



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**

00562



**EVALUACION DE REPLICONES DE RNA COMO POTENCIALES
VACUNAS CONTRA ROTAVIRUS**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS
PRESENTA**

BIOL. DELIA VANESSA LOPEZ GUERRERO

**TUTORES:
DR. CARLOS F. ARIAS ORTIZ
Instituto de Biotecnología - UNAM
DR. FERNANDO ESQUIVEL GUADARRAMA
Facultad de Medicina - UAEM**

CUERNAVACA, MOR. 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Dela Ivessa López Gto.
FECHA: 01/06/04
FIRMA: 

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Carlos F. Arias Ortiz. Durante la realización de este proyecto se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y tecnología con el no. de registro 165990.

AGRADECIMIENTOS.

Quiero agradecer a mi familia principalmente a mi MAMA por su incondicional apoyo. Te quiero mucho.

Al Dr. Carlos Arias por su confianza en mi y en este proyecto.

Al Dr. Fernando Esquivel por todas sus enseñanzas y el entusiasmo puesto en este proyecto....Gracias Jefe.

Al Dr. Ernesto Méndez por su buena disposición y forma de ver la ciencia, y sobre todo por su amistad.... Muchas Gracias

A Rafita y Don Peter, los grandes maestros del laboratorio, que haríamos sin ustedes???

A Jose Manuel Baizabal y a Yuri por su ayuda y su amistad.

A mis compañeros del grupo Arias-López por su compañerismo sin igual.

Al grupo del Dr. Esquivel, muy buenos amigos.... Gracias

A la Dra. Laura Palomares por sus sugerencias y su buena disposición.

A los Dres. Alejandro Alagón, Celso Ramos García, José Luis Montiel por sus valiosas sugerencias a este trabajo

A los vecinos de abajo: Adrián, Jimmy, Chiquigol (Lucio), Rubén, Edgar, Toño Serrato, Luis.

A mis compañeros de generación por los buenos momentos.

A los grandes amigos: Heber, Adrián, Alina, Jimmy, Gina, Mary, Margara, Margarito, Alex, Edgar, Oly, Ale, Karolita, Javier, Gabriel, Luis del Pozo....y todos los que me faltan.

A Keilor por su paciencia y apoyo, por creer en mí..... y por todo el amorGracias

INDICE

RESUMEN	3
I. INTRODUCCION	5
1.1 Generalidades.	5
1.2 Estructura y clasificación de los rotavirus.	5
1.3 Generalidades de la respuesta inmune.	7
1.4 Inmunología de la infección por rotavirus y modelos animales de estudio.	9
II. ANTECEDENTES	11
2.1 Vacunas contra rotavirus	11
2.2 Vacunas de RNA (replicones).	17
2.3 Inmunidad de los replicones.	20
III HIPOTESIS.	24
IV. OBJETIVOS.....	25
4.1 OBJETIVO GENERAL	25
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES	25
V. MATERIALES Y METODOS.....	26
5.1 Diseño experimental.	26
5.2 Construcciones.	27
5.3 Transcripción <i>in vitro</i>	29
5.4 Expresión de los vectores en células en cultivo.	29
5.5 Inmunofluorescencia	31
5.6 Western blot.....	32
5.7 Determinación de la expresión de las proteínas de rotavirus VP6 y VP2 <i>in vivo</i>	33
5.8 Ratones e Inmunizaciones.	35
5.9 Reto con el rotavirus EDIM.	35
5.10 Determinación del grado de protección contra rotavirus en ratones inoculados con los replicones.	36
5.11 Detección de anticuerpos IgA's específicos contra rotavirus en heces.	37
5.12 Ensayo de ELISA de captura para determinar anticuerpos séricos contra rotavirus.	37
VI. RESULTADOS	39

6.1 Construcción de los replicones.	39
6.2 Expresión de las proteínas VP2 y VP6 de rotavirus codificadas en los replicones de RNA pSINrep21-VP2, pSINrep21-VP6 y pSINrep19-VP6 en cultivo de células de mamífero.....	42
6.3 Expresión de la proteína VP6 en tejidos de ratones inoculados intramuscularmente e intrarrectalmente con el replicón pSINrep21-VP6.	45
6.4 Ensayos de protección en ratones inoculados intramuscularmente con los replicones de RNA.	48
6.5 Ensayos de protección en ratones inoculados intrarrectalmente con los replicones de RNA pSINrep21-VP2 y pSINrep21-VP6.....	52
6.6 Ensayos de protección en ratones inoculados intrarrectalmente con los replicones de RNA retados con un rotavirus heterólogo.	56
VII. DISCUSION.	57
VIII. CONCLUSIONES.....	67
IX. PERSPECTIVAS.....	68
X. BIBLIOGRAFIA	69

RESUMEN

Rotavirus es el principal agente viral causante de gastroenteritis infantiles. Se ha estimado que es el responsable de aproximadamente 600,000 muertes al año en niños menores de 5 años en países en desarrollo (UNICEF, 2002). En el presente trabajo se evaluó el potencial de los replicones de DNA pSINrep21-VP2 y pSINrep21-VP6 que codifican para las proteínas estructurales VP2 y VP6 de rotavirus, como inductores de respuesta inmune protectora contra la infección en un modelo murino. Ambas proteínas poseen características bioquímicas e inmunogénicas que las convierten en buenas candidatas para el desarrollo de una vacuna capaz de proteger de manera heterotípica contra la infección por rotavirus. Por otra parte, se sabe que los replicones basados en alfavirus, son potentes inductores de la respuesta inmune, principalmente por inducción de apoptosis, lo que conlleva a la activación de células CD8⁺ en varios modelos contra tumores y para algunos patógenos, en donde se han obtenido altos niveles de protección, además de que son capaces de generar memoria local según la ruta de inmunización. Seguido a la construcción de los replicones de RNA se corroboró la expresión de las proteínas VP2 y VP6 en cultivos celulares BHK-21 mediante inmunofluorescencia y Western blot de células transfectadas. Se corroboró la funcionalidad de los replicones *in vivo*, se realizaron cortes histológicos de músculo y recto de ratones inoculados intramuscular (i.m.) e intrarrectal (i.r.) con el plásmido pSINrep21-VP6 y mediante inmunofluorescencia utilizando anticuerpos policlonales contra rotavirus, se detectó la expresión de la proteína VP6. Para los ensayos de protección en el modelo murino, se utilizaron dos vías de inmunización, una parenteral (i.m.) y una mucosa (i.r.) para ambos plásmidos, pSINrep21-VP2 y pSINrep21-VP6. Para la vía i.m se inocularon 25 µg de plásmido en tres dosis a intervalos de 3 semanas cada una, recibiendo el reto 2 semanas posteriores a la última inoculación, sin embargo no se observó ningún efecto sobre la replicación viral con respecto a los ratones control. Por la vía intrarrectal, se inocularon 20 µg de plásmido, siguiendo el mismo protocolo anterior, en donde únicamente con el replicón pSINrep21-VP6 se obtuvo una disminución significativa en la carga viral al día 2 de la infección. Solo en el caso de los ratones inoculados i.m. con el pSINrep21-VP2 fue posible detectar anticuerpos séricos específicos, en ninguno de los casos se observó un aumento de IgA's en heces antes del reto, ni una potenciación en la producción durante la

enfermedad. Con el trabajo anterior, podemos concluir, que los replicones de DNA basados en alfavirus bajo los protocolos utilizados, son pobres inductores de una respuesta inmune protectora contra la infección por rotavirus. En la resolución de la infección naturalmente, participan elementos de la respuesta inmune adquirida y de la respuesta inmune innata de una manera complementaria, es por ello, que el estudio más profundo de los elementos protectores y su activación durante el desarrollo de una infección natural, es necesario para comprender dichos mecanismos, y así, poder desarrollar una vacuna capaz de proteger o al menos disminuir la severidad de la infección mediante la activación de dichos elementos protectores.

I. INTRODUCCION

1.1 Generalidades.

Las gastroenteritis infantiles son de las principales causas de morbilidad y mortalidad en niños menores de 5 años, tanto en países desarrollados como en países en desarrollo, siendo rotavirus el causante de aproximadamente el 40% de los cuadros diarreicos severos, los cuales de no recibir atención médica oportuna pueden tener consecuencias fatales. Se ha estimado que rotavirus es causante de aproximadamente 600,000 muertes al año en niños menores de 5 años en países en desarrollo (UNICEF, Abril 2002).

Además de la mortalidad que se presenta cada año debido a la infección por rotavirus en países subdesarrollados, los gastos médicos directos e indirectos asociados a esta enfermedad son enormes. Se ha estimado que tan solo en los Estados Unidos se gasta alrededor de un billón de dólares al año por esta causa (Kreusch, 1997). Cabe mencionar que rotavirus infecta también a animales neonatos de otras especies de mamíferos y aves (Greenberg, 1995), lo que también conlleva a pérdidas económicas en el área veterinaria.

Los rotavirus infectan los enterocitos maduros de las puntas de las microvellosidades del intestino delgado, provocando diarrea acompañada por vómito y fiebre, por lo que el riesgo de una deshidratación severa es muy alto. De tal forma, que el desarrollo de una vacuna capaz proteger o al menos disminuir la severidad de la infección es una prioridad en materia de Salud Pública (Kapikian, 1998).

1.2 Estructura y clasificación de los rotavirus.

Los rotavirus humanos fueron descritos por primera vez por Bishop y cols. en 1972. Las partículas virales fueron observadas por microscopía electrónica en biopsias intestinales provenientes de niños con gastroenteritis severa, y debido a su forma de rueda de carreta, estas partículas fueron denominadas como rotavirus (Bishop *et al* .,1973).

Los rotavirus pertenecen a la familia *Reoviridae*, son virus sin envoltura lipídica, con geometría icosaédrica, y miden aproximadamente 75 nm de diámetro. El genoma viral consiste de 11 segmentos de RNA de doble cadena que codifican para 6 proteínas no estructurales (NSP) y para 6 proteínas estructurales (VP). Las partículas virales se encuentran formadas por tres capas concéntricas de proteínas envolviendo al genoma viral. La capa más externa del virus esta constituida por 260 trímeros de la proteína VP7 (37 kDa) de la cual se proyectan 60 espículas formadas por dímeros de la proteína VP4 (86 kDa). Ambas proteínas han sido relacionadas con los eventos tempranos de la infección, específicamente con la entrada del virus a la célula. Además, son blancos de anticuerpos neutralizantes, propiedad que ha permitido clasificar a los rotavirus en diferentes serotipos. La capa intermedia del virus esta formada por 260 trímeros de la proteína VP6 (45 kDa), la cual es la más abundante del virus y constituye aproximadamente el 40% del total de la proteína viral. Con base a esta proteína, los rotavirus se han clasificado en 7 grupos que se denominan de la A-G, siendo los grupos A, B y C los de mayor prevalencia en humanos, el resto se han encontrado únicamente infectando especies animales.

Epidemiológicamente, los rotavirus del grupo A son los más importantes y con base en la reactividad de anticuerpos contra las proteínas VP7 y VP4, se clasifican en serotipos. A la fecha los rotavirus se han descrito 13 serotipos de la proteína VP4 (serotipo P) y 14 serotipos de la proteína VP7 (serotipo G). De igual forma, dependiendo de la presencia o ausencia de dos epítopes en VP6, se clasifican en dos subgrupos antigénicos I y II.

La capa más interna de la partícula, se encuentra constituida principalmente por 60 dímeros de la proteína VP2 (102 kDa), esta proteína interactúa con las proteínas VP1 (125 kDa) y VP3 (88 kDa) formando el 'core' del virión envolviendo al genoma viral. (Fig. 1). Las 6 proteínas no estructurales (NSP), se expresan solamente en la célula infectada y se encuentran implicadas tanto en la replicación como en la morfogénesis del virus (Arias y López, 2000).

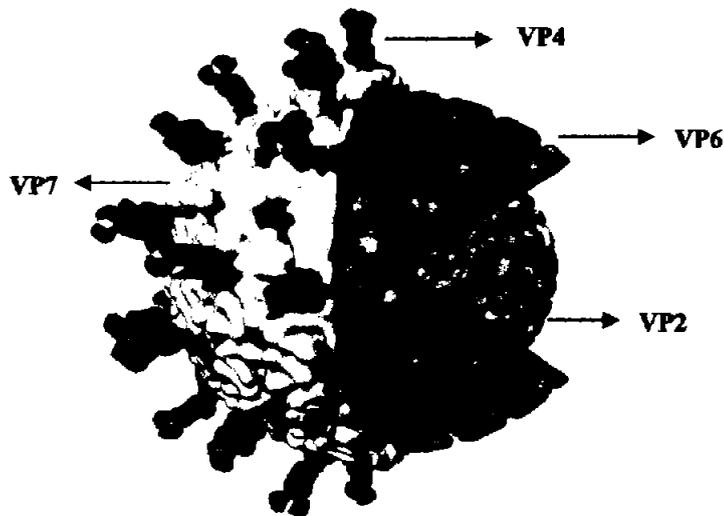


Fig. 1. Criomicroscopía electrónica de rotavirus. Partícula viral completa (Patton, 2000)

1.3 Generalidades de la respuesta inmune.

El sistema inmune de los animales vertebrados posee dos mecanismos de defensa, a) la respuesta tipo innata y b) la respuesta adquirida. Ambos mecanismos funcionan para proteger contra los patógenos y sustancias extrañas que pudieran poner en riesgo la integridad del individuo. Entre ambos mecanismos existen diferencias notables, sin embargo son interdependientes. El sistema inmune innato consiste de barreras físicas y químicas, y células de la respuesta poco específica (macrofágos, células NK, basófilos, eosinófilos y neutrófilos). Este tipo de respuesta se genera de una manera relativamente rápida y se encuentra siempre preparada en cuanto el microorganismo o macromolécula entra en contacto con el organismo. En la actualidad se han descrito receptores de membrana presentes en las células del sistema inmune innato que promueven la activación de células de la respuesta adquirida. Estos receptores son denominados como “receptores tipo toll” (TLR), los cuales reconocen un grupo limitado pero altamente conservado de patrones moleculares de patógenos o bien productos derivados de los mismos. La iniciación de una respuesta antimicrobiana depende de la habilidad de los TLRs de detectar estas moléculas. Los TLRs juegan un papel muy importante entre la respuesta inmune innata y

adquirida a través de moléculas de superficie y mediadores solubles tales como quimiocinas y citocinas. Existen 10 de estos receptores identificados en mamíferos, entre los más estudiados se encuentran el TLR2, que reconoce peptidoglicanos generalmente producidos por bacterias gram positivas, el TLR3, que reconoce RNA de doble cadena, el cual se produce en infecciones virales, el TLR4, con afinidad principalmente por lipopolisacáridos de bacterias gram negativas y el TLR9, que reconoce secuencias CpG no metiladas generadas por bacterias (Pasare C, Medzhitov R, 2004).

