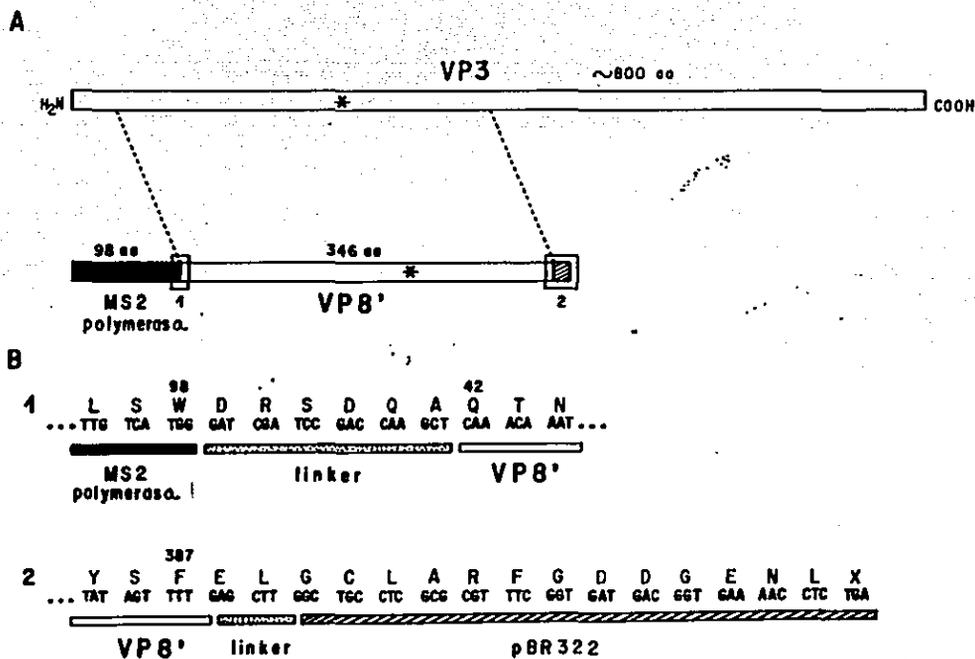
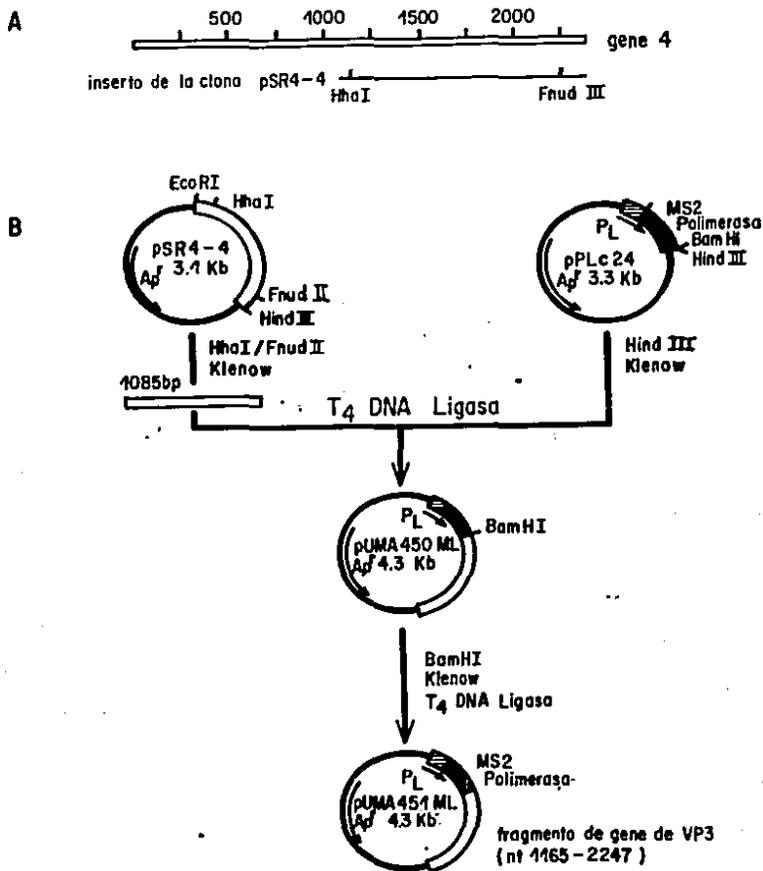


Figura 2.-

A) Representación esquemática del polipéptido híbrido MS2-VP8', esperado en la construcción del pUMA481ML. El asterisco señala el sitio de corte (aminoácidos 241 al 247). B) Secuencia nucleotídica y de aminoácidos de las regiones de unión enmarcadas en (A), predichas en base a la construcción del plásmido. Los números arriba de los aminoácidos representan la posición de los mismos en la proteína original. La X denota el codón de terminación.



**Figura 3.-**

Construcción de un vector de expresión para el gene 4(3') del rotavirus SA11. A) Posición relativa, con respecto a la longitud completa del gene 4, del inserto de cDNA viral contenido en el plásmido pSR4-4. El inserto contiene del nucleótido 1057 al 2252 de la secuencia codificadora de VP3. B) Pasos involucrados en la construcción del plásmido de expresión pUMA451ML.

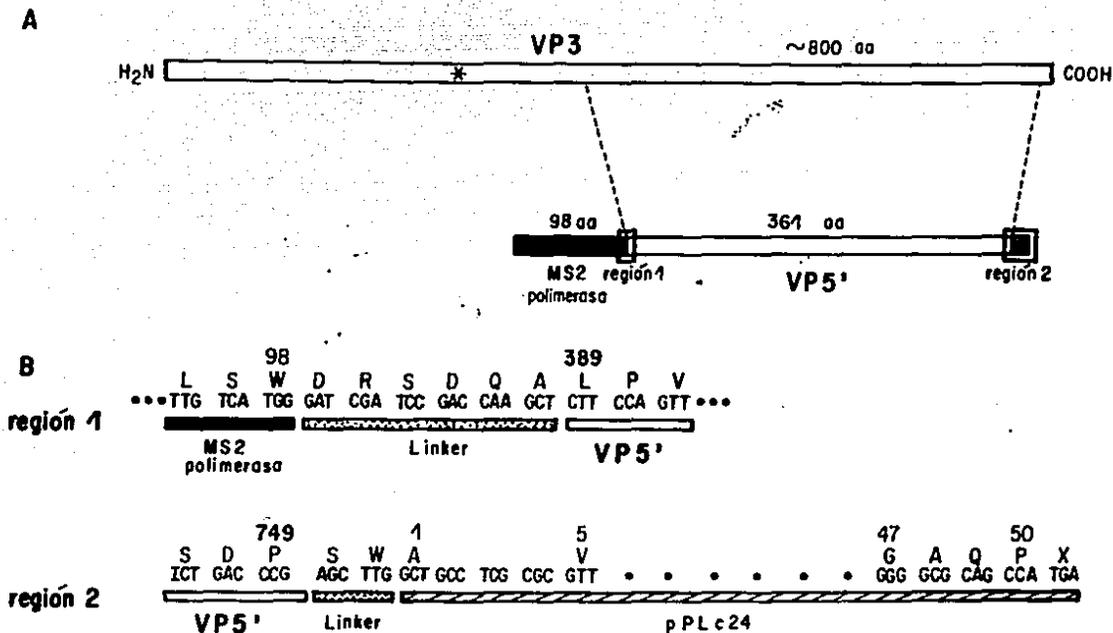


Figura 4.-

A) Representación esquemática del polipéptido MS2-VP5', esperado de la expresión del pUMA451ML. El asterisco indica el sitio de rompimiento con tripsina. B) Secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de las uniones encuadradas en (A), predichas de acuerdo a la construcción del plásmido. Los números que aparecen sobre los aminoácidos señalan su posición en la proteína original. El codón de terminación de la traducción se indica con una X.