La respuesta adquirida, requiere de un contacto previo con el patógeno o macromolécula en cuestión, y es la encargada de generar la memoria inmunológica, la cual protege de manera específica contra posteriores contactos con los elementos que indujeron la respuesta inmune. Las células efectoras de este tipo de respuesta son los linfocitos B y T. Los linfocitos B en la producen anticuerpos específicos contra un patógeno o macromolécula, esta función la llevan a cabo mediante el reconocimiento directo del antígeno mediante un receptor de membrana (BCR). Una vez que el antígeno es reconocido, se lleva a cabo la activación de las células B vírgenes, lo que conlleva a la diferenciación de estas células a células plasmáticas, productoras de inmunoglobulinas solubles que pueden ser secretadas al torrente sanguíneo o bien a mucosas. La función principal de estos anticuerpos es el neutralizar microorganismos patógenos y toxinas que invaden el organismo. Los linfocitos T se dividen en dos subgrupos, los linfocitos T cooperadores (Th) y los linfocitos T citotóxicos (Tc). Las células Th reconocen antígenos en forma de péptidos de 13 a 25 aa, derivados de la degradación de proteínas exógenas en el sistema endocítico de las células presentadoras de antígeno (CPA's). Estos péptidos son expuestos en asociación con las moléculas del MHC II en la membrana celular. La activación de las células Th es esencial para la proliferación y diferenciación de las células B y Tc a través de la secreción de citocinas. Las células Tc reconocen péptidos de 8 a 9 aminoácidos asociados a las moléculas del MHC I, producto de la degradación de proteínas antigénicas en el citosol celular. La principal función de estas células es el reconocimiento y eliminación de células tumorales o infectadas con patógenos intracelulares, a través de citotoxicidad directa, que puede ser mediada por perforinas o por la inducción de apoptosis a través de la molécula Fas en la membrana celular. Asimismo, las células Tc secretan citocinas antivirales y

promotoras de la presentación de antígeno, como interferón gama (INF- γ) y el factor de necrosis tumoral (TNF).

1.4 Inmunología de la infección por rotavirus y modelos animales de estudio.

Rotavirus infecta varias especies de mamíferos, tales como, ratones, conejos, cerdos y bovinos, los cuales se han propuesto como modelos predictivos del desarrollo de la inmunidad que se presenta durante la infección con rotavirus en el humano (Feng, 1997). Sin embargo el modelo del ratón presenta muchas ventajas sobre los demás. El ratón tanto neonato como adulto es susceptible a la infección por rotavirus homólogos y heterólogos, pero solo en los ratones lactantes de menos de 14 días de edad se desarrolla la sintomatología clínica de la enfermedad (diarrea). En ratones adultos la infección es asintomática, por lo que el parámetro principal para estudios de protección es la cantidad de antígeno viral excretado en las heces (Burns *et al.*, 1995).

Los mecanismos inmunológicos que intervienen en la resolución de la infección por rotavirus no son del todo claros, sin embargo, en una infección por rotavirus se induce una potente respuesta de anticuerpos séricos e intestinales tanto en humanos como en los diferentes modelos animales (Offit P., 1994), al parecer la producción de anticuerpos juega un papel muy importante en la protección, ya que la presencia de anticuerpos IgA's en mucosas, se correlacionan con la protección contra la infección, muy probablemente por un efecto neutralizante, además estos anticuerpos protegen contra reinfecciones, ya sea de manera homotípica o heterotípica. Se ha sugerido que IgA's específicas contra VP6, anticuerpos no neutralizantes, podrían estar bloqueando la infección dentro de la célula epitelial durante el proceso de transcitosis para ser vertidos al lumen intestinal (Burns *et al.*, 1996). Esto fue apoyado en ensayos utilizando ratones (cadena J γ) que poseen un defecto en el receptor polimérico de Ig (pIgR) el cual es el responsable de la transcitosis de los anticuerpos IgA e IgM hacia el lumen de la mucosa. Estos ratones inmunizados intranasalmente con pseudopartículas virales carentes de genoma compuestas por las proteínas VP2 y VP6 de rotavirus producidas *in vitro*, denominadas como VLP's 2/6, no presentan un nivel de protección al desafío con rotavirus EDIM en comparación con los

ratones control (Schwartz-Cornil I, 2002, Feng, 2002). Con lo que respecta al papel que juegan las células Th en el modelo del ratón, se ha encontrado que VP6 es un antígeno blanco importante en ratones BALB/c inmunizados con rotavirus (Baños et al., 1997; Bruce et al., 1994). En nuestro laboratorio se determinaron las regiones de VP6 de los aminoácidos 1-192 y 176-397, los cuales contienen al menos dos epítopes de células Th y que la secuencia 289-302 aa representa uno de ellos (Baños et al., 1997). Esta secuencia se encuentra altamente conservada en las diferentes cepas de rotavirus, lo que genera un reconocimiento heterotípico por parte de las células Th. A nivel funcional se sabe que las células Th son importantes en la inducción de células B secretoras de IgA contra rotavirus (Franco y Greenberg, 1999) y que células Th de memoria específicas para VP6 pueden potenciar la producción de anticuerpos neutralizantes por parte de las células B con especificidad para las proteínas de la capa externa de rotavirus (Esquivel, *et al.*, 2000).

En ratones con infección persistente de rotavirus, deficientes de células B y T (SCID), la transferencia de células Tc anti-rotavirus, ayuda a eliminar la infección. sin embargo cuando las células Tc son contransferidas con células Th específicas de rotavirus, la resolución de la enfermedad es de una manera más eficiente (McNeal *et al.*, 1995). Así mismo, se demostró que las células Th específicas contra rotavirus pueden ejercer una función protectora directa cuando son transferidos en ratones SCID con infección crónica.

Dado lo anterior, podemos concluir que la infección por rotavirus induce una respuesta inmune muy compleja y multifactorial, en donde participan principalmente tres mecanismos de protección, la producción de anticuerpos, la actividad por parte de las células Th y Tc y elementos de la respuesta inmune innata. Todos estos mecanismos al parecer son compensatorios uno del otro, sin embargo, la participación de los tres es necesaria en una infección natural para la resolución rápida y eficaz de la enfermedad y para proteger contra futuras reinfecciones.

II. ANTECEDENTES

2.1 Vacunas contra rotavirus

Debido gran problema de salud generado por la infección con rotavirus a nivel mundial, el desarrollo de nuevas estrategias de vacunación efectivas contra este patógeno ha sido prioritario en las últimas décadas. A la fecha se han determinado 4 serotipos G de importancia epidemiológica para el humano y dos serotipos P más frecuentes, la asociación entre ellos se muestra en la siguiente tabla (Tab. 1). Debido a las diferentes combinaciones que pueden darse en una partícula viral, una de las principales características que debe tener una vacuna contra rotavirus, entre otras, es que sea capaz de generar una respuesta protectora de manera heterotípica, es decir hacia diferentes serotipos tanto G como P.

Serotipo P (VP4)	Serotipo G (VP7)
P1A	G1
	G3
	G4
P1B	G2

Tabla 1. Serotipos de importancia epidemiológica para el humano y sus asociaciones.

El desarrollo de vacunas contra rotavirus comenzó a finales de los 70's. Los primeros ensayos se realizaron, apenas 10 años después del descubrimiento del virus. Desde entonces, se han propuesto diferentes estrategias para el diseño de una vacuna capaz de proteger o al menos disminuir la severidad de la infección.

La mayoría de los candidatos a vacuna, se han basado en el uso de virus atenuados, incluyendo rotavirus aislados de animales y de humanos, la generación de rearrreglantes provenientes de cepas humanas y animales. Recientemente las nuevas estrategias incluyen el uso de vacunas de DNA, virus inactivados administrados parenteralmente, proteínas de fusión y VLP's (virus-like particles).

La primera generación de vacunas contra este patógeno se basó en técnicas Jennerianas, en donde un rotavirus de origen animal era administrado oralmente a humanos esperando que

se llevara a cabo una infección naturalmente atenuada, induciendo una respuesta inmune que posteriormente confiriera protección heterotípica contra la infección natural. Estas vacunas fueron obtenidas a partir de cepas de virus de bovino, ovino y simio. Este enfoque partió de estudios que mostraron la capacidad de la cepa bovina NCDV de inducir protección cruzada contra rotavirus humanos en terneros recién nacidos. La primera prueba en campo se realizó con la cepa NCDV RIT-4237, y posteriormente se utilizaron cepas de mono (RRV) y otras cepas bovinas (WC3-G6P5). La cepa NCVD, fue desarrollada como vacuna por Smith&Kline Bechmam, la cual pertenece al serotipo G6 no identificado en cepas de virus humanos. Fue la primera vacuna administrada en humanos, oralmente, resultando ser inmunogénica, inocua y altamente eficaz en países desarrollados, pero pruebas en otros países como Gambia, Perú, Rwanda y en la población indígena de los Estados Unidos, mostraron poca o ninguna eficacia. De igual manera sucedió con la vacuna basada en la cepa WC3 de origen bovino, la cual presentó muy alta eficiencia en países desarrollados, pero no así en países en desarrollo (Clark, HF, 1996). Todos estos candidatos a vacunas fueron abandonados por presentar eficiencias de protección muy variables.

La primera vacuna recombinante utilizada para uso humano distribuida en los Estados Unidos fue en 1998 producida por la compañía Wyeth-Ayert denominada como RRV-TV o RotaShield. Esta vacuna estaba formada por una cepa de virus de simio RRV (MMU 18006) serotipo G3 y por tres virus rearreglantes. Estos rearreglantes poseían el gen de la proteína VP7 de tres diferentes serotipos humanos G1, G2 o G4 y los diez genes restantes pertenecían a RRV. Esta vacuna tetravalente protegió contra los cuatro serotipos humanos de mayor importancia epidemiológica. A dosis de 4×10^5 ufp, protegía cerca de un 50 % contra diarreas causadas por rotavirus, y cerca del 100% contra diarreas severas causadas por este virus (Kapikian, 2000). A pesar de presentar resultados favorables, fue retirada del mercado en 1999 por encontrarse asociada directamente con algunos casos de intususcepción en niños vacunados, los cuales presentaban este padecimiento poco tiempo después de la primera inmunización (Greenberg, 2001). La intususcepción consiste en una invaginación del intestino sobre sí mismo, causando una obstrucción parcial o total de dicho órgano.

En la actualidad se encuentran en fase III de evaluación, dos vacunas basadas en la misma estrategia de rearrreglantes de RotaShield. Una de ellas Rotateq, de la compañía Merck, la cual es una vacuna pentavalente basada en virus recombinantes derivados de la cepa de bovino WC3 que contienen los genes de las proteínas VP4 y VP7 de rotavirus humanos, pertenecientes a los serotipos G1 a G4 y al serotipo P1A. La segunda, Rotarix, producida por la compañía Glaxo SmithKline, es una vacuna monovalente que se basa en una cepa atenuada de origen humano 89-12 (Ward, 2003). Hasta el momento, ambas vacunas han demostrado ser seguras y eficaces, aunque siguen en evaluación para determinar el riesgo de intususcepción asociado a ellas.

Además del desarrollo de vacunas atenuadas, también se continúa en la búsqueda de vacunas que potencialmente pudieran ser más seguras y eficaces, a través de la utilización de tecnologías moleculares, que permitan administrar sólo los componentes virales de mayor relevancia en la inducción de respuesta inmune protectora heterotípicas.

Dentro de las estrategias de vacunación generadas a partir de tecnología basada en DNA recombinante, se encuentra la síntesis de VLP's (virus-like particles), también denominadas pseudopartículas virales. Estas se producen generalmente en el sistema de baculovirus recombinantes que expresan las proteínas estructurales VP2, VP4, VP6 y VP7 de rotavirus. Las partículas se ensamblan en células de insecto en cultivo, formando estructuras similares a un virus, pero sin genoma. Estas partículas son incapaces de llevar a cabo una infección y por lo tanto de replicarse, sin embargo, tienen la capacidad de generar respuesta inmune contra las proteínas que las componen. Se ha ensayado de manera experimental, la eficiencia de tres tipos diferentes de VLP's (2/6, 2/6/7 y 2/6/4/7), usando modelos animales como el ratón, conejos y bovinos, teniendo resultados muy variables dependiendo de la vía de inmunización y del adyuvante utilizado (Jiang, 1999).

El uso de VLP's ha sido principalmente estudiado en el modelo del ratón, el cual ha permitido determinar que estas pseudopartículas son capaces de conferir protección bajo diferentes protocolos. Un ejemplo de lo anterior fue que la administración de pseudopartículas 2/6 y 2/6/7 intranasalmente con el adyuvante LT (endotoxina termolábil

de *E. coli*) y toxina de cólera (CT) donde se logró una protección total contra la infección por rotavirus murinos. Mediante este protocolo se indujeron altos niveles de anticuerpos IgA's e IgG's intestinales, así como IgG's séricas (O'Neal C., 1998). También se demostró que la vía intranasal, es mucho más eficiente que la vía oral para inducir respuestas en mucosas, ya que por la vía oral se requirió de una gran cantidad de antígeno debido a la alta degradación por el tracto digestivo, en cambio, por la vía intranasal se requirió 10 veces menos de antígeno, así como la mitad de adyuvante, logrando el mismo efecto, reduciendo el costo de la posible vacuna (O'Neal C, 1997).

Aunque los resultados obtenidos en modelos animales son alentadores, el costo de esta tecnología sigue siendo alto, además de que las condiciones de almacenaje y transporte requieren condiciones óptimas de temperatura, lo que limitaría su distribución al sector de la población infantil más necesitado.

En la actualidad, la manipulación del material genético con fines de expresión de proteínas heterólogas, así como el uso de promotores eucariontes de origen viral constitutivos, han permitido el desarrollo de las vacunas de DNA. Estas vacunas consisten en la expresión de las proteínas antigénicas de interés *in situ* (Ulmer, *et al.*, 1993), es decir, que las proteínas codificadas se expresarán directamente en la célula transfectada del animal vacunado, dependiendo de la vía de inoculación. El DNA desnudo puede ser inoculado directamente, por vía parenteral o mucosa, con o sin adyuvantes. Sin embargo la técnica más eficiente hasta ahora reportada, es la técnica de "gene gun", basada en biobalística, en donde el DNA es adherido a micropartículas de oro, y utilizando una pistola, las partículas son disparadas dentro de los tejidos por la vía intraepitelial donde existe una gran cantidad de CPA's. La eficiencia de esta técnica radica en que el DNA es introducido directamente al citoplasma de la células, incluyendo las células dendríticas debido a la gran velocidad con la que las partículas acarreadoras del DNA son expelidas (Tüting *et al.*, 1999).

Mediante la vacunación con DNA es posible generar respuesta inmune específicas comparables a las inducidas por las vacunas atenuadas. Esta tecnología ha sido evaluada en modelos de infección viral como influenza (Ulmer *et al.*, 1993), virus de la

linfocoriomeningitis (Zarozinski *et al.*, 1995) y rabia (Xiang *et al.*, 1994), obteniéndose respuesta inmune protectora tanto humoral como celular. Actualmente existen varias vacunas de DNA que están en fase I de evaluación clínica en humano (Liljeqvist *et al.*, 1999). Una de ellas es una vacuna que codifica para los antígenos de superficie de hepatitis B (HbsAg). Esta vacuna consiste de un plásmido que posee un promotor de citomegalovirus humano el cual se inocula intraepitelialmente mediante la técnica de biobalística. Esta vacuna generó anticuerpos de manera específica (Tacket, C, 1999), y aunque se ha seguido evaluando su eficiencia induciendo respuestas humorales y celulares en individuos voluntarios, será importante la fase clínica II de evaluación que compare esta tecnología con las vacunas convencionales (Rottinghaus ST, 2003).

El mecanismo por el cual el DNA desnudo ingresa a las células *in vivo* aún no se ha definido, pero independientemente de esto, el plásmido llega al núcleo de la célula y permanece de manera episomal por períodos largos de tiempo por lo que no se puede descartar la posibilidad de que el plásmido se integre al genoma de la célula (Dumotiel, 2000). Dependiendo de la ruta de administración, el plásmido dirige la expresión de las proteínas antigénicas en las células del tejido donde fue inoculado, esto es en células epiteliales, miocitos, etc.

Se sabe que los plásmidos pueden ser adquiridos directamente por las CPA's principalmente las dendríticas, y una vez adentro, el plásmido expresa el antígeno, que por consecuencia será presentado en ambos contextos del MHC. En general, todas las células de los tejidos animales expresan moléculas de MHC I, y bajo algunas condiciones llegan a expresar MHC II, sin embargo no expresan moléculas coestimuladoras capaces de activar a las células T, por lo que muchas veces no existe una respuesta inmune detectable. Debido a lo anterior se ha propuesto, que el antígeno expresado sale al exterior de la célula, y posteriormente es asimilado mediante endocitosis por las células dendríticas periféricas al tejido transfectado, de tal manera que el antígeno captado es procesado y expuesto tanto en el contexto MHC I como de MHC II, dando como resultado la activación de las células T (tanto Th como Tc) de una manera más eficiente. De igual manera, el antígeno puede ser

reconocido directamente por los linfocitos B lo que conlleva a la producción de anticuerpos específicos (Tüting T, 2000).

Para el caso de rotavirus, se han evaluado vacunas de DNA que codifican para las proteínas VP4, VP6 y VP7, todas ellas en el modelo de ratón adulto, en donde como anteriormente se mencionó, es posible determinar el grado de protección, así como determinar la respuesta inmune humoral y celular inducida. Sin embargo se han encontrado resultados variables. En 1997, Chen y cols reportaron que ratones vacunados por la vía intraepitelial, usando el método de "gen gun" utilizando plásmidos que codificaban para las proteínas VP4, VP7 o VP6 del rotavirus Ew, produjeron anticuerpos séricos contra las 3 proteínas, y cuando estos ratones fueron retados con el rotavirus Ew, se encontró que los tres plásmidos indujeron una protección casi total contra la infección. El mismo grupo reportó, que ratones inoculados oralmente con plásmidos que codifican para la proteína VP6 del rotavirus murino EDIM encapsulado en micropartículas sintéticas de polietilenglicol (PEG), producen anticuerpos séricos específicos contra rotavirus, además de anticuerpos IgA's intestinales, y presentan una protección parcial contra la infección con el rotavirus Ew (Chen *et al.*, 1998). De igual manera, si estos plásmidos son inoculados vía anorectal, mediante la técnica de biobalística se genera un mayor nivel de protección contra la infección (Chen *et al.*, 1999). Sin embargo, el grupo de Choi en 1998, encontró que los plásmidos que codifican para las proteínas VP4, VP6 y VP7, inoculados intramuscularmente generan altos niveles de IgG's séricos antirotavirus, sin embargo, no se detecta producción de IgA's intestinales y tampoco se encuentra protección al desafío con el virus murino EC (Choi *et al.*, 1997; Choi *et al.*, 1998).

En un trabajo reciente realizado por el Dr. Esquivel y colaboradores (2002), se logró un nivel de protección de alrededor del 30% contra la infección por rotavirus murino EDIM, en ratones BALB/c inmunizados i.m. con plásmidos que codifican para VP6 y VP2. Estos vectores fueron capaces de generar la producción de anticuerpos séricos específicos contra las proteínas rotavirales, sin embargo no hubo un aumento en la producción de IgA's intestinales. Aunque los ratones inmunizados sólo con VP2, no fueron protegidos contra el reto con el rotavirus EDIM, se observó, que mediante la inoculación de 100 µg del

plásmido que codifica para la proteína VP6, coadministrando con 100 µg de VP2, el nivel de protección obtenido es similar a inocular 200 µg de VP6 solo, lo que presupone que el uso de VP6 y VP2 en combinación, potencia la respuesta protectora contra la infección (Arias N, 2002).

2.2 Vacunas de RNA (replicones).

El uso de vectores de expresión heteróloga derivados de virus para la terapia génica y vacunas se ha visto incrementado en los últimos años, contando con un diverso número de tipos de virus, siendo de los principales el uso de vectores de RNA. Estos vectores en principio, fueron seleccionados y modificados para la expresión de proteínas heterólogas en cultivos de células eucariotes. En la actualidad, los replicones han sido propuestos como inductores de respuesta inmune protectora contra patógenos y tumores, esto debido a su capacidad autoreplicativa y a sus propiedades inmunogénicas (estadios de RNAdc),

Los replicones son basados en el genoma de los alfavirus tales como Sindbis, Semliki Forest Virus o bien el Virus de la Encefalitis Equina (Venezuelan Encephalitis Equine).

El genoma de los alfavirus consta de una cadena sencilla de RNA de polaridad positiva de aproximadamente 11.7 kb dentro de una cápside de geometría icosaédrica que contienen 240 heterodímeros formados por las proteínas E1 y E2. Son virus que presentan envoltura lipídica, la replicación citoplasmática del genoma de RNA es mediada por cuatro proteínas virales no estructurales (NSP1-NSP4) que se encuentran codificadas en la cadena principal del genoma viral. Esta cadena funciona como un RNAm que es traducido directamente por la maquinaria celular, sirviendo a su vez como templado para la síntesis de un intermediario de polaridad negativa, que es utilizado por las proteínas no estructurales como templado para sintetizar un segundo RNAm subgenómico. Las proteínas estructurales son traducidas a partir de este RNA subgenómico como una poliproteína que es procesada posteriormente formando componentes individuales del virion. Este RNA subgenómico puede acumularse a niveles de 10^6 moléculas por célula (Frolov, 1996).

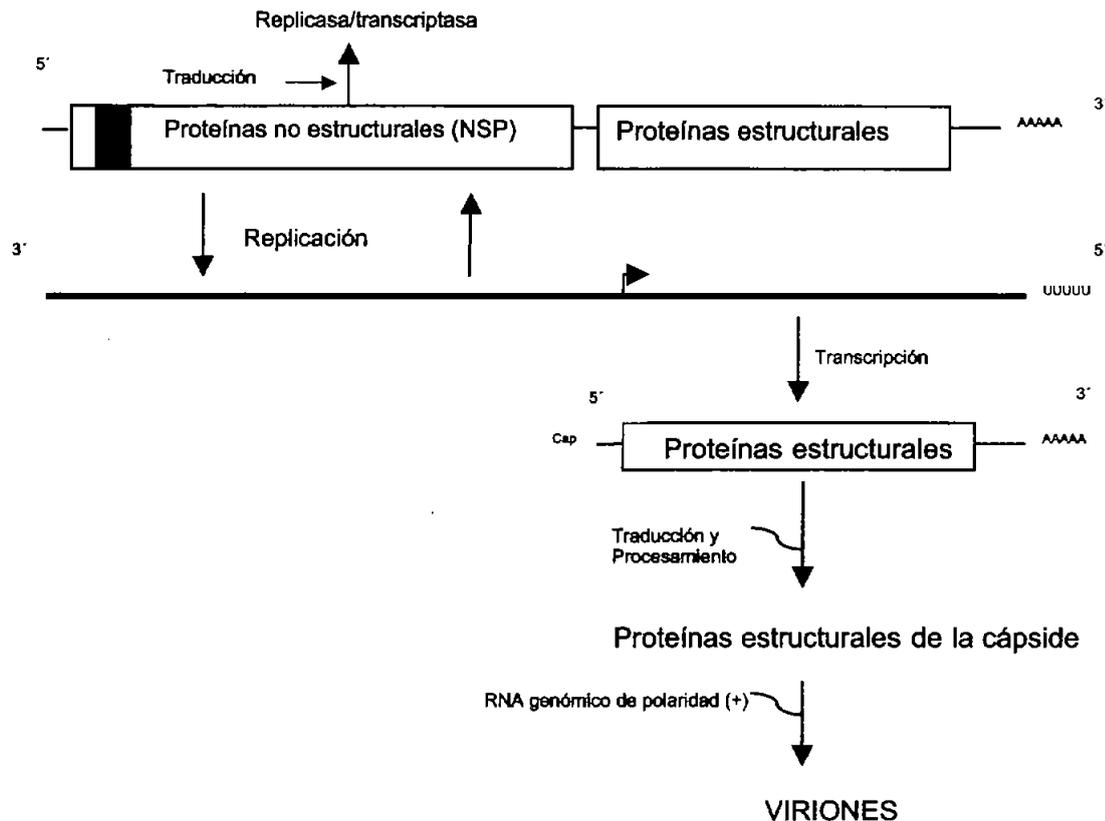


Fig. 2. Ciclo de replicación de los alfavirus.

De manera natural, los alfavirus se transmiten a los vertebrados por la picadura de los mosquitos. En los insectos, la infección se lleva a cabo de forma crónica, la replicación es de manera muy lenta, con el mínimo efecto sobre las células infectadas, en contraste, cuando estos virus infectan células de vertebrados, la replicación se efectúa de una manera rápida, al parecer como un mecanismo de evasión de la respuesta inmune del vertebrado. Esta característica se ve reflejada en células de animales vertebrados en cultivo, ya que el virus apaga la traducción de los mRNA celulares adueñándose rápidamente de la maquinaria traduccional, de tal forma que la célula muere en las siguientes 12-24 h post-infección. Para aplicaciones que requieren de largos tiempos de expresión en células de vertebrados, mediante el establecimiento de infecciones persistentes en células BHK (Baby Hamster Kindey), se aisló una variante denominada como SIN-1 (Frolov, 1996). Este virus posee mutaciones adaptativas permitiendo el desarrollo de una infección persistente sin que

exista daño citopático en poco tiempo, por lo tanto, los vectores usados para expresión de proteínas heterólogas en cultivos de células animales, se derivan de esta variante. En estudios recientes mediante la selección de replicones capaces de generar persistencia en células BHK manteniendo un nivel de expresión constante, sin un efecto citopático, se mapeo un cambio en un aminoácido en la posición 726a de la proteína NSP2 (prolina por leucina), lo que al parecer reduce la acumulación del RNA en las células, permitiendo el establecimiento de clonas de células BHK que mantienen la expresión de los replicones de manera constitutiva (Rice, C y Wash U, 1997, Perri S., 2000).

Tomando en cuenta estas características, la estrategia general para la construcción de los vectores basados en alfavirus, ha sido sustituir los genes de las proteínas estructurales por genes heterólogos, manteniendo el control de la vía transcripcional, y un alto nivel de expresión gracias a el promotor altamente activo del RNA subgenómico. Estos replicones son vectores suicidas, incapaces de empaquetar su progenie y causar una infección productiva (Leitner W², 2000, Palese P, 1998). Los vectores de RNA pueden ser transcritos *in vitro* y ser usados directamente, o bien, los replicones pueden ser empaquetados dentro de partículas cotransfectando un RNA “helper” defectivo que provee de las proteínas estructurales en *trans* dando lugar a la formación de las VRP's (virus-replicons particles). Otra modalidad dentro del diseño de estos vectores, es el uso de plásmidos con la información requerida para la síntesis de un RNAm que contenga todas las características de un replicón (Dubensky T, 1996).

Aunque inicialmente estos vectores fueron diseñados para la expresión de proteínas heterólogas en cultivos celulares eucariotes, han surgido recientemente como una alternativa dentro del uso de vacunas de ácidos nucleicos. El uso de replicones presenta ciertas ventajas sobre el uso de vacunas de DNA desnudo, son capaces de replicarse en diferentes tipos celulares, seguido de una alta expresión del antígeno de interés, causando eventualmente la muerte celular por apoptosis, lo que potencia fuertemente la respuesta inmune, además se requiere de 100-1000 veces menos dosis de pSIN (plásmido que codifica para las proteínas NSP del virus Sindbis) que de vectores de DNA convencionales para obtener los mismos resultados (Leitner W, 2000, Hariharan M, 1998). En adición, la

replicación de estos vectores se lleva a cabo en el citoplasma de las células tranfectadas. Esto en contraste con otros vectores virales como los retrovirus y los adenovirus, los cuales usualmente se integran al núcleo de las células para llevar a cabo la traducción de las proteínas. Sin embargo estos sistemas son sumamente complejos comparados con los replicones, ya que mantienen la expresión de las proteínas heterólogas durante largos periodos de tiempo, además de que expresan varias proteínas antigénicas virus-específicas incluyendo las proteínas estructurales. En el caso de los retrovirus además de poseer baja infectividad *in vitro*, pueden potencialmente presentarse asociaciones virales, o bien producir mutagénesis en la célula hospedera (Dubensky T., 1996)

2.3 Inmunidad de los replicones.

El uso de replicones como vacunas contra patógenos o bien utilizados en la terapia génica en el tratamiento contra tumores, ha sido ensayado en diferentes modelos animales con el fin de generar una respuesta inmune protectora. Sin embargo, dependiendo la forma de replicón que se administre, ya sea en forma de VRP's, DNA o RNA desnudo, así como la vía de inoculación, por vía mucosa o parenteral, las respuestas obtenidas han sido muy variables. Existen grupos que han reportado que aunque las características de los replicones garantizan una alta expresión del antígeno comparado con las vacunas de DNA convencionales, sin embargo no existe correlación con la expresión del antígeno *in vitro*, con la inmunogenicidad que se puede inducir *in vivo*, y que la inmunogenicidad de estos vectores, no radica en la producción de antígeno, si no en la inducción de apoptosis en las células tranfectadas por los estadios de doble cadena que generan en el proceso de replicación (Fig. 2) (Leitner W, 2003, Ying H, 1999).

La apoptosis bajo este sistema, puede generarse tanto por la vía PKR (cinasa dependiente de RNA de doble cadena) como por la vía dependiente de RNAsa L. Ambas son inducidas por los estadios de RNA de doble cadena (RNAdc) generados en la replicación del replicón en el citoplasma.

En una infección natural por alfavirus, como mecanismo antiviral celular, se activa el sistema de IFN α/β , el cual es extremadamente complejo y exhibe múltiples niveles de interconexión entre la activación de los diferentes mecanismos antivirales. La acumulación de RNAdc, estimula una serie de eventos en cascada en donde los dos más caracterizados son el complejo 2-5A sintetasa/RNAsa L, y el de PKR. El complejo 2-5A sintetasa/RNAsa L es constituido por la 2'-5' oligoadenilato sintetasa (OAS) enzima dependiente de la presencia de RNAdc y de la RNAsa L citosólica. El RNAdc producido durante la infección, se une a la enzima OAS. Esta enzima se activa y acopla oligoadenilatos que se unirán específicamente y activarán a la RNAsa L. Esta última, una vez activada degrada el RNA, inhibiendo la síntesis de proteínas tanto celulares como virales conduciendo a la muerte celular. La enzima PKR se expresa de manera constitutiva en las células, sin embargo el estímulo del RNAdc trae como consecuencia la autofosforilación, y por lo tanto la activación. Esta enzima activada, actúa directamente fosforilando los factores iniciadores de la transcripción tales como eIF-2 α , de tal manera que este ya no puede ser reciclado, reduciendo drásticamente la iniciación de la transcripción de los genes celulares. Por otra parte, esta enzima fosforila a I κ B, lo que conlleva a la liberación de NF- κ B y a la posible inducción la muerte celular por apoptosis. Lo anterior ha sido demostrado en el modelo infeccioso de Sindbis, en donde ratones deficientes de las vías dependientes de RNAdc desarrollan una infección letal, en contraste, ratones normales desarrollan una infección subclínica. Este mecanismo antiviral parece ser muy eficiente controlando la diseminación de los alfavirus (Ryman K D., 2002). Por lo anterior y debido a que el uso de replicones mimetiza una infección natural, ambas vías parecen estar interviniendo en la inducción de apoptosis en los sistemas de uso de replicones con fines terapéuticos o de vacunación.