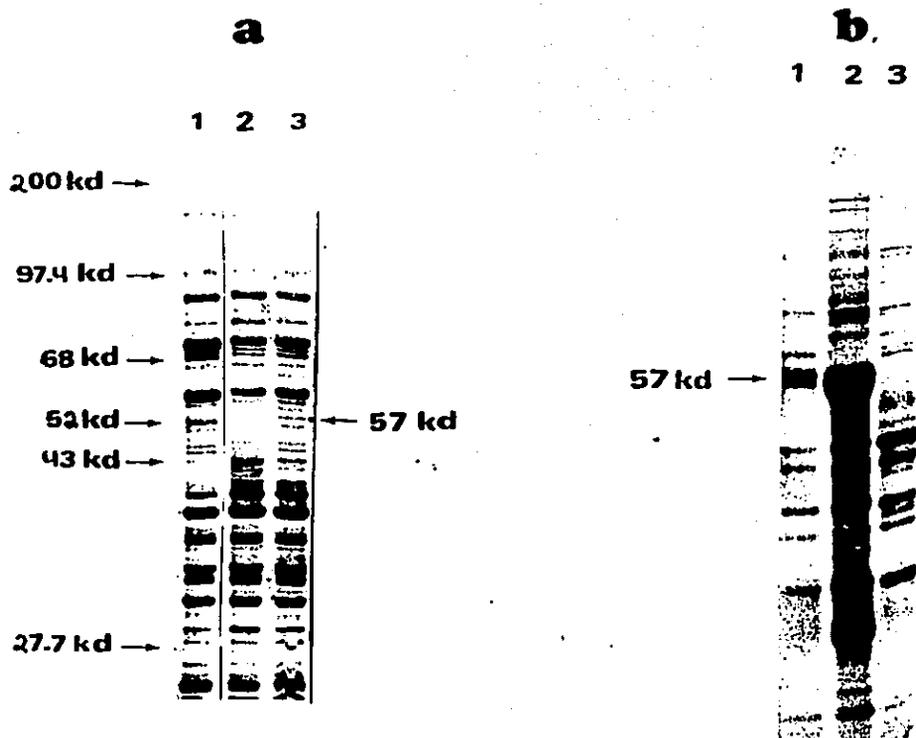


Figura 5.-

**A)** Gel de poliacrilamida-SDS al 10% en que se analizaron las proteínas totales sintetizadas después de 12 horas de inducción, por las bacterias M5219 transformadas con los plásmidos: 1) pUMA481ML; 2) pPLc24; y 3) pUMA451ML. Las flechas señalan a las proteínas de interés: MS2-VP8' (52 Kd) y la supuesta proteína MS2-VP5' (de 57 Kd). Los marcadores de peso molecular son: miosina (cadena pesada) de 200 Kd; fosforilasa B, de 97 Kd; albúmina de suero bovino, de 68 Kd; ovalbúmina, de 43 Kd; quimotripsinógeno, de 27.5 Kd.

**B)** Análisis en un gel de acrilamida-SDS al 10% de las proteínas híbridas enriquecidas por centrifugación a baja velocidad. Se observan las proteínas obtenidas en el sedimento de una centrifugación a baja velocidad de lisados de bacterias M5219 conteniendo el vector pUMA451ML (carril 1), el vector pUMA481ML (carril 2) y el vector pPLc24 (carril 3).

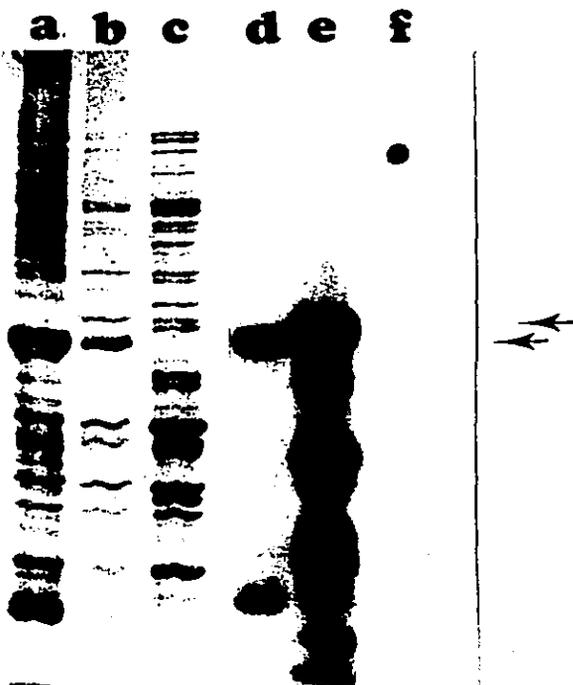


Figura 6.-

Análisis por inmunoelectrotransferencia de las proteínas sintetizadas por las bacterias recombinantes. Los extractos protéicos enriquecidos, provenientes de la cepa M5219 de *E. coli* (inducidas con calor durante 12 horas), conteniendo el plásmido pUMA481ML (carriles A y D), pUMA451ML (carriles B y E), o pPLc24 (carriles C y F); se separaron en un gel de acrilamida al 10% y se tiñeron con azul de Coomassie (carriles A, B y C) o fueron transferidas a papel de nitrocelulosa (carriles D, E y F). Las proteínas transferidas se incubaron con una dilución 1/500, de suero de conejo anti-SA11. El anticuerpo unido se identificó con proteína A-<sup>125</sup>I de *S. aureus*. Las flechas señalan las posiciones de las proteínas MS2-VP8' (carril D) y MS2-VP5' (carril E).

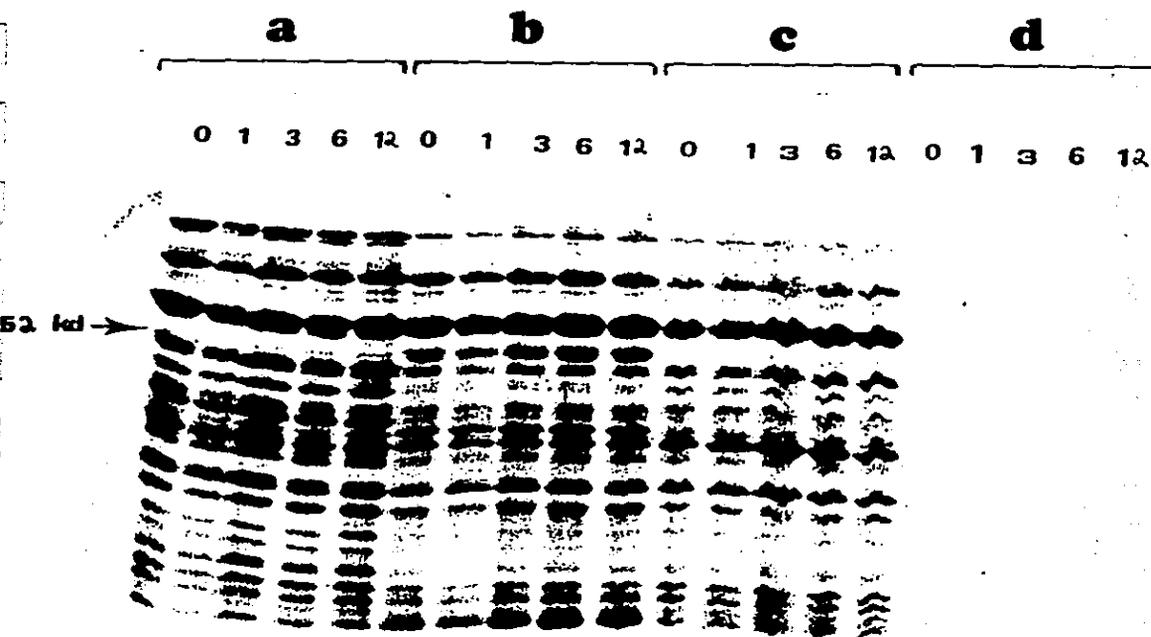


Figura 7.-

Estabilidad de las proteínas recombinantes en *E. coli*. Se muestra la fluorografía de las proteínas bacterianas marcadas con metionina-<sup>35</sup>S y separadas en un gel de acrilamida-SDS al 10%. Después de crecer la cepa de *E. coli* M5219, transformada con el plásmido pPLc24 (A); pUMA481ML (B); o pUMA451ML (C), hasta una OD<sub>600</sub>=1, se indujo la expresión a 42°C en medio mínimo. Al cabo de 2 horas se dió un pulso de 30 min con metionina-<sup>35</sup>S e inmediatamente se agregó un exceso de metionina fría. Se tomaron alícuotas a los tiempos 0, 1, 3, 6 y 12 horas, después de agregar la metionina fría. D) Grupo de alícuotas equivalente a (B), que previo al pulso de marca radiactiva, se incubó durante 5 min con el exceso de metionina fría.

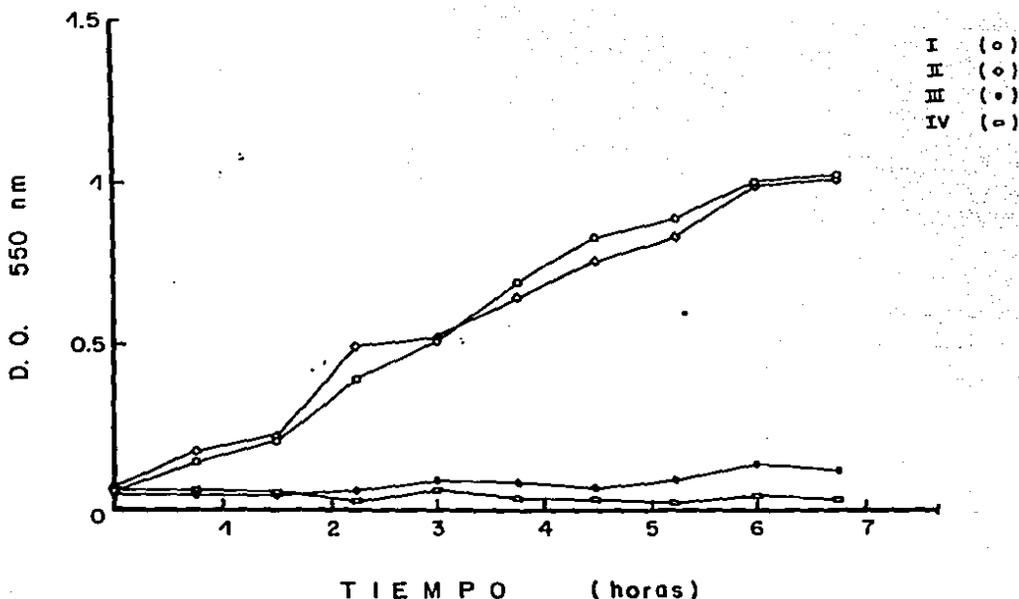


Figura 8.-

Efecto de la síntesis de MS2-VP8' y MS2-VP5' sobre el crecimiento bacteriano. La expresión de los genes híbridos en cultivos bacterianos crecidos a baja densidad (cepa M5219), conteniendo los plásmidos pPLc24 (II), pUMA451ML (III), pUMA481ML (IV), o sin transformar (I), se indujeron con un cambio de temperatura (de 28°C a 42°C). A intervalos de 45 min se tomaron alícuotas que se leyeron a una densidad óptica de 600 nm. Se observa que a esta temperatura las bacterias crecen normalmente sólo en ausencia de las proteínas recombinantes.