La apoptosis tiene consecuencias inmunológicas muy importantes, ya que incrementa la asimilación del antígeno por las CPA's para su procesamiento y presentación por el MHC I activando de esta manera a las células T CD8⁺ (Leitner¹, 2000). Por lo tanto, esta característica relacionada al uso de replicones, sirve como un adyuvante en este sistema.

En los protocolos utilizando replicones para la inducción de una respuesta inmune protectora contra tumores, la participación de las vías RNAsa L y PKR se ha demostrado *in vitro* e *in vivo* utilizando ratones deficientes de apoptosis.

Para el caso de PKR, se ha demostrado su autofosforilación en células humanas en cultivo transfectadas con los replicones, en comparación con células transfectadas con otros vectores, en donde no se observó esta fosforilación, demostrando el efecto específico de los replicones. Para la enzima RNAsa L se utilizaron ratones “knockout” de RNAsa L (*Rancel^{-/-}*), en los que la inducción de apoptosis se ve disminuida, y no son protegidos contra el desarrollo de tumores en este sistema aún después de ser inmunizados con los replicones (Leitner W, 2003). Se sabe también que las células CD8⁺ son las responsables de la protección obtenida en diferentes ensayos tanto en modelos contra tumores (Ying Han, 1999, Leitner W, 2003, Weng-Fang Ch, 2001), como para algunos antígenos de patógenos como paludismo y el Virus de Influenza, en donde se observó la secreción de IFN γ en el medio de cultivo por células aisladas de animales vacunados estimulando *in vitro* de manera específica con el antígeno de interés (Moriya, 1998). De igual manera para PVR (Virus de pseudorabia) se determinó que la producción de IFN γ no correlaciona con la producción de anticuerpos (Dufour, 2002), ya que en algunos animales con títulos altos de anticuerpos específicos no presentaron protección al reto, de manera contraria, algunos animales sin un título de anticuerpos detectable, presentaron altos niveles de células T CD8⁺ específicas y protección al desafío.

Por otra parte, se sugiere que los replicones inducen una memoria de manera local, ya que en experimentos recientes utilizando VRP's que codifican para la proteína Gag de HIV (SIN-Gag) se demostró que la inmunización vía mucosa, intravaginal (i.vag.) o intrarectal (i.r.), confiere una protección total contra el reto i.vag. e i.r. respectivamente contra el virus vaccinia (VV) que codifica para la proteína Gag (VV-Gag). Esto se determinó midiendo la replicación del virus VV-Gag en ovarios de ratones inmunizados previamente con SIN-Gag. Los ratones vacunados por vía intramuscular e intranasal, no presentaron protección contra el reto i.v. o i.r. Sin embargo, los ratones inmunizados por la vía intranasal, presentaron un alto título de CD8⁺ específicas en la mucosa del útero y vagina así como en

ganglios linfáticos ilíacos, sin embargo estos no fueron capaces de proteger al desafío, por lo que se presupone que la activación de células T CD8⁺ locales directamente en útero y recto, son las responsables de conferir protección (Vajdy, 2001).

III HIPOTESIS.

Los replicones de RNA que codifiquen para las proteínas VP2 y VP6 de rotavirus murinos inoculados por vía intramuscular e intrarrectal, inducirán una respuesta inmune capaz de generar una protección contra la infección por rotavirus en el modelo de ratón adulto.

IV. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Construir vectores basados en replicones del virus Sindbis, que expresen las proteínas VP2 y VP6 de rotavirus murino y evaluar su capacidad de inducir protección contra la infección por rotavirus murino en ratones adultos.

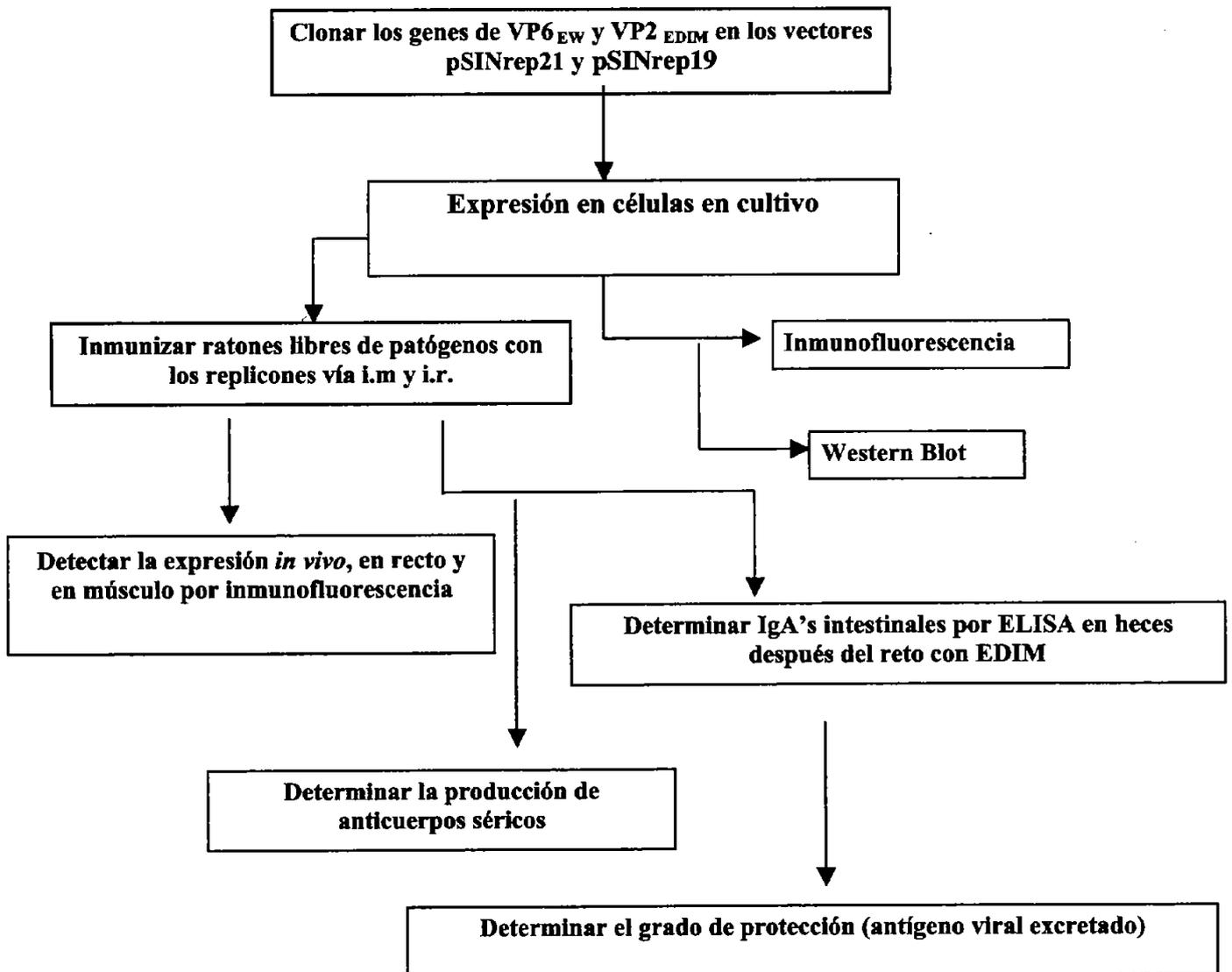
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Construir replicones de RNA que expresen las proteínas VP2 y VP6 de rotavirus murino.
2. Evaluar la síntesis de las proteínas VP6 y VP2 en células BHK-21 transfectadas con los replicones.
3. Inmunizar ratones por vía intramuscular e intrarrectal utilizando los replicones de RNA para VP6 y VP2.
4. Evaluar la respuesta humoral en los ratones inmunizados.
5. Determinar si la repuesta inmune inducida por estos vectores confieren protección contra el desafío con una cepa de rotavirus murino.

V. MATERIALES Y METODOS.

5.1 Diseño experimental.

A continuación se describe de manera resumida el diseño experimental empleado en este proyecto.



5.2 Construcciones.

Para el desarrollo de este proyecto se utilizaron los genes de las proteínas VP2 y VP6 provenientes de cepas murinas. Ambos genes pertenecen a cepas de rotavirus murinos. El primer objetivo de este proyecto fue clonar estos genes en los vectores pSINrep19 y pSINrep21 (donados por C. Rice Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri). El replicón pSINrep21, es un plásmido que posee un promotor eucariótico RSV (Virus de Sarcoma de Rous), que puede ser transfectado directamente a las células. Por otro lado, el replicón pSINrep19, posee un promotor de fago SP6 y el RNA debe de ser obtenido *in vitro* para posteriormente ser transfectado a las células. Debido a la falta de sitios de restricción compatibles tanto en los genes como en los vectores para llevar a cabo una clonación dirigida, se siguió la siguiente estrategia:

A) Construcción de los replicones pSINrep19-VP6 y pSINrep21-VP6

El gen de VP6 (1377 pb) se obtuvo a partir de la construcción pBKS-VP6 (donado por H. Greenberg). Este plásmido fue digerido con la enzima *BamHI* aprovechando que se encontraban dos sitios a ambos lados del gen. Los fragmentos obtenidos fueron tratados con la enzima Klenow polimerasa (BioLabs) para rellenar los extremos 5' sobresalientes y obtener extremos romos. Posteriormente el gen se purificó mediante un gel de agarosa de bajo punto de fusión (Cambrex) y clonado en el sitio *SmaI* del plásmido pRS2. El sentido del inserto, fue confirmado con la enzima de restricción *HindIII* (BioLabs). A partir de la construcción pRS2-VP6, el gen fue extraído nuevamente utilizando los sitios *BssHII* y *PstI*, este último sitio se rasuró en su extremo 3' con la enzima T4 polimerasa (BioLabs), con la finalidad de dejarlo romo.

Los vectores pSINrep19 y pSINrep21, fueron digeridos con las enzimas *MluI* compatible con *BssHII* del gen y con *PmlI* compatible con extremos romos, y defosfatados con fosfatasa alcalina (Boehringer).

La purificación de los fragmentos digeridos se hizo en geles de agarosa de bajo punto de fusión (Cambrex) al 1%. La banda de interés se aisló e incubó a 70° C por 10 minutos con 1 µl de MgCl₂ 1M. Una vez que la agarosa se tornaba líquida, se agregó 1ml de resina (DNA binding resin, Wizard), se agitó vigorosamente en vortex durante un minuto y posteriormente esta suspensión se pasó por una columna Wizard con ayuda de una jeringa de 3 ml, se lavó dos veces con 1ml de isopropanol grado HPLC (Sigma). El DNA fue recuperado de la columna centrifugando durante 20 segundos a 13000 rpm con TE 1X como buffer de elución. La concentración de los fragmentos se determinó en un gel de Agarosa (Whittaker Molecular Applications) al 0.8%.

La reacción de ligación se llevó a cabo en una relación aproximada de 3 a 1 M inserto-vector. Se incubó a 12° C durante 12 horas con la enzima T4 ligasa (Fermentas). Las ligaciones se purificaron por el método de fenol-cloroformo e inmediatamente fueron electroporadas en la cepa de *E. coli* JM101 utilizando cubetas de electroporar de 0.1mm dando un pulso de 1.6 kV, 25 mFd, con el controlador de pulso de resistencia fijo al infinito, en un electroporador BioRad Gene Pulsar. Las células se recuperaron en 1 ml de medio SOB y se incubaron durante 1 hr a 37°C. Posteriormente el pellet se recuperó mediante centrifugación (2 min a 9000 rpm) y se plaquearon en cajas de LB con Ampicilina (50) e incubaron por 12 horas a 37°C. Se tomaron colonias crecidas en las placas, y fueron pasadas a medio LB líquido con Ampicilina para posteriormente extraer los plásmidos utilizando el kit de purificación (Roche) o mediante el método fenol-cloroformo. Las construcciones pSINrep19-VP6 y pSINrep21-VP6 fueron corroboradas mediante digestiones con la enzima *BamHI*.

B) Construcción del replicón pSINrep21-VP2.

Bajo el protocolo anteriormente mencionado, el gen de VP2 (2712 pb) se obtuvo a partir de la construcción pBSK-VP2 (clonado en nuestro laboratorio). El gen fue liberado con las enzimas *BamHI* y *EcoRI* y clonado de manera dirigida en el plásmido pRS2. El gen VP2, fue extraído de pRS2 utilizando los sitios *BssHIII* y *PstI*, y siguiendo la misma estrategia

que para el gen de VP6, fue clonado en el vector pSINrep21. Las clonas obtenidas de esta ligación fueron corroboradas con la enzima *BamHI*.

5.3 Transcripción *in vitro*.

Para obtener el transcrito *in vitro* del replicón pSINrep19-VP6, se utilizó el kit MEGAscript (Ambion). El plásmido una vez purificado, fue linearizado con la enzima *XhoI* (run off). El DNA linearizado fue purificado por fenol-cloroformo y cuantificado por gel de agarosa al 0.8%. Esta reacción consiste en agregar 1 µg de DNA linearizado que servirá como templado, la polimerasa SP6 que reconoce el sitio de inicio de la traducción y una concentración 50 mM de nucleótidos (ATP, CTP, GTP, UTP), así como 4 mM de análogo de cap con los cuales se sintetizará el nuevo RNA. Una vez realizada la mezcla, se incubó durante 1hr a 37°C. El RNA recién sintetizado se purificó por el método de fenol-cloroformo e inmediatamente almacenado a -70°C para evitar su degradación.

La cuantificación se llevo a cabo por espectrofotometría a una absorbancia 260 nm y la integridad del RNA fue determinada mediante un gel de agarosa al 0.8% en TAE 1X libre de RNAsas.

5.4 Expresión de los vectores en células en cultivo.

La expresión de las proteínas VP2 y VP6 se analizó por inmunofluorescencia y Western blot de células BHK-21 transfectadas con los plásmidos pSINrep21-VP2 y pSINrep21-VP6, así como con el transcrito de pSINrep19-VP6. Para esto, se utilizaron dos protocolos de transfección: A) Electroporación y B) Lipofección, los cuales se describen a continuación.

A) Electroporación de células BHK-21.

Las células se sembraron en frascos de 150mm, y cuando alcanzaron un 80% de confluencia fueron tripsinizadas por 5 minutos a 37°C. Se centrifugaron durante 10 minutos a TA a 2000rpm, se descartó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con PBS libre de

RNAsas, centrifugando a 2000 rpm durante 10 minutos cada uno. Para determinar la viabilidad celular, se hizo una dilución de células 1:10 en PBS y las células fueron contadas en hemocitómetro. Se realizó un último lavado y en base a la viabilidad celular obtenida, la pastilla de células se resuspendió en el PBS necesario para alcanzar una concentración de 2×10^7 cel/ml para cada electroporación. Las células fueron colocadas en cubetas de electroporación de 0.2mm, se agregaron 10 μ g de plásmido o de RNA, según el caso, y posteriormente se dieron dos pulsos en un electroporador BioRad Gene Pulsar, bajo las siguientes condiciones. 1.5 kV, 25 mFD, con el controlador de pulso de resistencia fijo sobre el infinito. Inmediatamente después del pulso, las células fueron recuperadas y cultivadas en placas de 12 y 24 pozos con MEM suplementado al 10% SFB. Estas condiciones se mantuvieron, tanto para los plásmidos pSINrep21-VP6 y pSINrep21-VP2, como para el transcrito de pSINrep19-VP6.

B) Ensayos de transfección por lipofección.

Se utilizaron los diferentes protocolos de transfección para Lipofectamina 2000 (Invitrogene), Lipofectamina (Invitrogene) para los plásmidos y Lipofectina (Gibco) para el caso de RNA. Las células BHK-21 fueron cultivadas sobre cubreobjetos redondos de 10 mm y 18 mm de diámetro, con MEM al 10% SFB en cajas de 24 y 12 pozos (Costar) para posteriormente hacer inmunofluorescencia.

Los protocolos con lipofectamina y lipofectamina 2000 son muy similares, según los requerimientos de cada ensayo, los plásmidos aproximadamente de 800 ng a 1 μ g por pozo, fueron mezclados con MEM en un tubo de poliestireno de 5ml (Elkay), en otro tubo, se mezclaron de 1-4 μ l según el agente de lipofección utilizado. Ambas mezclas se dejaron reposar por 10 minutos a TA. Posteriormente, se combinaron en un solo tubo y se incubaron 20 minutos a TA. La monocapa de células fue lavada previamente con MEM. La mezcla final se agregó a las células, y se incubó durante 2 hrs a 37°C con CO₂ 5%, y un ambiente húmedo. Los pozos fueron lavados con MEM dos veces y por último se agregó medio MEM suplementado con SFB al 10%. Las células se fijaron a las 48 hrs post-lipofección. Como control de la eficiencia de transfección se utilizó el plásmido

pSINrep21-GFP (clonado en nuestro laboratorio), en donde a las 12 hrs post-lipofección se observó expresión de la proteína GFP *in vivo*, mediante el microscopio invertido de epifluorescencia. El plásmido pSINrep21, fue utilizado como control negativo en todos los casos.

Para el caso del RNA obtenido *in vitro* a partir del replicón pSINep19-VP6, la lipofección se llevó a cabo con lipofectina, en donde las células fueron lavadas con PBS 1X frío por 2 veces. La mezcla de lipofectina con RNA se llevó a cabo de la siguiente manera: Se mezclaron 4 μ l por pozo de lipofectamina en 146 μ l de PBS 1X libre de RNAsas, en un tubo de poliestireno, en otro tubo 4 μ g de RNA fue diluido en 150 μ l de PBS 1X por pozo, posteriormente se mezclan ambas combinaciones y se incuban en hielo alrededor de 20 minutos, posteriormente esta mezcla se agregó a la monocapa de células aproximadamente 300 μ l por pozo, se incubó en hielo 10 minutos. Las células se lavaron 2 veces con MEM⁺. Las placas fueron incubadas por 48 hrs a 37°C con 5% de CO₂ y en ambiente húmedo.

5.5 Inmunofluorescencia

La expresión de las proteínas se determinó a las 48 hrs post-transfección por inmunofluorescencia. Para ello, la monocapa celular se lavó una vez con PBS y se fijó durante 20 minutos con PFA (Sigma, Chemicals) al 2%, posteriormente se realizaron 4 lavados con PBS-50mM NH₄Cl. Una vez fijadas las células, se permeabilizaron durante 15 minutos con un amortiguador de permeabilización (PBS-1% BSA, 0.5% Tritón X-100). Seguido de dos lavados con PBS-50mMNH₄Cl, las células fueron incubadas durante 1hr a TA con un anticuerpo policlonal contra rotavirus proveniente de conejo anti-YM para detectar VP6 y anti-EDIM para detectar la proteína VP2 (1:100) diluidos en PBS-1% BSA, al término de la incubación, se realizaron 4 lavados y posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario de cabra anti-Ig's totales de conejo (1:100) acoplado a Alexa 488 (Molecular Probes). Las células fueron analizadas por microscopia de epifluorescencia.

5.6 Western blot

Se realizó una selección de células BHK-21 transformadas agregando puromicina (SIGMA-Aldrich) 5µg/ml al medio de cultivo, con la finalidad de enriquecer la población de células transformadas. Una vez que llegaron a confluencia, aproximadamente en 7 días, fueron lisadas utilizando un buffer de lisis (Triton 1%, Tris-HCl pH7.5 50mM, NaCl 150mM, EDTA 1mM). Los lisados celulares fueron centrifugados a 13,000 rpm por 5 minutos y el sobrenadante fue analizado en un gel de SDS-acrilamida al 11% en buffer Tris-Glicina. Las muestras se corrieron a 100 V en el gel concentrador (2ml de H₂O destilada, 108 µl de Tris 2M ph 6.8, 330 µl de archilamida bis (30-0.8%), 25 µl de SDS 10%, 25 µl de persulfato de amonio 10%, 3 µl de Temed) y a 150 V en el gel separador (1.9 ml de agua destilada, 729 µl de Tris 2M pH 8.8, 1.33 µl de archilamida-bis (30-0.8%), 36.5 µl de SDS 10%, 25 µl de Persulfato de amonio 10% 4 µl de Temed). Posteriormente fue transferido a una membrana de nitrocelulosaa 50V durante 1 hr, con buffer CAPS (10 mM ciclohexilamino-1-ácido propanesulfónico-pH11, 10% metanol).

Las membranas de nitrocelulosa, fueron bloqueadas con PBS 1X-Leche al 5% durante 2 horas a TA con agitación. Después de un lavado con la solución de lavado PBS 1X- Tween 0.2%, se agregó el anticuerpo primario (1:1000). Para detectar la proteína VP6 codificada tanto en el replicon de DNA, como en el transcrito de RNA se utilizó un anticuerpo policlonal anti-YM, se incubó durante una hora a TA con agitación suave, para la proteína VP2 codificada en el plásmido pSINrep21-VP2, como anticuerpo de detección se utilizó una mezcla de anticuerpos policlonales anti-EDIM 1:2000 y anti-YM 1:3500 en solución bloqueadora. Se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno y por último las membranas fueron incubadas durante 1 hr con un anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa (1:3500) (Kikegaard y Perry Labs) en todos los casos. Las membranas fueron lavadas tres veces y la detección de las proteínas se realizó agregando Luminol (Perkin Elemer) como sustrato. Sobre la señal fue sobrepuesto un film (Kodak) y revelado según las especificaciones del fabricante.

5.7 Determinación de la expresión de las proteínas de rotavirus VP6 y VP2 *in vivo*.

Con la finalidad de comprobar la expresión de las proteínas VP2 y VP6 en ratones inoculados i.m e i.r con los replicones pSINrep21-VP2 y pSINrep21-VP6, se realizaron dos técnicas histológicas: congelación del tejido para cortes con crióstato en el caso de músculos y la inclusión en parafina para el caso de intestino, para cortes en microtomo convencional. Se utilizaron dos ratones para cada tratamiento.

A) Criohistología.

Los plásmidos pSINrep21-VP6 y pSINrep21-VP2, se inocularon 25 μ g i.m., diluidos en 50 μ l de solución salina estéril al 0.9% agregando 2 μ l de tinta india como marcador del sitio de inoculación; se utilizó el plásmido pSINrep21 vacío como control. Después de 7 días, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. Los cuádriceps fueron extraídos y fijados con paraformaldehído (SIGMA) al 4% durante 12 hrs. Posteriormente, los tejidos fueron lavados con PBS 1X y colocados en una solución de sacarosa al 30% durante toda la noche. Seguido a lo anterior, los tejidos fueron congelados rápidamente a -70°C e incluidos en la resina Cryo-M-Bed (Bright Instrument Company Limited). Los cortes se realizaron en el criostato, de aproximadamente 10 μ m de grosor. Los cortes fueron recuperados sobre laminillas previamente tratadas con una dilución 1:10 de poly-lisina (Sigma). Inmediatamente, las laminillas fueron puestas a -70°C hasta su procesamiento. Para la inmunotinción, fueron puestas a temperatura ambiente y fijadas nuevamente con PFA al 4% por dos minutos, se realizaron 4 lavados con PBS, los cortes fueron permeabilizados con Triton al 1% en PBS-BSA2%, durante 15 minutos, posteriormente fueron bloqueados durante 2 horas a TA con una solución bloqueadora (PBS-Tritón 0.2%-BSA 2%). Después de dos lavados, se agregó el primer anticuerpo de conejo anti-EDIM (1:100) durante 1 hr a TA, posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS-Triton 0.2%, y se agregó el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a Alexa 647 (Molecular Probes) (rojo lejano) en una dilución 1:200.

B) Inclusión en parafina

Para la vía i.r., se inocularon 20 µg de los replicones pSINrep21-VP2 y pSINrep21-VP6 y como control el plásmido pSINrep21 vacío, diluidos en 20 µl de solución salina al 0.9%. Los ratones fueron sacrificados 72 hrs posteriores a la inoculación. La región terminal del intestino aproximadamente 3 cm fue extraída y fijada con PFA (SIGMA) al 4% y posteriormente procesados para ser incluidos en parafina. Una vez fijados, los tejidos fueron deshidratados de manera gradual, pasando por recipientes con diferentes concentraciones de etanol 30%-100%, dejando aproximadamente 30 minutos en cada alcohol. Posteriormente, fueron transparentados de igual manera con citrisolv (FISHERbrand) comenzando con una dilución 1:2 en etanol, hasta llegar al 100% citrisolv. Los tejidos deshidratados y transparentados se introducen durante 1hr en parafina-citrisolv 1:2 a 65°C, 1 hrs más en una dilución 1:1 y así sucesivamente hasta llegar al 100% de parafina, haciendo dos cambios de parafina de 1hr cada uno (Paraplast X-tra). Los bloques de parafina fueron almacenados a 4°C hasta su procesamiento. Se realizaron cortes histológicos de 10mm de grosor en el microtomo. Los cortes recuperados en laminillas con poly-lisina, fueron sometidos a una desparafinación progresiva. Inicialmente fueron introducidos en una solución 1:2 de citrisolv-parafina durante 1 hr, posteriormente en una solución 1:1 citrisolv-parafina, durante una hora y 2:1 citrisolv-parafina y así sucesivamente hasta llegar a 100% de citrisolv. La rehidratación se llevo a cabo de manera gradual, primeramente eliminado el citrisolv de los tejidos, pasando por diferentes concentraciones de alcohol hasta llegar a PBS 1X. Una vez rehidratados, los cortes fueron permeabilizados con Tritón al 1% en PBS-50mM NH₄Cl-Leche 1% durante 15 minutos. Fueron bloqueados durante 2 horas a TA con (PBS-50mM NH₄Cl-Leche 1%), se lavaron 4 veces con PBS-50mM NH₄Cl y se agregó el anticuerpo anti-EDIM de conejo en una dilución 1:100 en solución bloqueadora (PBS-NH₄Cl-1%Leche) incubado durante 1 hr a 37°C, seguido de 4 lavados, se utilizó un anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a Alexa 647 (rojo lejano) (Molecular Probes) en una dilución 1:200. Todos los cortes fueron analizados por microscopia confocal.

5.8 Ratones e Inmunizaciones.

Para todos los ensayos se utilizaron ratones singénicos hembras de la cepa BALB/c (H-2^d) de 5-6 semanas de edad y nacidos libres de patógenos (Harlan, México). Se utilizaron dos grupos de 4 ratones para cada vía de inoculación, utilizando en ambos casos un grupo como control. Los plásmidos (pSINrep21-VP6 y pSINrep21-VP2) fueron purificados por el sistema (Endo-Free, Qiagen), y cuantificados por espectrofotometría a 260 y 280nm. Las inoculaciones se llevaron a cabo por dos vías, la intramuscular (i.m) e intrarrectal (i.r). Para la vía i.m se realizaron tres inmunizaciones en intervalos de 3, 3, y 2 semanas antes del reto. Los ratones fueron anestesiados con 150 μ l de SEDAVET al 10%-PBS y posteriormente inoculados en cada cuádriceps utilizando una jeringa de insulina, con diferentes concentraciones de plásmido (50 μ g y 25 μ g) diluidos en 50 μ l de solución salina estéril al 0.9% libre de endotoxinas.

Bajo los mismos intervalos de tiempo, se inocularon 20 μ g de plásmido diluidos en 20 μ l de solución salina al 0.9% estéril vía i.r. Para ello se utilizó una punta de micropipeta diseñada para cargar geles de acrilamida.

Previo a cada inmunización, los ratones fueron sangrados y el suero fue analizado para la presencia de anticuerpos antirrotavirus por medio de un ELISA.

5.9 Reto con el rotavirus EDIM.

Para llevar a cabo el reto se utilizó el rotavirus murino de la cepa EDIM donado amablemente por el Dr. Richard Ward proveniente de diarrea de ratones neonatos infectados. Todos los ratones fueron retados dos semanas posteriores a la última inmunización.

Para el desafío, los ratones fueron inoculados oralmente mediante el uso de una cánula gástrica con 100 μ l de DMEM⁺ conteniendo 1×10^4 uff del rotavirus de la cepa EDIM.

Previamente, se administraron 100 µl de bicarbonato de sodio al 1.3% para neutralizar los ácidos gástricos.

5.10 Determinación del grado de protección contra rotavirus en ratones inoculados con los replicones.

Se colectaron heces de los ratones retados diariamente por 8 días después del desafío, las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta el término del ensayo. Posteriormente las muestras fueron resuspendidas al 5% (peso/volumen) en una solución amortiguadora disolvente que contiene 10mM Tris (pH 7.4), 100 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 5% de suero fetal de bovino, 0.05% Tween-20, 10 mM azida de sodio, y se almacenaron durante toda la noche a 4°C para su disgregación. Las partículas virales contenidas en las heces, fueron liberadas por agitación fuerte en un vortex y la suspensión obtenida fue centrifugada a 13000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante conteniendo las partículas, fue analizado mediante un ELISA de captura.