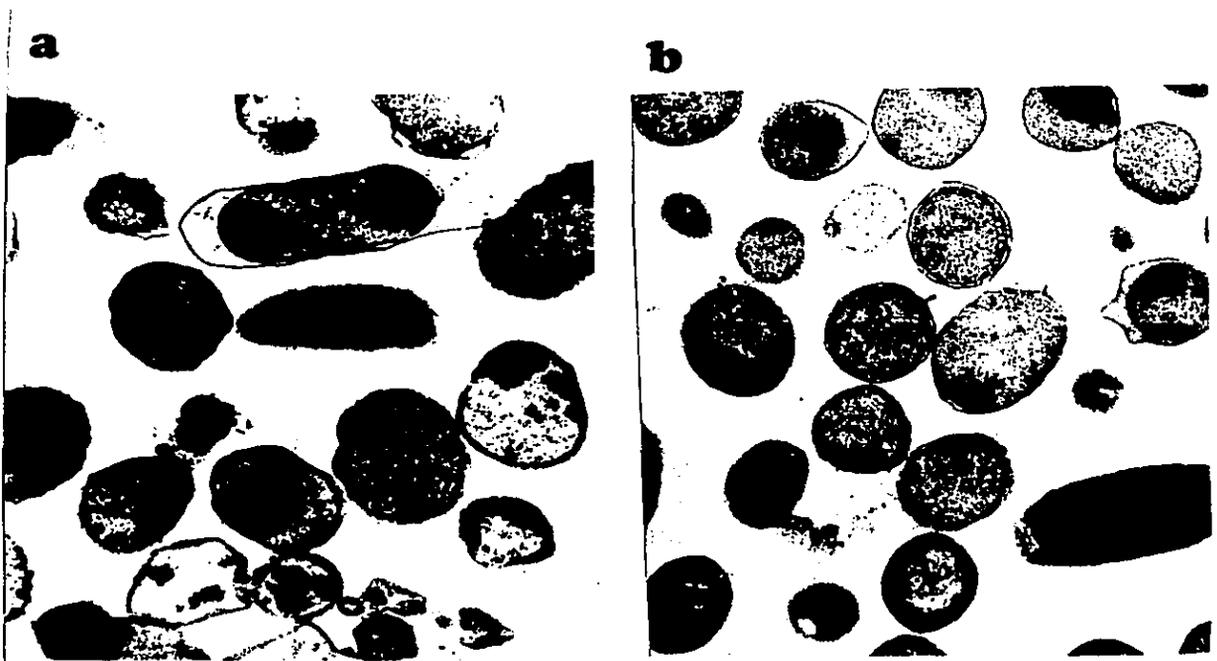


Figura 9.-

Microscopía electrónica de bacterias M5219 inducidas a 42 °C, transformadas con los plásmidos pUMA481ML (A), y pPLc24 (B). (Amplificación de 3,000 veces).

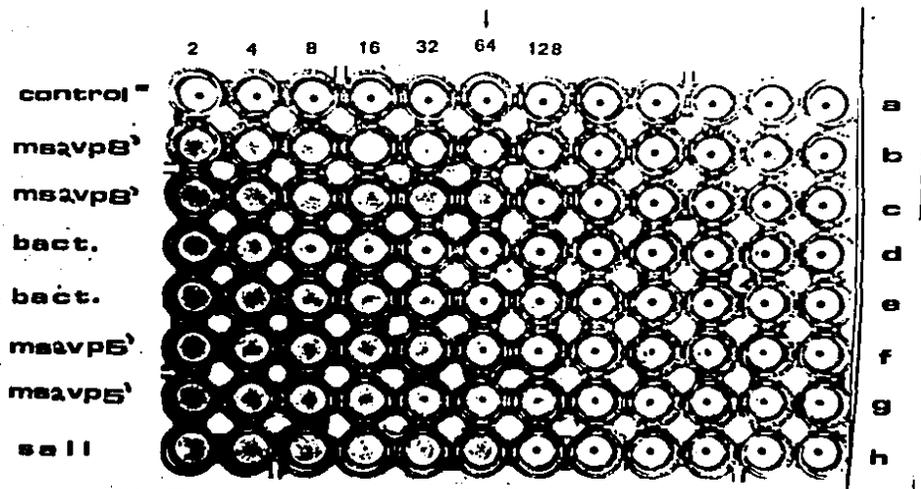


Figura 10.-

Actividad hemaglutinante de las proteínas de fusión de VP3 expresadas en *E. coli*. En una placa de microtitulación se hicieron diluciones dobles seriadas en PBS, de un lisado de rotavirus (H) o de extractos bacterianos en estado de inducción y enriquecidos, transformados con los plásmidos pUMA481ML (B,C), pPLc24 (D,E) o pUMA451ML (F,G). La concentración protéica inicial en los extractos bacterianos fue de 3.2 mg/ml. La hilera (A) corresponde a PBS/0.2% RSA como control negativo. A cada pozo se le añadió un volumen igual de una suspensión de eritrocitos tipo O de humano al 0.4% (V/V) en PBS/0.2% RSA y la reacción de hemaaglutinación se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 90 minutos. Los números en la parte superior indican los factores de dilución del lisado de rotavirus o de los extractos bacterianos. La flecha señala la dilución final del extracto con MS2-VP8' que produjo hemaaglutinación.

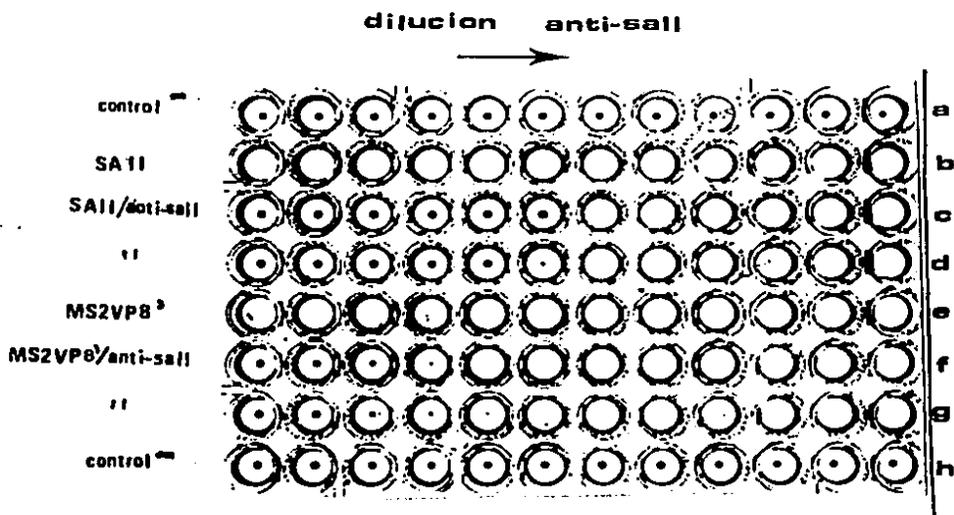


Figura 11.-

Inhibición de la hemaglutinación. Se hicieron diluciones dobles seriadas de un suero anti-SA11 en PBS/0.2% RSA, con excepción de las hileras B y E, en donde no se añadió suero anti-SA11 sino sólo PBS/0.2% RSA. A cada pozo se agregaron 4 unidades hemaglutinantes del lisado de rotavirus SA11 (B,C,D) o del extracto bacteriano conteniendo la proteína MS2-VP8<sup>3</sup> (E,F,G). Después de una hora de incubación a temperatura ambiente, se añadieron eritrocitos tipo O de humano y se prosiguió la incubación por 90 minutos antes de leer la placa.