Las placas de 96 pozos para ELISA (Costar High binding), se sensibilizaron durante toda la noche a 4°C con un anticuerpo policlonal hiperinmune de cabra diluido 1:5000 en PBS, después de 2 lavados con TNC (10mM Tris pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl₂) al 0.05% Tween-20, las placas fueron bloqueadas con una solución de PBS al 5% de leche (Carnation, libre de grasa) con 0.05% de azida de sodio por 2 horas a TA. Se realizaron dos lavados con TNC-Tween 0.05% y posteriormente se agregaron 50 µl del sobrenadante del homogenizado de las heces por duplicado, las placas fueron incubadas durante 2 hrs a 37°C. Las placas se lavaron 4 veces y se adicionaron 50 µl de anticuerpo policlonal hiperinmune contra rotavirus de simio producido en conejo anti-RRV, diluido 1:2000 en solución de bloqueo y se incubó una hora a 37°C. Al término de este tiempo, las placas fueron lavadas 4 veces. Se adicionaron 50 µl de un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG's de conejo marcado con fosfatasa alcalina (ZYMED) en una dilución 1:2000. La placas se incubaron por 1 hr a 37°C. Se realizaron 4 lavados y se agregó el sustrato (p-nitrofenil fosfato disodio; Sigma). Se incubó la reacción durante 30 y 45 minutos a 37°C tomando lecturas a 405nm de absorbancia en el lector de ELISAS (Bio-Tek Instruments, Burlington, Vt). Como

control positivo se utilizó un lisado de células infectadas con el rotavirus RRV. En todos los casos el valor del control negativo sin antígeno fue restado al resto de la placa.

5.11 Detección de anticuerpos IgA's específicos contra rotavirus en heces.

Para detectar la producción de IgA's anti-rotavirus intestinales, las placas de 96 pozos (Costar, High binding) se dejaron sensibilizando durante toda la noche a 4°C con un 50 µl de anticuerpo policlonal hiperinmune de cabra diluído 1:5000 en PBS con 0.05% de azida de sodio. Se realizaron dos lavados con TNC-0.05%Tw20, posteriormente, la placa fue bloqueada con 150 µl de leche al 5% (Carnation, libre de grasa) en TNC-0.05%Tw20 durante dos horas a TA. Seguido de dos lavados, se agregaron 50 µl de lisado proveniente de células MA104 infectadas con rotavirus RRV. Las placas fueron incubadas durante 2 hrs a TA. Se realizaron 4 lavados con TNC-0.05%Tw20 y se agregaron 50 µl por duplicado del sobrenadante obtenido del homogenizado de las heces anteriormente mencionado. Las placas fueron incubadas durante 1 hr a 37°C. Posteriormente, las placas fueron lavadas 4 veces e incubadas con 50 µl de una dilución 1:1000 de anticuerpo de cabra anti-IgA's de ratón conjugado a peroxidasa (Kirkegaard an Perry Labs) por 1 hr a 37°C. Después de lavar 4 veces, se adicionaron 50 µl del sustrato o-fenilenediamina (Sigma) en buffer de acetatos y se incubó por 10-15 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se agregaron 50 µl de H₂SO₄ 2M para detener la reacción. Las placas fueron leídas en el lector de ELISA a una longitud de onda de 492nm.

5.12 Ensayo de ELISA de captura para determinar anticuerpos séricos contra rotavirus.

Se colectó sangre venosa periférica a partir de una punción en la cola de cada ratón. Las muestras fueron colectadas un día antes de cada inoculación y por último un día antes del reto, las muestras de sangre total, fueron incubadas durante 30 min a 37°C. Una vez formados los coagulos, se colocaron a 4°C, aproximadamente 2 hrs, los sueros fueron separados del paquete celular por centrifugación 10 min a 3500 rpm y almacenados a -20°C para su posterior análisis. La presencia de anticuerpos séricos se determinó mediante la

técnica de ELISA. Las placas para el ensayo se sensibilizaron durante toda la noche a 4°C con un anticuerpo policlonal hiperinmune de cabra diluido 1:5000 en PBS con 0.05% de azida de sodio, seguido de dos lavados con PBS-0.05%Tw20, las placas fueron bloqueadas con PBS-2%SFB-0.05%Tw20 durante 1hr a 37°C, posteriormente, se realizaron dos lavados con PBS-0.05%Tw20 y se agregaron 200 ng de virus semipurificado por colchón de sacarosa. Las placas se incubaron durante 2 hrs a TA, se realizaron 4 lavados con PBS-0.05%Tw20, posteriormente, se agregaron los sueros de los ratones inmunizados en una dilución 1:100 en PBS y fueron incubados durante 1hr a 37°C. Después de 4 lavados, se agregaron 50 µl de un anticuerpo policlonal de conejo anti-Ig's totales de ratón (ZYMED) diluido 1:1000 en la solución de bloqueo, las placas se incubaron durante 1 hr a 37°C. Se realizaron 4 lavados y por último se agregaron 50 µl un anticuerpo policlonal anti-IgG's de conejo acoplado a fosfatasa alcalina (ZYMED) diluido 1:1000. Por último, se agregó el sustrato (p-nitrofenil fosfato disodio; Sigma). La reacción se incubó durante 30 y 45 minutos a 37°C tomando lecturas a 405 nm de absorbancia en el lector de ELISAS. Como control positivo, se utilizaron sueros de ratones inoculados vía i.m con el plásmido pcDNA-VP6 y como control negativo, un suero preimmune de ratón.

VI. RESULTADOS

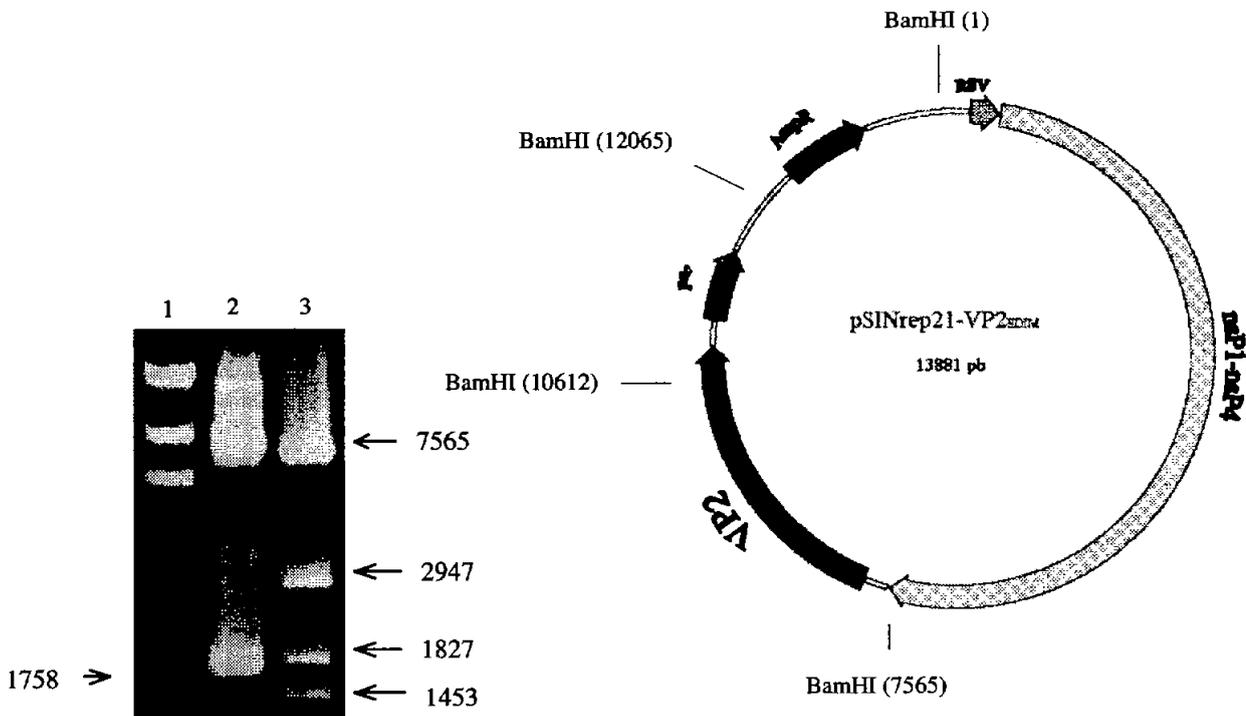
6.1 Construcción de los replicones.

Los genes de las proteínas estructurales VP2 y VP6 de rotavirus murino, se obtuvieron de los plásmidos pBKS-VP6 y pBSK-VP2. Sin embargo, debido a la falta de sitios compatibles de estas construcciones con los vectores de interés, pSINrep21 y pSINrep19, ambos genes se clonaron en el plásmido pRS2 (plásmido con una gran cantidad de sitios de clonación). Para ser clonados en pSINrep21 y pSINrep19, los genes de rotavirus se obtuvieron a partir de las construcciones pRS2-VP6 y pRS2-VP2 digiriendo con las enzimas *BssHIII* y *PstI*/T4 polimerasa. Por otro lado los vectores pSINrep21 y pSINrep19 se digirieron con las enzimas *MluI* y *PmlI*, sitios compatibles con *BssHIII* y *PstI*/T4 polimerasa respectivamente. Al llevar a cabo la reacción de ligación entre los genes y vectores, los sitios *PmlI* y *MluI* se perdieron en los plásmidos resultantes, sin embargo se logró verificar la identidad de cada uno de ellos por digestión con la enzimas de restricción *BamHI*, los mapas de las construcciones finales se muestran en la figura 3.

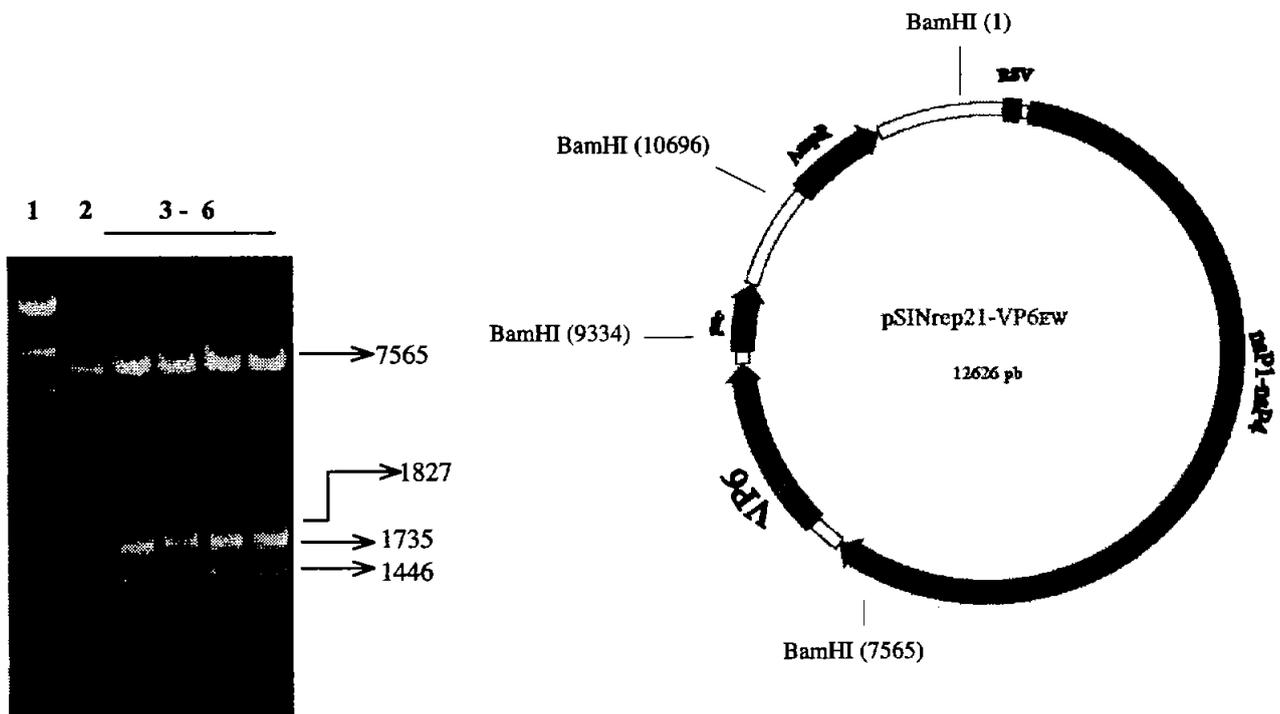
El plásmido pSINrep21 da como resultado tres fragmentos de 7.5, 1.8 y 1.7 kb digerido con la enzima *BamHI*, mientras que la construcción pSINrep21-VP2, origina los fragmentos de 7.5, 2.9, 1.8, 1.7 y 1.4 kb (Fig. 3A). Los fragmentos derivados de la digestión con la enzima *BamHI* de la construcción pSINrep21-VP6, fueron los siguientes: 7.5, 1.8, 1.7 y 1.4 kb (Fig. 3B). Todas estas construcciones fueron además verificadas con las enzimas *AlwNI*, para el caso de pSINrep21-VP2 y *PvuI* en el caso de pSINrep21-VP6 (datos no mostrados)

Por otro lado, el plásmido pSINrep19 que contiene el gen de VP6 (pSINrep19-VP6) digerido con la enzima *BamHI* produce dos fragmentos de 10.1 y de 1.5 kb, mientras que el plásmido control pSINrep19 solamente se linearizó observándose un fragmento de 10 kb aproximadamente (Fig. 3C). De esta manera se confirmó la identidad de todas las construcciones que contienen los genes de rotavirus VP2 y VP6 clonados en los vectores derivados del virus Sindbis pSINrep19 y pSINrep21.

A) pSINrep21-VP2.



B) pSINrep21-VP6



6.2 Expresión de las proteínas VP2 y VP6 de rotavirus codificadas en los replicones de RNA pSINrep21-VP2, pSINrep21-VP6 y pSINrep19-VP6 en cultivo de células de mamífero.

Para demostrar que los plásmidos pSINrep21-VP2, pSINrep21-VP6 y el transcrito obtenido *in vitro* a partir del plásmido pSINrep19-VP6 eran capaces de dirigir la expresión de las proteínas de rotavirus en células de mamífero, se transfectaron células BHK-21 con los replicones de RNA y la expresión de las proteínas se analizó por dos métodos, por inmunofluorescencia y por Western Blot.

Como control negativo, las células se transfectaron con el plásmido pSINrep21. Para el caso de las células transfectadas con el RNA, se utilizó un transcrito obtenido *in vitro* a partir del plásmido pSINrep19 como control negativo (dato no mostrado). Como control de transfección para todos los ensayos, se utilizó la construcción pSINrep21-GFP (Fig. 4B), y en el caso del replicón de RNA, se utilizó el transcrito obtenido del replicón pSINrep19-GFP (dato no mostrado). Ambos vectores fueron previamente construidos en nuestro laboratorio.

A. Inmunofluorescencia.

La proteína VP2, expresada en células BHK-21 transfectadas con el plásmido pSINrep21-VP2, mostró una distribución citoplásmica, sin ningún patrón de asociación aparente (Fig. 4F). Como control positivo se utilizó pcDNA3-VP2 (Fig. 4G), en donde fue posible observar este mismo patrón. En el control negativo, en este caso el replicón pSINrep21 (Fig. 4A), no se observó fluorescencia.

Expresando la proteína VP6 en células BHK-21, con los replicones de RNA pSINrep21-VP6 (Fig. 4C) y con el transcrito obtenido *in vitro* a partir de pSINrep19-VP6 (Fig. 4D) se observó la formación de fibras dentro de las células transfectadas. Este patrón fue corroborado transfectando células con un pcDNA que codifica para VP6, en donde se observó esta misma característica (Fig. 4E).