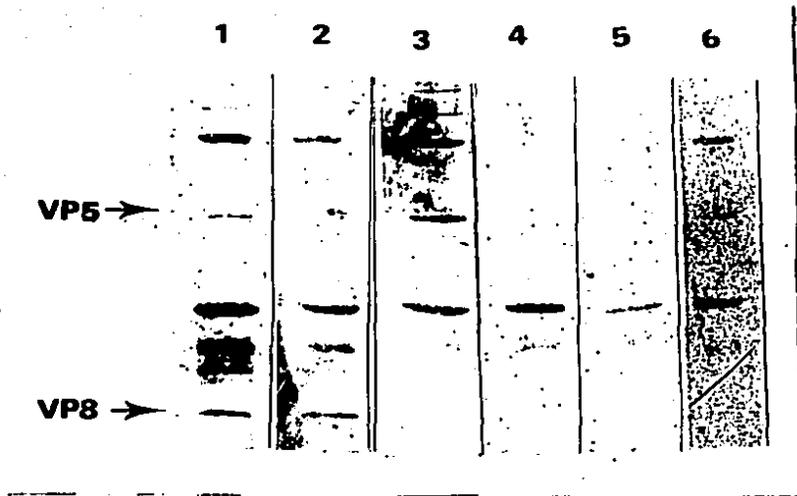


Figura 12.-

Inmunoelctrotransferencia de las proteínas estructurales del rotavirus SA11. Las proteínas de la partícula viral completa se separaron en un gel de acrilamida-SDS al 10% y se transfirieron a papel de nitrocelulosa. Los papeles se incubaron con una dilución 1/250 de sueros de ratones colectados el día 66 después de inmunizados con: 1) rotavirus SA11; 2) extracto enriquecido con el polipéptido MS2-VP8'; 3) extracto enriquecido con la proteína MS2-VP5'; 4) extracto bacteriano control. En el carril 5 se muestra la reactividad del suero preinmune del ratón 1. Como control, en el carril 6 se omitió el uso de suero de ratón en el ensayo. El anticuerpo unido se hizo reaccionar con una dilución 1/1500 de anti-IgG de ratón unido a peroxidasa, y finalmente se añadió como sustrato, cloronaftol.

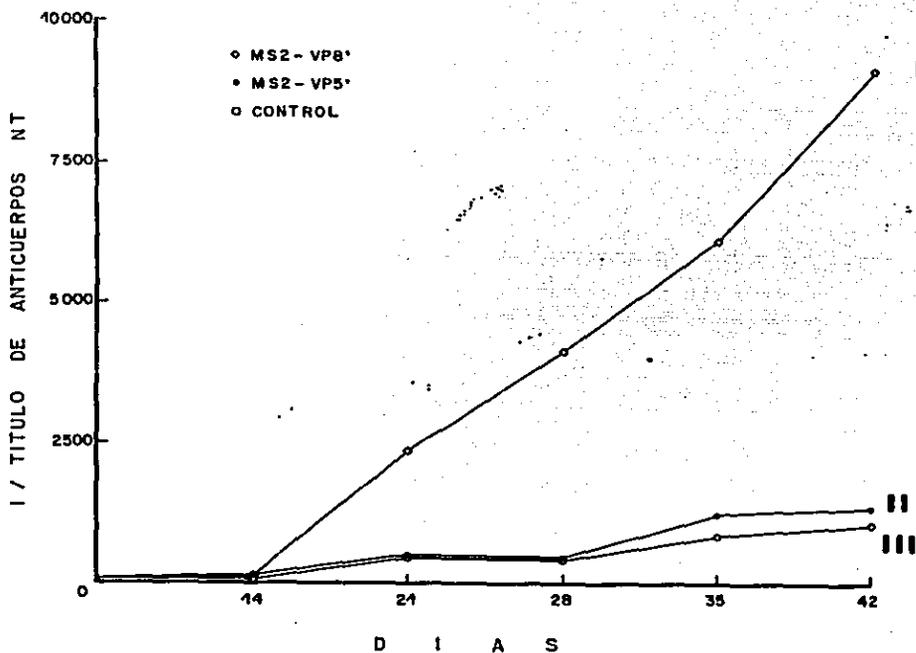


Figura 13.-

Comparación de la respuesta inmune de ratones inmunizados con extractos enriquecidos del polipéptido MS2-VP8' (I), de MS2-VP5' (II), o de antígeno bacteriano sólo (III). A los 14 días todos los ratones fueron inoculados con rotavirus SA11. El título se expresa como el recíproco de la dilución más alta del suero que neutraliza el 60% de los focos infecciosos. Se presenta la media aritmética de cada grupo.

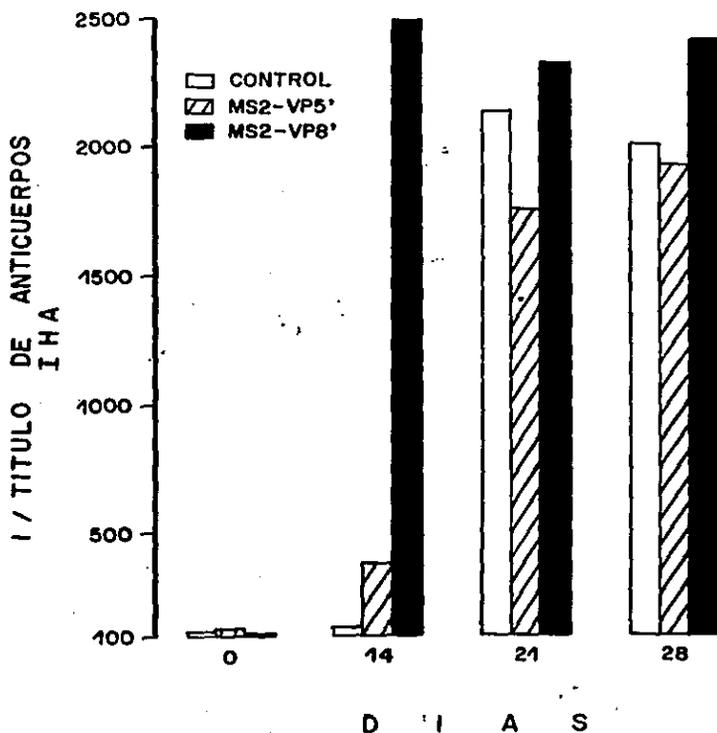


Figura 14.-

Media aritmética de los títulos de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación de los sueros de los ratones analizados en la figura 13. Al tiempo 0 los ratones fueron inmunizados con MS2-VP8'  ; con MS2-VP5'  ; o con antígeno bacteriano  . A los 14 días todos los ratones se inmunizaron con rotavirus SA11. El título se expresa como el recíproco de la dilución más alta del suero que inhibe completamente la hemaglutinación del rotavirus SA11 con eritrocitos tipo O de humano.

**TABLA I**

**Esquema de inmunización para la producción de anticuerpos  
contra las proteínas recombinantes derivadas de VP3.**

Grupo (No. de Ratones)	Inmunógeno	Dosis ( $\mu$ g) de proteína total inoculada los días 0,14,29,44 y 59 *
Grupo I (8)	MS2-VP8' <sup>a</sup>	100 (30) <sup>b</sup>
Grupo II (8)	MS2-VP5' <sup>a</sup>	260 (30)
Grupo III (4)	control <sup>c</sup>	100 (0)
Grupo IV (2)	virus SA11	50 (5)

<sup>a</sup> Extracto proteico de *E. coli* M5219 con los plásmidos pUMA481ML y pUMA451ML, respectivamente, tratadas por el método de enriquecimiento de proteínas insolubles, descrito en "Materiales y Métodos".

<sup>b</sup> En paréntesis se muestran los  $\mu$ g de la porción de VP3, contenida en la proteína híbrida presentes en el total de proteínas inoculadas.

<sup>c</sup> Proteínas de bacterias transformadas con el vector pPLc24, tratadas de la manera descrita en (a).

\* Al día 0 el inmunógeno se administró con adyuvante completo de Freund; las otras inoculaciones se hicieron en adyuvante incompleto.

**TABLA II**

Inducción de anticuerpos neutralizantes (NT) e inhibidores de la hemaglutinación (IHA), por los polipéptidos MS2-VP8' y MS2-VP5'.

Ratón	inmunógeno	título de anticuerpos NT de los sueros colectados el día:*		título de anticuerpos IHA de los sueros colectados el día:**	
		0	66	0	66
<b>Grupo I</b>	<b>MS2-VP8'</b>				
1		≤1:50	1:800	1:200	1:1000
2		≤1:50	1:1600	1:200	1:2000
3		≤1:50	1:1600	1:200	1:2000
4		≤1:50	1:800	1:200	1:1000
5		≤1:50	1:800	1:200	1:1000
6		≤1:50	1:1600	1:200	1:1000
7		≤1:50	1:800	1:200	1:2000
8		≤1:50	1:1600	1:200	1:2000
<b>Grupo II</b>	<b>MS2-VP5'</b>				
9		≤1:50	1:50	1:200	1:2000
10		≤1:50	1:50	1:200	1:2000
11		≤1:50	1:50	1:200	1:1000
12		≤1:50	1:50	1:200	1:200
13		≤1:50	1:100	1:200	1:2000
14		≤1:50	1:50	1:200	1:1000
15		≤1:50	1:50	1:200	1:2000
16		≤1:50	1:50	1:200	1:1000
<b>Grupo III</b>	<b>control</b>				
17		≤1:50	1:50	1:200	1:200
18		≤1:50	1:50	1:200	1:240
19		≤1:50	1:50	1:200	1:100
20		≤1:50	1:50	1:200	1:200
<b>Grupo IV</b>	<b>virus SA11</b>				
21		≤1:50	1:32000	1:200	1:2000
22		≤1:50	1:36000	1:200	1:2000

\* El título se expresa como la dilución más alta del suero que neutraliza el 80% de los focos infecciosos.

\*\* El título se expresa como la dilución más alta del suero que inhibe completamente la hemaglutinación del rotavirus SA11 con los eritrocitos tipo O de humano.

**TABLA III**

Protocolo de inmunización para el análisis de la respuesta inmune hacia el rotavirus SA11, sensibilizada con las proteínas MS2-VP8<sup>a</sup> y MS2-VP5<sup>b</sup>.

Grupo (No. de Ratones)	Inmunógeno (dosis de proteína total) inoculada el día: <sup>c</sup>	
	0	15
Grupo I (10)	MS2-VP8 <sup>a</sup> (600 µg)	virus SA11 <sup>d</sup> (50 µg)
Grupo II (10)	MS2-VP5 <sup>b</sup> (1600 µg)	virus SA11 (50 µg)
Grupo III (10)	control <sup>c</sup> (600 µg)	virus SA11 (50 µg)

<sup>a</sup>Al día 0 el inmunógeno se administró con adyuvante completo de Freund; a los 15 días el virus se inoculó en adyuvante incompleto de Freund.

<sup>b</sup>El extracto bacteriano con el pUMA481ML se preparó por el método de de enriquecimiento de proteínas insolubles descrito en "Materiales y Métodos". 600 µg de proteína total contienen, aproximadamente, 200 µg del polipéptido viral contenido en la proteína híbrida MS2-VP8<sup>a</sup>.

<sup>c</sup>El extracto bacteriano con el pUMA451ML se preparó como se describe en (a). 1600 µg de proteína total bacteriana contienen, aproximadamente, 200 µg del polipéptido viral contenido en la proteína híbrida MS2-VP5<sup>b</sup>.

<sup>c</sup>Proteínas bacterianas transformadas con el vector pPLc24 preparadas como se describe en (a).

<sup>d</sup>Cada ratón recibió 50 µg de virus, que aproximadamente contienen 5 µg de la proteína VP3.

**TABLA IV**

Anticuerpos neutralizantes (NT) determinados en los sueros  
obtenidos del esquema de inmunización de la tabla III.

Ratón	Títulos* de anticuerpos NT de los sueros tomados el día:**					
	t=0	t=14	t=21	t=28	t=35	t=42
<b>Grupo I</b>						
1	<50	<50	1600	6400	6400	12800
2	50	100	6400	12800	6400	12800
3	<50	50	800	1600	1600	3200
4	50	100	400	800	1600	3200
5	50	<50	3200	6400	12800	12800
6	50	100	1600	1600	6400	-
7	<50	<50	1600	3200	6400	12800
8	50	<50	1600	1600	6400	6400
9	<50	50	3200	3200	6400	6400
10	50	<50	3200	3200	6400	12800
<b>Grupo II</b>						
11	<50	<50	400	200	400	800
12	<50	<50	800	800	3200	1600
13	50	50	400	800	800	400
14	100	<50	800	800	1600	1600
15	50	50	400	400	800	1600
16	<50	<50	200	200	800	800
17	<50	<50	200	200	400	400
18	<50	200	400	400	1600	3200
19	<50	<50	200	100	800	-
20	-	100	800	400	1600	-
<b>Grupo III</b>						
21	<50	50	400	200	800	1600
22	50	50	800	400	1600	1600
23	50	100	100	200	400	800
24	50	<50	200	200	400	1600
25	<50	50	200	200	400	800
26	-	50	400	100	200	100
27	50	<50	400	400	800	400
28	50	50	800	800	800	800
29	<50	<50	800	800	1600	1600
30	<50	<50	400	400	800	800

\* El título se expresa como el recíproco de la dilución más alta del suero que inhibe el 60% de los focos infecciosos.

\*\* A los 14 días todos los ratones fueron inoculados con virus SA11.

**TABLA V**

Anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación de SA11 (IHA), determinados en los sueros del esquema de inmunización de la tabla III.

Ratón	Títulos* de anticuerpos IHA de los sueros tomados el día:**			
	t=0	t=14	t=21	t=28
<b>Grupo I</b>				
1	100	1600	800	1600
2	100	1600	1600	1600
3	200	1600	3200	3200
4	50	3200	3200	3200
5	100	3200	1600	1600
6	50	3200	1600	3200
7	200	1600	3200	1600
8	100	3200	1600	—
9	100	—	3200	—
10	100	3200	3200	3200
<b>Grupo II</b>				
11	100	400	—	3200
12	50	800	1600	3200
13	100	200	1600	1600
14	200	200	3200	1600
15	100	400	3200	3200
16	100	800	3200	3200
17	100	50	800	800
18	50	100	—	1600
19	100	100	400	400
20	400	800	800	800
<b>Grupo III</b>				
21	200	100	3200	3200
22	50	50	—	1600
23	100	200	800	1600
24	100	200	800	800
25	100	100	3200	800
26	100	100	3200	1600
27	100	100	800	1600
28	200	50	800	3200
29	100	400	3200	3200
30	100	50	3200	3200

\*El título se expresa como el recíproco de la dilución más alta del suero que inhibe completamente la hemaglutinación del rotavirus SA11 con los eritrocitos tipo O de humano.

\*\*A los 14 días todos los ratones fueron inoculados con virus SA11.

## REFERENCIAS

1. Mohs, E., J. Faingezicht, C. Odio, & L. Mata. (1981): Avances en el conocimiento de la diarrea viral. *Infectología* 1, 151-160.
2. Snyder, J.D., & H.M. Merson. (1982): The magnitude of the global problem of acute diarrreal disease: a review of active surveillance data. *Bull WHO* 60, 605-613.
3. Ruiz, M. (1988): Diarreas: información epidemiológica. *Epidemiología*, Sector Salud. 3 No. 1.
4. Diálogo sobre la diarrea. Dic. (1986): Publicación trimestral de *AHRTAG*. 13-17.
5. Cukor, G., & N. Blacklow. (1984): Human Viral Gastroenteritis. *Microbiological Reviews* 48, 157-179.
6. Kapikian, A.Z., R.G. Wyatt, R. Dolin, T.S. Thornhill, A.R. Kalica, & R.M. Chanock. (1972): Visualization by electron microscopy of a 27 nm. particle associated with acute infections in non bacterial gastroenteritis. *J. Virol.* 10, 1075-1081.
7. Bishop, R.F., C.P. Davidson, L.H. Holmes, & B.J. Roek. (1973): Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non bacterial gastroenteritis. *Lancet* 11, 1281-1285.
8. Barnett, B. (1983): Viral gastroenteritis. *Med. Clin. North Am.* 67, 1031-1058.
9. Estes, M.K., E.L. Palmer, & J.F. Obijeski. (1983): Rotaviruses: a review. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 105, 123-184.
10. Kapikian, A.Z., H.B. Greenberg, A.R. Kalica, R.G. Wyatt, H.W. Kim, C.D. Brandt, W.J. Rodríguez, J. Flores, N. Singh, R.H. Parrot, & R.M. Chanock. (1981): New developments in viral gastroenteritis. In. *Acute enteric infections in children: new prospects for treatment and prevention*, edited by T. Holmeij, J. Holmgren, M. Merson, and R. Molby, pp 9-57. Elsevier/North Holland, Amesterdam.
11. Kapikian, A.Z., H.B. Greenberg, R.G. Wyatt, A.R. Kalica, H.W. Kim, C.D. Brant, W.J. Rodríguez, R.H. Parrot. & R.M. Chanock. (1982): Viral gastroenteritis. *Viral infections of humans*, edited by A.S. Evans, pp 282-326. Plenum, New York.

12. Wolf, J.L. (1982): Viral gastroenteritis. *Med. Clin. North Am.* **66**, 575-595.
13. Mc-Nulty, M.S. (1978): Rotaviruses. *J. Gen.* **40**, 1-17.
14. Espejo, R., E. Calderón-Jaimes, y N. González. (1977): Distinct reovirus-like agents associated with acute infantile gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.* **6**, 502-506.
15. Espejo, R., E. Calderón-Jaimes, N. González, A. Salomón, A. Martuscelli, & P. Romero. (1978): Rotavirus gastroenteritis in hospitalized infants and young children in Mexico City. *Lat. Amer. Microbiol.* **20**, 239-246.
16. Calderón-Jaimes, E., R. Espejo, N. González, M. Hernández, P. Romero, & L. Maulen. (1978): Aspectos epidemiológicos de la gastroenteritis producida por rotavirus. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* **35**, 45-55.
17. Calderón-Jaimes, E. (1984): Etiología viral de la gastroenteritis. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* **41**, 577-580.
18. Champsaur, H., E. Questiaux, J. Prevot, M. Henry-Amar, D. Goldszmidt, M.N. Bourjouane, & C. Bach. (1984): Rotavirus carriage, asymptomatic infection, and disease in the first two years of life. I. Virus Shedding. *J. Infect. Dis.* **149**, 667-674.
19. Carlson, J.A.K., P.J. Middleton, M. T. Symansky, J. Huber, & M. Petriv. (1978): Fatal rotavirus gastroenteritis analysis of 21 cases. *Am. Dis. Child.* **132**, 477-479.
20. Espejo, R., E. Calderón-Jaimes, N. González, A. Martuscelli, & P. Romero. (1974): Presence of two distinct types of rotavirus of infants and young children hospitalized with acute gastroenteritis in Mexico City. *J. Infect. Dis.* **139**, 474-477.
21. Sato, K., Y. Inaba, T. Shinozaki, R. Fujii, & M. Matsumoto. (1981): Isolation of human rotavirus in cell culture. *Arch. Virol.* **69**, 155-160.
22. Urasawa, T., S. Urasawa, & K. Taniguchi. (1981): Sequential passages of human rotavirus in MA-104 cells. *Microbiol. and Immunol.* **25**, 1025-1035.
23. Holmes, I.H., B. J. Ruck, R.F. Bishop, & G.P. Davidson. (1975): Infantile enteritis viruses: morphogenesis and morphology. *Virol.* **16**, 937-943.
24. Schnagel, R.D., & I.H. Holmes. (1976): Characteristics of the genome of human infantile enteritis (rota)virus. *J. Virol* **19**, 267-270.