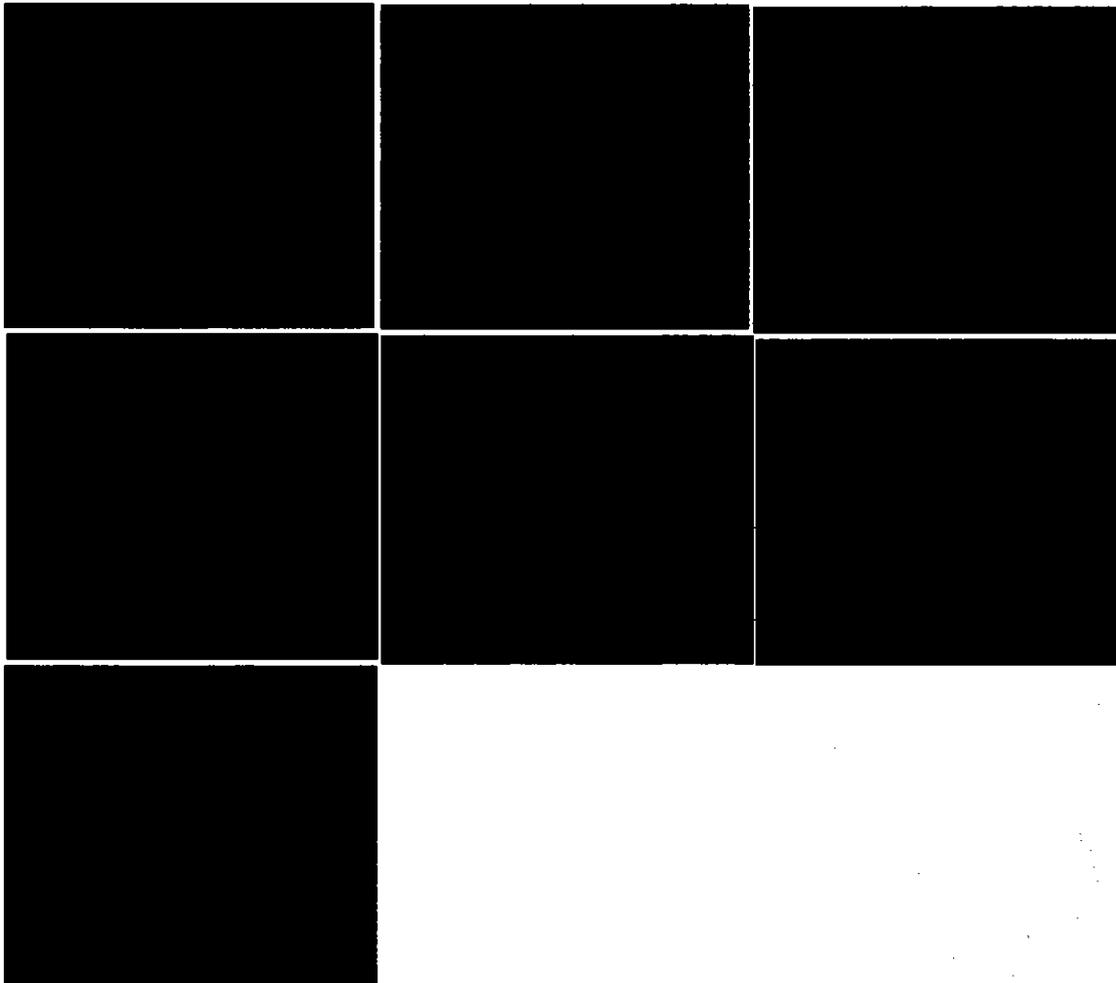
A. Inmunofluorescencias de células BHK-21 transfectadas con los replicones

Figura 4. Inmunofluorescencias de células BHK-21 transfectadas con los replicones de RNA que codifican para las proteínas VP6 y VP2 de rotavirus. (A) Control negativo, células transfectadas con el plásmido pSINrep21. **(B)** Control de transfección, células transfectadas con el plásmido pSINrep21-GFP **(C)** Células transfectadas con el plásmido pSINrep21-VP6 **(D)** Células transfectadas con el transcrito obtenido *in vitro* a partir de pSINrep19-VP6. **(E)** Control positivo, células transfectadas con pcDNA3-VP6 **(F)** Células transfectadas con el plásmido pSINrep21-VP2. **(G)** Control positivo, células transfectadas con el plásmido pcDNA3-VP2. Todas las células se analizaron a las 48 hrs. post transfección, fijadas con paraformaldehído al 4%. La expresión de la proteína VP2 se detectó con un anticuerpo policlonal contra rotavirus anti-EDIM y la proteína VP6 con anti-YM ambos sueros producidos en conejo. Posteriormente fueron revelados con un anticuerpo policlonal anti-IgG's de conejo acoplado a Alexa 488. Las muestras fueron analizadas por microscopia de epifluorescencia.

B. Western blot.

Con la finalidad de determinar que las proteínas detectadas por inmunofluorescencia correspondían a proteínas completas de rotavirus, se realizaron ensayos de Western blot de lisados de células transfectadas con los replicones. Para enriquecer la población de células transfectadas, se utilizó puromicina como medio de selección, agregando 5 µg/ml al medio de cultivo. Utilizando anticuerpos policlonales, en donde para el caso de VP6 clonado en ambos replicones, se observa un banda de 45 kDa (Fig. 5A y 5B) que corresponde en peso a la proteína del virus usado como control. Este virus se obtuvo a partir de un lisado de células MA104 infectadas. En las células transfectadas con el plásmido pSINrep21-VP2, se detecta una banda de aproximadamente de 102 kDa además de tres bandas de menor peso, de aproximadamente 94, 85 y 77 kDa, se consideran como productos de degradación de la proteína al momento del procesamiento de la muestra (Fig. 5). Estos productos ya han sido caracterizados y reportados anteriormente por Zeng y *cols.* en 1994.

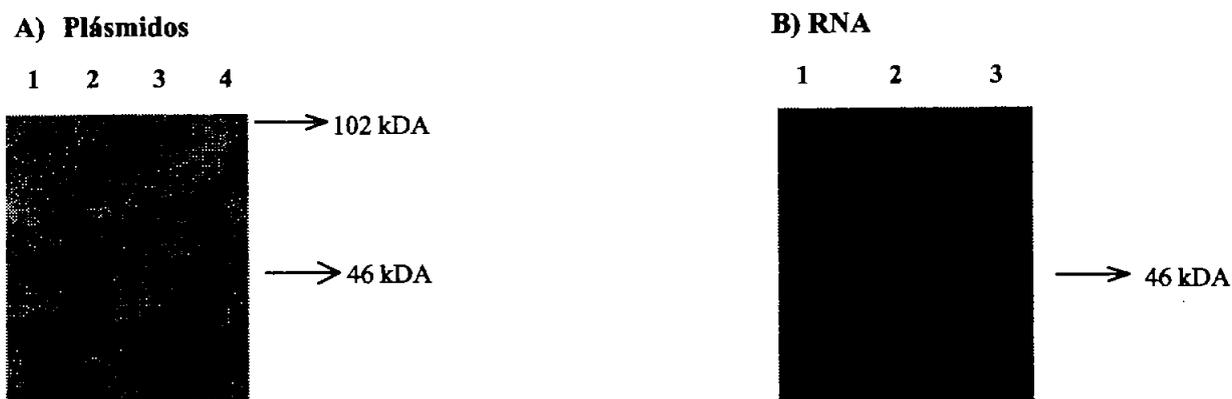


Fig. 5. Western Blot de células transfectadas por electroporación con los replicones de RNA pSINrep21, pSINrep21-VP2, pSINrep21-VP6 y pSINrep19-VP6. Las células fueron seleccionadas con puromicina 5 µg/ml, durante aproximadamente 7 días A) Western blot de células transfectadas por electroporación con pSINrep21-VP2. En el carril 1A control positivo RRV purificado, en el carril 2A células transfectadas con el replicón pSINrep21, el carril 3A corresponde a células transfectadas con pSINrep21-VP2 y el carril 4Aa células transfectadas con pSINrep21-VP6 B) Células transfectadas por electroporación con el RNA obtenido *in vitro* a partir del replicón pSINrep19-VP6. En el 1B, control positivo, lisado de células MA104 infectadas con RRV, en el carril 2B células transfectadas con el transcrito del plásmido pSINrep19 como control negativo, en el carril 3 células transfectadas con el transcrito del plásmido pSINrep19-VP6.

6.3 Expresión de la proteína VP6 en tejidos de ratones inoculados intramuscularmente e intrarrectalmente con el replicón pSINrep21-VP6.

Con base a los resultados obtenidos en células BHK-21 en cultivo, y con la finalidad de determinar si los replicones de RNA eran capaces de dirigir la expresión de las proteínas virales *in vivo* en los tejidos de los ratones inoculados por las vías de inmunización i.m. e i.r., se eligió el plásmido pSINrep21-VP6.

Se realizaron cortes histológicos de recto y de músculo de ratones inoculados i.r. o i.m. respectivamente, y mediante inmunofluorescencia utilizando anticuerpos policlonales contra rotavirus, se detectó la expresión de la proteína VP6. Por ambas vías se detectó la expresión de la proteína VP6, corroborando así, la funcionalidad de estos replicones de RNA *in vivo*. (Figs. 6 y 7). En los cortes de músculo, no hay una gran cantidad de fibras expresando VP6, sin embargo, la síntesis de VP6 es muy clara con respecto al control negativo, en donde se inoculó el plásmido pSINrep21. A diferencia del músculo, en el intestino se observa una mayor expresión de VP6, concentrado en regiones que al parecer corresponden a órganos linfoides asociados a mucosas. Como control positivo, se realizaron cortes de intestino delgado, específicamente de íleon de un ratón infectado con 10^5 pff de rotavirus murino de la cepa EDIM, al día 3. Se observó una gran destrucción celular, así como una gran cantidad de antígeno viral (Fig. 7A).

A. Expresión de la proteína VP6 en músculo de ratones inoculados intramuscularmente con el plásmido pSINrep21-VP6.

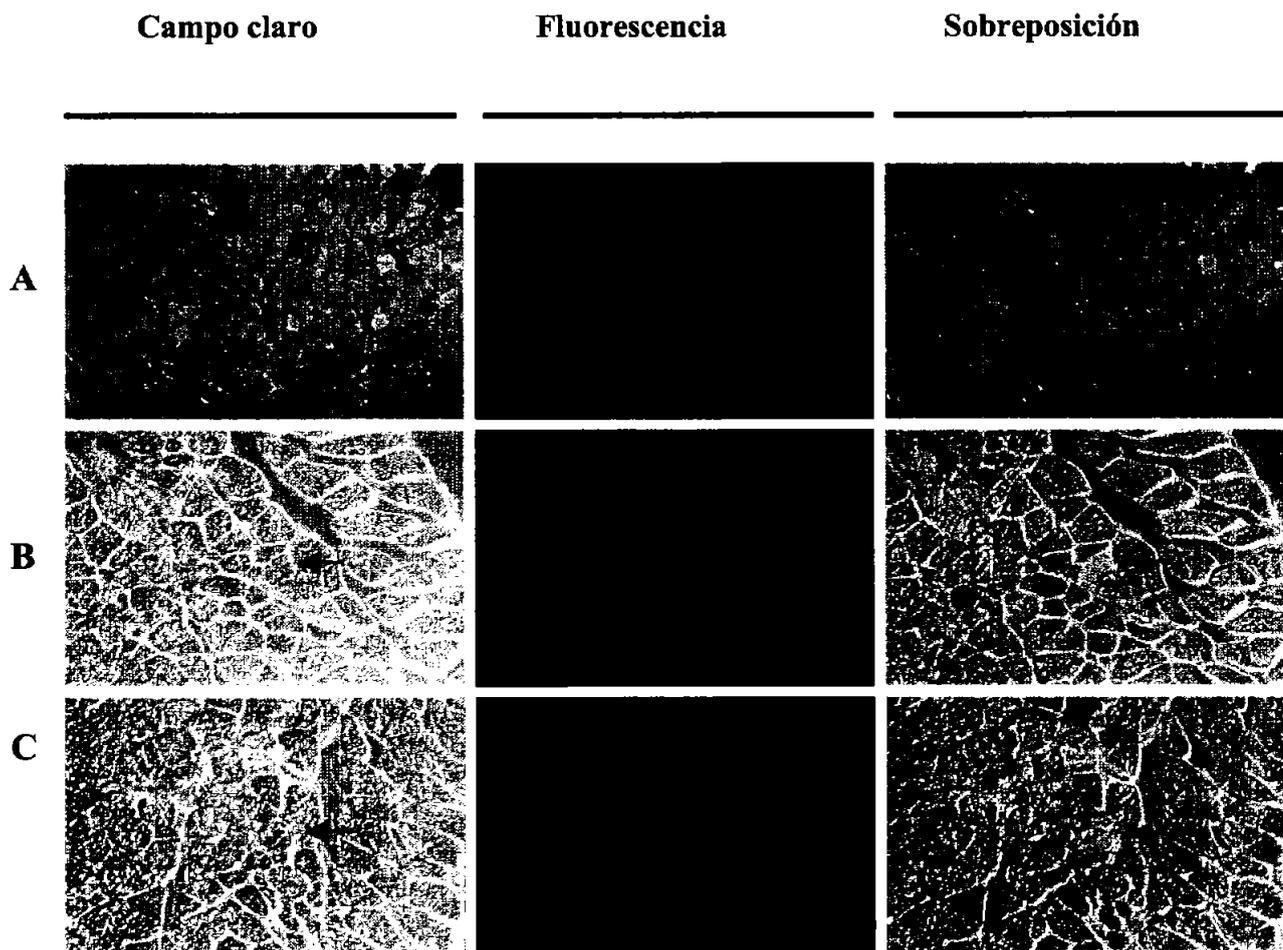


Fig.6. Expresión *in vivo* del replicón pSINrep21-VP6 en cortes de transversales de 10 μ m de grosor en el músculo de ratones inoculados i.m. A. Control negativo, de músculos cuádriceps de ratones inoculados con 25 μ g de pSINrep21. B y C. Cortes transversales de músculos cuádriceps de ratones inoculados i.m. con 25 μ g del plásmido pSINrep21-VP6. La proteína VP6 fue detectada con un anticuerpo policlonal anti-EDIM y como anticuerpo secundario anti-IgG's de conejo acoplado a Alexa 647.