25. Espejo, R., O. Muñoz, F. Serafin, & P. Romero. (1980): Shift in prevalence human rotavirus detected by ribonucleic acid segment differences. *Infect. Immun.* **27**, 351-354.
26. Estes, M.K., D.Y. Graham, & D.H. Dimitrov. (1984). The molecular epidemiology of rotavirus gastroenteritis. *Prog. Med. Virol.* **29**, 1-22.
27. Estes, M.K., D.Y. Graham, F.M. Smith, & C.P. Gerba. (1979): Rotavirus stability and inactivation. *J. Gen. Virol.* **43**, 403-409.
28. Cohen, J. (1977): Ribonucleic acid polymerase activity associated with purified calf rotaviruses. *J. Gen. Virol.* **36**, 395-402.
29. Venkataram Prasad, B.V., G.J. Wabg, J.P.M. Clerx, & W. Chiu. (1988): Three dimensional structure of rotavirus. *J. Mol.* **199**, 269-275.
30. Espejo, R., S. López, & C. Arias. (1981): Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and effect of trypsin. *J. Virol* **37**, 156-160.
31. Liu, M., P. A. Offit, & M.K. Estes. (1988): Identification of the simian rotavirus SA11 genome segment 3 product. *Virology* **163**, 26-32.
32. Flewett, T.H., A. S. Bryden, H. Davies, G.N. Woode, J.C. Bridger, & J.M. Derrick. (1974): Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *Lancet* **2**, 61-63.
33. Woode, G.N., J.C. Bridger, J.M. Jones, T.H. Flewett, A.S. Bryden, H.A. Davies, & G.B. White. (1976): Morphological and antigenic relationships between viruses (rotaviruses) from acute gastroenteritis of children, calves, piglets, mice and foals. *Infect. Immunol* **14**, 804-811.
34. Greenberg, H.B., V. McAuliffe, J. Valdesuso, R. Wyatt, J. Flores, A. Kalica, Y. Hoshino, & N.H. Singh. (1983): Serological analysis of the subgroup protein of rotavirus, using monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* **39**, 91-99.
35. Lambert, J.P., P. Marbehant, D. Marissens, & G. Zissis. (1984): Monoclonal antibodies directed against different antigenic determinants of rotavirus. *J. Virol* **51**, 47-51.
36. Shaw, R., P. Vo, P. Offit, B.S. Coulson, & H.B. Greenberg. (1986): Antigenic mapping of the surface proteins of rhesus rotavirus. *Virology* **155**, 434-451.

37. Greenberg, H.B., J. Valdesuso, K. Wyke, K. Midthun, M. Walsh, V. McAuliffe, R. Wyatt, A. Kalica, J. Flores, & Y. Hoshino. (1983): Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies directed at two surface proteins of rhesus rotavirus. *J. Virol* 47, 267-275.
38. Hoshino, Y., R.G. Wyatt, J. Flores, K. Midthun, & A.Z. Kapikian. (1985): Serotypic characterization of rotavirus derived from asymptomatic human neonatal infections. *J. Clin. Microbiol.* 21, 425-430.
39. Matsuno, S., A. Hasegawa, A. Mukoyama, & S. Inouye. (1985): A candidate for a new serotype of human rotavirus. *J. Virol.* 54, 623-624.
40. Rodger, S.M., R.F. Bishop, C. Birch, B. McLean, I.H. Holmes. (1981): Molecular epidemiology of human rotaviruses in Melbourne, Australia, from 1973 to 1979, as determined by electrophoresis of genome ribonucleic acid. *J. Clin. Microbiol.* 13, 272-278.
41. Rodriguez, W.J., H.W. Kim, C.D. Brandt, M.K. Gardner, R.H. Parrot. (1983): Use of electrophoresis of RNA from human rotavirus to establish the identity of strains involved in outbreaks in a tertiary care nursery. *J. Infect. Dis.* 148, 34-40.
42. Kalica, A.R., H.B. Greenberg, R. Espejo, J. Flores, R.G. Wyatt, A.Z. Kapikian, & R.M. Chanock. (1981): Distinctive ribonucleic acid patterns of human rotavirus subgroups 1 and 2. *J. Infect. Dis.* 33, 958-961.
43. Hoshino, Y., R.G. Wyatt, H.B. Greenberg, J. Flores, & A.Z. Kapikian. (1984): Serotypic similarity and diversity of rotaviruses of mammalian and avian origin as studied by plaque reduction neutralization. *J. Infect.* 149, 694-702.
44. Greenberg, H.B., A.R. Kalica, R.G. Wyatt, R.W. Jones, A.Z. Kapikian, & R.M. Chanock. (1981): Rescue of noncultivable human rotavirus by gene reassortment during mixed infection with ts mutants of a cultivable bovine rotavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 420-424.
45. Hoshino, Y., M.M. Sereno, K. Midthun, J. Flores, R.M. Chanock, & A.Z. Kapikian. (1987): Analysis by plaque reduction neutralization assay of intertypic rotaviruses suggests that gene reassortment occurs in vivo. *J. Clin. Microbiol.* 25, 290-294.

46. Greenberg, H.B., A.R. Kalica, J. Flores, A.Z. Kapikian, R. Wyatt, R. Jones, & J. Valdesuso. (1983): Gene coding assignments for rotavirus studied with genetic reassortants and monoclonal antibodies. In: *Double-stranded RNA viruses*, edited by RW Compans and DHL Bishop. Elsevier, Amsterdam. pp 289-302.
47. Arias, C., S. López, & R. Espejo. (1982): Gene protein products of SA11 simian rotavirus genome. *J. Virol.* **41**, 42-50.
48. Smith, M.L., L. Lazdins, & I.H. Holmes. (1980): Coding assignments of double stranded RNA segments of SA11 rotavirus established by in vitro translation. *J. Virol* **33**, 976-982.
49. Kalica, A.R., J. Flores, & H.B. Greenberg. (1983): Identification of the rotaviral gene that codes for hemagglutination and protease-enhanced plaque formation. *Virology* **125**, 194-201.
50. Greenberg, H.B., J. Flores, A.R. Kalica, R.G. Wyatt, & R. Jones. (1983): Gene coding assignments for growth restriction, neutralization and subgroup specificities of the W and DS-1 strains of human rotavirus. *J. Gen. Virol.* **64**, 313-320.
51. Greenberg, H.B., K. Midthun, R. Wyatt, J. Flores, Y. Hoshino, R.M. Chanock, & A.Z. Kapikian. (1984): Use of reassortant rotaviruses and monoclonal antibodies to make gene coding assignments and construct rotavirus vaccine candidates. In: *Modern approaches to vaccines: Molecular and chemical basis of virus virulence and immunogenicity*, Edited by R.M. Chanock and R. M. Lerner, pp 319-327. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N.Y.
52. Kalica, A.R., H.B. Greenberg, R.G. Wyatt, J. Flores, M.M. Sereno, A.Z. Kapikian, & R.M. Chanock. (1981): Genes of human (strain Wa) and bovine (strain UK) rotaviruses that code for neutralization and subgroup antigens. *Virology* **112**, 385-390.
53. Taniguchi, K., S. Urasawa, & T. Urasawa. (1985): Preparation and characterization of neutralizing monoclonal antibodies with different reactivity patterns to human rotaviruses. *J. Gen. Virol.* **66**, 1045-1053.
54. Sonza, S., A.M. Breschkin, & I.H. Holmes. (1983): Derivation of neutralizing monoclonal antibodies against rotavirus. *J. Virol.* **45**, 1143-1146.

55. Coulson, B.S., J.M. Tursi, W.J. McAdam, & R.F. Bishop. (1986): Derivation of neutralizing monoclonal antibodies to human rotaviruses and evidence that an immunodominant neutralization site is shared between serotypes 1 and 3. *Virology* **154**, 302-312.
56. Offit, P.A., & G. Blavat. (1986): Identification of the two rotavirus genes determining neutralization specificities. *J. Virol.* **57**, 376-378.
57. Hoshino, Y., M.M. Sereno, K. Midthun, J. Flores, A.Z. Kapikian, & R.M. Chanock. (1985): Independent segregation of two antigenic specificities (VP3 and VP7) involved in neutralization of rotavirus infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 8701-8704.
58. Matsuno, S., & S. Inouye. (1983): Purification of an outer capsid glycoprotein of neonatal calf diarrhea virus and preparation of its antisera. *Infect. Immun.* **39**, 155-158.
59. Sabara, M., J.E. Gilchrist, G.R. Hudson, & L.A. Babiuk. (1985): Preliminary characterization of an epitope involved in neutralization and cell attachment that is located in the major bovine rotavirus glycoprotein. *J. Virol* **53**, 58-66.
60. Arias C., S. López, J. Bell, & H. Strauss. (1984): Primary structure of the neutralization antigen of simian rotavirus SA11 as deduced from cDNA sequence. *J. Virol* **50**, 657-661.
61. Elleman, T.C., P.A. Hoyne, M.L. Dyal-Smith, I.H. Holmes, & A.A. Azad. (1983): Nucleotide sequence of the gene coding the serotype-specific glycoprotein of UK bovine rotavirus. *Nucleic Acids* **11**, 4689-4701.
62. Glass, R., J. Kleith, O. Nakagomi, T. Nakagomi, J. Askaa, A.Z. Kapikian, R.M. Chanock, & J. Flores. (1985): Nucleotide sequence of the structural glycoprotein VP7 gene of Nebraska calf diarrhea virus rotavirus: comparison with homologous genes from four strains of human and animal rotaviruses. *Virology* **141**, 292-298.
63. Morita, Y., K. Taniguchi, T. Urasaka, & S. Urasaka. (1988): Analysis of serotype-specific neutralization epitopes on VP7 of human rotavirus by the use of neutralizing monoclonal antibodies and antigenic variants. *J. Gen. Virol.* **69**, 451-458.

64. Offit, P.A., R.D. Shaw, & H.B. Greenberg. (1986): Passive protection against rotavirus-induced diarrhea by monoclonal antibodies to VP3 and VP7. *J. Virol* **58**, 700-703.
65. Dyal-Smith, M.L., I. Lazdins, J.W. Tregar, & I.H. Holmes. (1986): Localization of the major antigenic sites involved in rotavirus serotype-specific neutralization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 3465-3468.
66. Offit, P.A., H.F. Clark, G. Blavat, & H.B. Greenberg. (1986): Reassortant rotaviruses containing structural proteins VP3 and VP7 from different parents induce antibodies protective against each parental serotype. *J. Virol* **60**, 491-496.
67. Hoshino, Y., L.J. Saif, M.M. Sereno, R.M. Chanock, & A.Z. Kapikian. (1988): Infection immunity of piglets to either VP3 or VP7 outer capsid protein confers resistance to challenge with a virulent rotavirus bearing the corresponding antigen. *J. Virol* **62**, 744-748.
68. Svensson, L., H. Sheshberadaran, S. Vene, E. Norrby, M. Grandien, & G. Wadell. (1987): Serum antibody responses to individual viral polypeptides in human rotavirus infections. *J. Gen. Virol.* **68**, 643-651.
69. Shaw, R.D., K.J. Fong, G.A. Losonsky, M.M. Levine, Y. Maldonado, R. Yolken, J. Flores, A.Z. Kapikian, P.T. Vo, & H.B. Greenberg. (1987): Epitope-specific immune responses to rotavirus vaccination. *Gastroenterology* **93**, 941-950.
70. Offit, P., Blavat, G., H.G. Greenberg, & H.F. Clark. (1986): Molecular basis of rotavirus virulence: role of gene segment 4. *J. Virol* **57**, 46-49.
71. Flores, J., K. Midthun, Y. Hosino, K. Green, M. Gorziglia, A.Z. Kapikian, & R.M. Chanock. (1986): Conservation of the fourth gene among rotaviruses recovered from asymptomatic newborn infants and its possible role in attenuation. *J. Virol.* **60**, 972-979.
72. Gorziglia, M., Y. Hosino, A. Buckler-White, I. Blumentals, R. Glass, J. Flores, A.Z. Kapikian, & R.M. Chanock. (1986): Conservation of amino acid sequence of VP8 and cleavage region of 84-kDa outer capsid protein among rotaviruses recovered from asymptomatic neonatal infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 7039-7043.

73. Barnett, B.B., R.S. Spendlove, & M.L. Clark. (1979): Effect of enzymes on rotavirus infectivity. *J. Clin. Microbiol.* **10**, 111-119.
74. Estes, M.K., D.Y. Graham, & B.B. Mason. (1981): Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: Molecular mechanisms. *J. Virol* **39**, 879-888.
75. Kaljot, K., R.D. Shaw, D.H. Rubin, & H.B. Greenberg. (1988): Infectious rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis. *J. Virol* **62**, 1136-1144.
76. López, S., C.F. Arias, J. R. Bell, J.H. Strauss, & R.T. Espejo. (1985): Primary structure of the cleavage site associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. *Virology* **144**, 11-19.
- 76a. López, & S., C.F. Arias (1987): The nucleotide sequence of the 5' and 3' ends of rotavirus SA11 gene 4. *Nuc. Ac. Res.* **15**, 4691
77. López, S., C.F. Arias, E. Méndez, & R. Espejo. (1985): Conservation in rotaviruses of the protein region containing the two sites associated with trypsin enhancement of infectivity. *Virology* **154**, 224-227.
78. Borsa, J., B.D. Morash, M.D. Sargent, T.P. Copps, P.A. Llevaart, & J.G. Szekely. (1979): Two modes of entry of reovirus particles into L cells. *J. Gen. Virol.* **45**, 161-170.
79. White, J., M. Kielian, & A. Helenius. (1983): Membrane fusion proteins of enveloped animal viruses. *Q. Rev. Biophys.* **16**, 151-195.
80. Hsu, M., A. Scheid, & P.W. Choppin. (1981): Activation of the Sendai virus fusion protein (F) involves a conformational change with exposure of a new hydrophobic region. *J. Biol. Chem.* **256**, 3557-3563.
81. Richardson, C.R., A. Scheid, & P. W. Choppin. (1980): Specific inhibition of Paramyxovirus and Myxovirus replication by oligopeptides with amino acid sequences similar to those at the N-termini of the F1 or HA2 viral polypeptides. *Virology* **105**, 205-222.
82. Kaljot, K., datos no publicados.

83. López, S. (1986): Caracterización molecular de la proteína responsable del incremento de infectividad causado por tripsina en el rotavirus de simio SA11. Tesis doctoral en Investigación Biomédica Básica, UNAM.
84. Mackow, E., R. Shaw, S. Matsui, P. Vo, M. Dang, & H.B. Greenberg. (1988): Characterization of rhesus rotavirus VP3 gene: location of amino acids involved in homologous and heterologous rotavirus neutralization and identification of a putative fusion region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 465-469.
85. Vesikari, T., A.Z. Kapikian, A. Delem, & G. Zissis. (1986): A comparative trail of rhesus monkey (RRV-1) and bovine (RIT 4237) oral rotavirus vaccines in young children. *J. Infect. Dis.* 153, 832-839.
86. Vesikari, T., E. Isolauri, E. d'Hondt, F.E. André, G.M. Beards, G. Zissis. (1984): Protection of infants against rotavirus diarrhoea by RIT 4237 attenuated bovine rotavirus strain vaccine. *Lancet* 1, 977-981.
87. De Mol, P., G. Zissis, J.P. Butzler, A. Mutwewingabo, & F.E. André. (1986): Failure of live, attenuated rotavirus vaccine. *Lancet* 2, 108.
88. Glammacco, G., V. Degrand, L. Lupo, A. Mistretta, S. Pignato, D. Teuweed, H. Bogoerts, & F.E. Andre. (1988): Interference of oral poliovirus vaccine on RIT 4237 oral rotavirus vaccine. *Eur. J. of Epidemiol.* 4, 121-123.
89. Stuker, G., L.S. Oshiro, & N.J. Schmidt. (1980): Antigenic comparisons of two new rotaviruses from Rhesus monkeys. *Clin. Microbiol.* 11, 202-203.
90. Kapikian, A.Z., K. Midthun, Y. Hoshino, J. Flores, R.G. Wyatt, R.I. Glass, J. Askaa O. Nakagomi, T. Nakagomi, R.M. Chanock, M.M. Levine, M.L. Clements, R. Dollin, P.F. Wright, R.B. Belshe, E.L. Anderson, & L. Potash. (1985): Rhesus rotavirus, a candidate vaccine for prevention of human rotavirus disease. In *Vaccines 85*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. pp. 357-367.
91. Pérez-Schael, I., M. González, N. Daoud, M. Pérez, I. Soto, D. García, G. Daoud, A.Z. Kapikian, & J. Flores. (1986): Reactogenicity and antigenicity of the rhesus vaccine in venezuelan children. *J. Infect. Dis.* 155, 334-338.

92. Snodgrass, D.R., K.J. Fahey, P.W. Wells, I. Campbell, & A. Whiteland. (1980): Passive immunity in calf rotavirus infections: maternal vaccination increases and prolongs immunoglobulin G1 antibody secretion in milk. *Infect. Immun.* 2, 344-349.
93. Brussow, H., I. Walther, V. Fryder, J. Sidoti, & A. Bruttin. (1988): Cross neutralizing antibodies induced by single serotype vaccination of cows with rotavirus. *J. gen. Virol.* 69, 1647-1658.
94. Estes, M.K., S.E. Crawford, M.E. Penaranda, B.L. Petrie, J.W. Burns, W.K. Chan, B. Ericson, G.E. Smith, & M.D. Summers. (1987): Synthesis and immunogenicity of the rotavirus major capsid antigen using a baculovirus expression system. *J. Virol.* 61, 1488-1494.
95. Arias, C.F., M. Lizano, & L. López. (1987): Synthesis in *Escherichia coli* and immunological characterization of a polypeptide containing the cleavage sites associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. *J. Gen. Virol.* 68, 633-642.
96. Arias, C.F., T. Ballado, & M. Plebański. (1986): Synthesis of the outer-capsid glycoprotein of the simian rotavirus SA11 in *Escherichia coli*. *Gene* 47, 211-219.
97. McCrae, M.A., & J.G. McCorquodale. (1987): Expression of a major bovine rotavirus neutralisation antigen VP7c in *Escherichia coli*. *Gene* 55, 9-18.
98. Andrew, M.E., D.B. Boyle, B. Coupar, P.L. Whitefeld, G.W. Both, & R. Bellamy. (1987): Vaccinia virus recombinants expressing the SA11 rotavirus VP7 glycoprotein gene induce serotype-specific neutralizing antibodies. *J. Virol* 61, 1054-1060.
99. Francavilla, M., P. Mirand, A. Di Mathero, A. Sarasini, G. Gerna, & G. Milanesi. (1987): Expression of bovine rotavirus neutralization antigen in *Escherichia coli*. *J. gen. Virol.* 68, 2975-2980.
100. Ikegami, N., K. Akatani. (1984). Abstr. Int. Cong. Virol. W22-2, p209.
101. Taniguchi, K., Morita, Y., T. Urasawa, & S. Urasawa. (1987): Cross-reactive neutralization epitopes on VP3 of human rotavirus: analysis with monoclonal antibodies and antigenic variants. *J. Virol* 61, 1726-1730.
102. Remaut, E., P. Stanssens, W. Fiers. (1981): Plasmid vectors for high-efficiency controlled by the PL promoter of coliphage lambda. *Gene* 15, 81-92.

103. Maniatis, T., E.F. Fritsch, & J. Sambrook. (1982): In *Molecular Cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
104. Maxam, A.M., W. Gilbert. (1980): Sequencing end labeled DNA with base specific chemical cleavage. *Methods Enzymol.* **65**, 499-559.
105. Fiers, W., R. Contreras, F. Duerinck, G. Haegeman, D. Iserentant, J. Merregaert, W. Min Jou, F. Molemans, A. Raeymaekers, A. Van Der Berghe, G. Volckaert, & M. Ysebaert. (1976): Complete nucleotide sequence of bacteriophage MS2 RNA: primary and secondary structure of the replicase gene. *Nature* **260**, 500-507.
106. Sutcliffe, J.G. (1978): Complete nucleotide sequence of the Escherichia coli plasmid pBR322. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **43**, 77-90.
107. Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
108. Tsang, V.C., J.M. Peralta, & A.R. Simmons. (1983): Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis *Methods in Enzymology* **92**, 377-391.
109. Kleid D.G., D. Yansura, B. Small, D. Dowbenko, D. Moore, M.J. Grubman, P.D. Mckercher, D.O. Morgan, B.H. Robertson, & H.L. Bachrach. (1981): Cloned viral protein vaccine for foot-and-mouth disease: responses in cattle and swine. *Science* **214**, 1125-1129.
110. Shoemaker, J.M., A.H. Brasnett, & F.A. Martson. (1985): Examination of calf prochymosin accumulation in Escherichia coli: disulphide linkages are a structural component of prochymosin-containing inclusion bodies. *EMBO Journal* **4**, 775-780.
111. Schoner, R.G., L.F. Ellis, & B.E. Schoner. (1985): Isolation and purification of protein granules from Escherichia coli cells over-producing bovine growth hormone. *Bio/Technology* **3**, 151-154.
112. Lee, S.G., W. Eckblad, & L.A. Bulla. (1985): Diversity of protein inclusion bodies and identification of mosquitocidal protein in Bacillus thuringiensis subsp. israelensis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **126**, 953-960.
113. Karnovsky, M.J. (1965): A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **27**, 137A.

114. Reynolds, E.S. (1963): The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **17**, 208-215.
115. Laskey, R.A. & A.D. Mills. (1975): Quantitative film detection of 3H and 14C in polyacrylamide gels by fluorography. *Eur. J. Biochem.* **56**, 335-341.
116. Shaw, R.D., D.L. Stoner, M.K. Estes, & H.B. Greenberg. (1984): Specific enzyme-linked immunoassay for rotavirus serotypes 1 and 3. *J. Clin. Microbiol.* **22**, 286-291.
117. Kazmler, L.J. (1978): Estadística aplicada a la administración y a la economía. Editorial McGraw-Hill.
118. Schlesinger, M.J., M. Ashburner, & A. Tissiers. (1982): In: *Heat Shock: From Bacteria to Man*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
119. Masri, S., L. Nagata, D. Mah, & P. Lee. (1986): Functional expression in *Escherichia coli* of cloned reovirus S1 gene encoding the viral cell attachment protein  $\sigma 1$ . *Virology* **149**, 83-89.
120. Emini, E., A. B.A. James, & E. Wimmer. (1983): Priming for and induction of anti-poliovirus neutralizing antibodies by synthetic peptides. *Nature* **304**, 699-701.
121. Francis, M.J., C.M. Fry, D.J. Rowlands, F. Brown, J.L. Bittle, R.A. Houghten, & R.A. Lerner. (1985): Immunological priming with synthetic peptides of foot-and-mouth disease virus. *J. Gen. Virol.* **66**, 2347-2354.
122. Kennedy, R.C., & G.R. Dreesman. (1984): Enhancement of the immune response to hepatitis B surface antigen. *J. Exp. Med.* **159**, 655-665.
123. Milich, D., A. McLachlan, G. Thornton, & J. Huges. (1987): Antibody production to the nucleocapsid and envelope of hepatitis B virus primed by a single synthetic T cell site. *Nature* **329**, 547-549.
124. Pross, H.F., & D. Eidinger. Antigenic competition: a review of nonspecific antigen-induced suppression. *Adv. Immunol.* **18**, 133-161
125. Stanberry, L.R., D.I. Bernstein, R.L. Burke, C. Pacht, & M.G. Myers. (1987): Vaccination with recombinant herpes simplex virus glycoproteins: protection against initial and recurrent genital herpes. *J. Infect. Dis.* **155**, 914-920.

126. Bishop, R.F., L. Barnes, E. Cipriani, & J.S. Lund. (1983): Clinical immunity after neonatal rotavirus infection. A prospective longitudinal study in young children. *N. Engl. J. Med.* 309, 72-76.
127. García-Pérez, G. (1988) Tesis de maestría de Investigación Biomédica Básica, UNAM.
128. Ballou, R.W., J.A. Sherwood, F.A. Franklin, D.M. Gordon, R.A. Wirtz, G.F. Wasserman, C.L. Diggs, S.L. Hoffman, M.R. Hollingdale, W.T. Hocckermeyer, I. Schneider, J.F. Young, P. Reeve, & J.D. Chulay. (1987): Safety and efficacy of a recombinant DNA plasmodium falciparum sporozoite vaccine. *Lancet* 1277-1281.
129. Hoiseth, S.K., & A.D. Stocker. (1981): Aromatic-dependent Salmonella Typhimurium are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* 291, 238-239.
130. Killen, H.M., & N.J. Dimmock. (1982): Identification of a neutralization-specific antigen of a calf rotavirus. *J. gen. Virol.* 62, 297-311.
131. Bridger, J.C., & G. Oldham. (1987): Avirulent rotavirus infections protect calves from disease with and without inducing high levels of neutralizing antibody. *J. gen. Virol.* 68, 2311-2317.
132. Kitaoka, S., N. Fukuhara, F. Tazawa, H. Suzuki, T. Sato, T. Konno, T. Ebina, & N. Ishida. (1986): Characterization of monoclonal antibodies against human rotavirus hemagglutinin. *J. Med. Virol.* 19, 313-324
133. Plebañsky, M. (1988): Caracterización de la glicoproteína de capa externa del rotavirus de simio SA11 expresada en E. coli. Tesis de licenciatura en Investigación Biomédica Básica, UNAM.
134. Golub, E. (1987): Antigenicity and Immunogenicity. En: *Immunology: A Synthesis*. Editado por Sinauer Associates, Inc. Publishers.
135. A Masaaki, M., J. Nishio, & B. Cheresebro. (1988): Antigen-presenting cells control T-cell responsiveness to friend murine leukemia virus antigen. In: *Vaccines 88*, edited by H. Ginsberg, F. Brown, R.A. Lerner & R.M. Chanock. Cold Spring Harbor Laboratory 1988. pp. 241-246.