B. Expresión de la proteína VP6 en intestino de ratones inoculados intrarrectalmente con el plásmido pSINrep21-VP6.

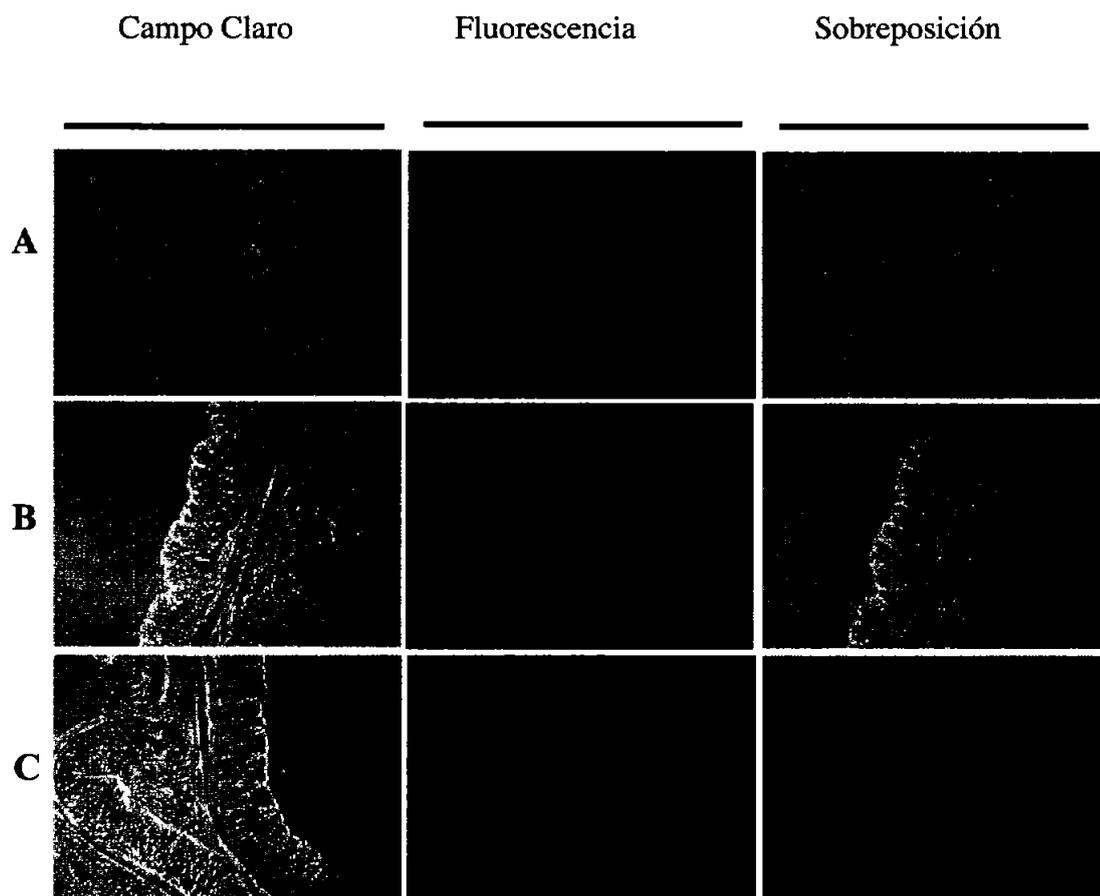


Fig. 7. Expresión *in vivo* del replicón pSINrep21-VP6 en cortes sagitales de 10 µm el intestino de ratones inoculados i.r. A. Control positivo, cortes de íleon infectado con rotavirus silvestre EDIM (10^5 uff) al día 3 post-infección. **B.** Cortes sagitales de recto de ratones inoculados con 20 µg del plásmido pSINrep21. **C.** Cortes de recto de ratones inoculados i.r. con 20 µg del plásmido pSINrep21-VP6. La detección de la proteína se hizo con un anticuerpo policlonal anti-EDIM como anticuerpo primario y anti-IgG's de conejo acoplado a Alexa 647 como anticuerpo de detección.

6.4 Ensayos de protección en ratones inoculados intramuscularmente con los replicones de RNA.

Para realizar los ensayos de protección en el modelo de ratón, se utilizaron dos vías de inoculación, una parenteral i.m. y una vía mucosa i.r. Ambas vías fueron evaluadas previamente mediante cortes histológicos de ratones inoculados, en donde aparentemente el replicón pSINrep21-VP6 es capaz de expresar la proteína VP6.

Para determinar la capacidad de los replicones de RNA de inducir una respuesta inmune contra rotavirus por las vías de inmunización ya mencionadas, se evaluaron dos parámetros. El primero, fue medir la respuesta humoral determinando la producción de anticuerpos específicos contra las proteínas virales, tanto en suero como en intestino de ratones inmunizados antes del reto, y el segundo parámetro fue establecer el grado de protección. Para ello, se determinó la cantidad de antígeno viral excretado en las heces de ratones inmunizados con los replicones de RNA que codifican para las proteínas VP2 y VP6 y de los ratones inmunizados con el replicón vacío, y posteriormente fueron retados con un rotavirus homólogo de la cepa EDIM, de dos a tres semanas después de la última inoculación.

El protocolo de inoculación i.m para las construcciones pSINrep21-VP2 y pSINrep21-VP6 se llevo a cabo de la siguiente manera. Se inocularon inicialmente 25 μ g de plásmido por cuádriceps y las dos inoculaciones subsecuentes fueron de 12.5 μ g por músculo, posteriormente los ratones fueron retados con un rotavirus murino de la cepa EDIM.

Con lo que respecta a la respuesta humoral antes del reto, en todos los ratones se generó un alto título de anticuerpos (Fig. 8A y 9A), en donde los ratones del grupo control, inmunizados con el plásmido vacío, presentaron un título alto de anticuerpos inespecíficos, el cual es mucho más evidente en el ensayo de los ratones inmunizados con el replicón pSINrep21-VP6 (Fig. 9A). A diferencia del ensayo con el replicón pSINrep21-VP2, en donde se observó una mayor producción de anticuerpos de los ratones inmunizados con el replicón que codifica para VP2 con respecto a los ratones del grupo control inmunizados

con el plásmido vacío. En ninguno de los casos se observó un aumento en la producción de IgA's intestinales antes del reto (Fig. 8B y 9B), ni una potenciación en la producción de anticuerpos intestinales post-reto con respecto a los ratones control. Como control positivo, para medir la respuesta humoral, se utilizó suero de ratones previamente inmunizados con el rotavirus murino de la cepa EDIM, así como algunos sueros de ratones vacunados i.m. con el plásmido pcDNA3-VP6, el cual es capaz de inducir la producción de anticuerpos específicos. Estos sueros dan un valor de alrededor de 1.2 de absorbancia en una dilución 1:50 a 492 nm. El control negativo para estos ensayos fue un suero de ratón preinmune, el cual da una lectura de 0.1-0.2 bajo las mismas condiciones. En los ensayos de protección, no se observó un efecto significativo sobre la replicación viral para ninguno de los dos replicones de RNA pSINrep21-VP2 y pSINrep21-VP6 inoculados i.m. (Fig. 8C y 9C).

A. Ensayos de protección contra rotavirus EDIM en ratones BALB/c inoculados intramuscularmente con el replicón de RNA pSINrep21-VP2.

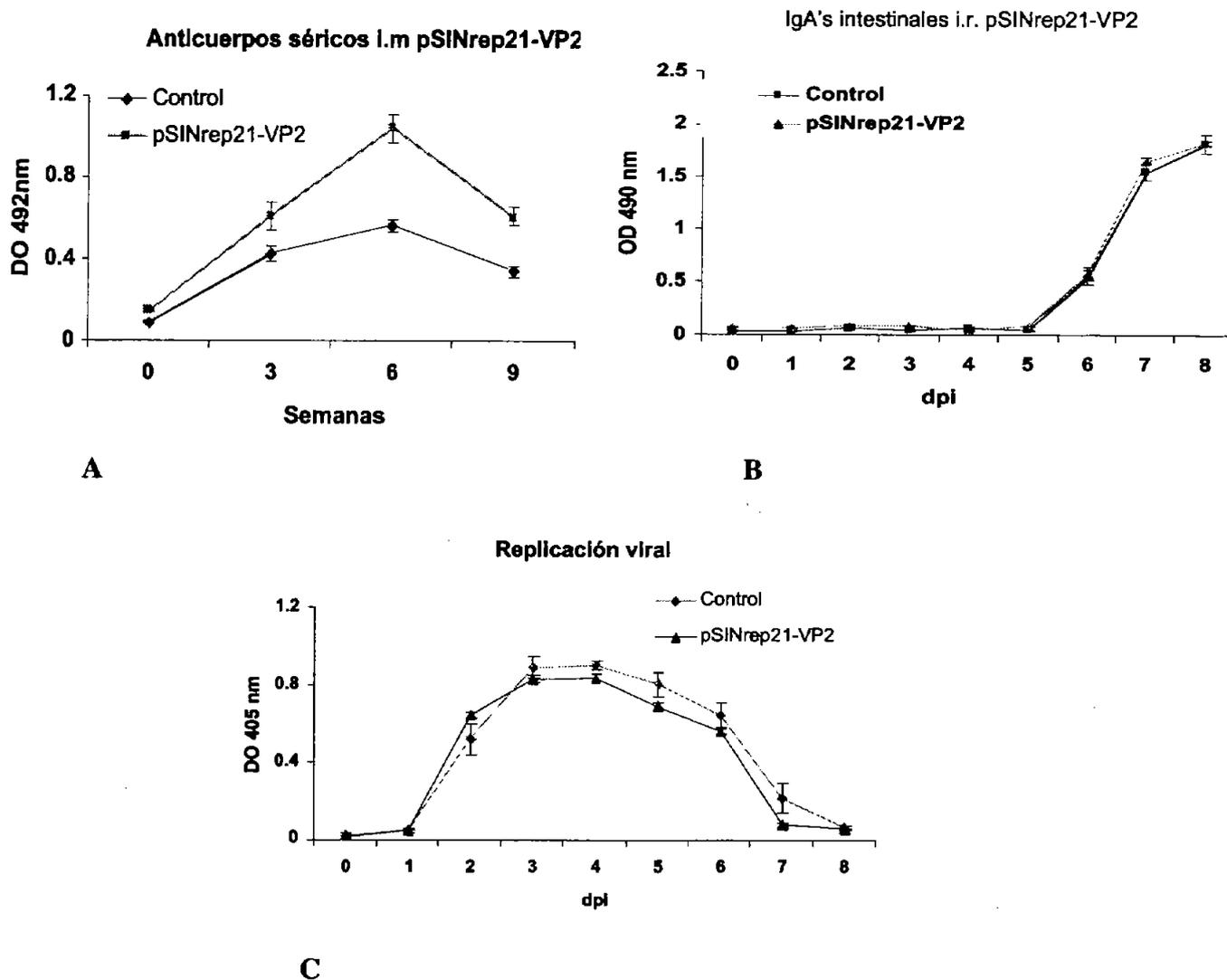


Figura 8. Ensayo de protección inmunizando vía i.m pSINrep21-VP2. A. Título de anticuerpos séricos anti-rotavirus pre-retro, las muestras fueron colectadas antes de cada inoculación B. Título de anticuerpos IgA's anti-rotavirus en heces, post-retro. C. Antígeno viral excretado en heces post-retro. dpi, días post-infección.

B. Ensayos de protección contra rotavirus EDIM en ratones BALB/c inoculados intramuscularmente con el replicón de RNA pSINrep21-VP6.

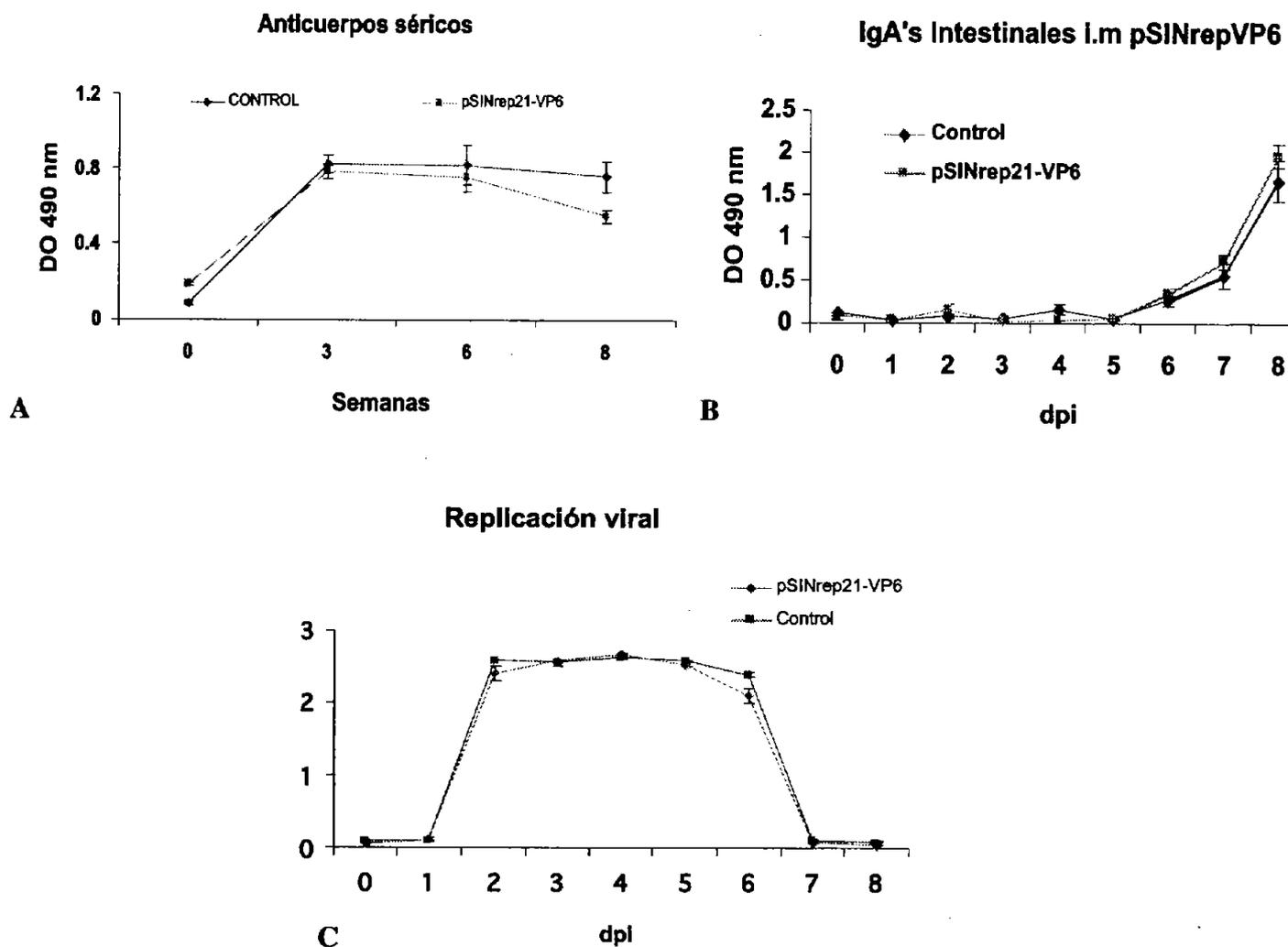


Figura 9. Ensayo de protección vía i.m pSINrep21-VP6. A. Título de anticuerpos séricos anti-rotavirus pre-reto, las muestras fueron colectadas antes de cada inmunización. B. Título de anticuerpos IgA's anti-rotavirus en heces post-reto. C. Antígeno viral excretado en heces post-reto. dpi, días post-infección.

6.5 Ensayos de protección en ratones inoculados intrarrectalmente con los replicones de RNA pSINrep21-VP2 y pSINrep21-VP6.

El protocolo de inmunización por la vía i.r. consistió de tres inmunizaciones de 20 µg de plásmido cada una. Para la respuesta inmune humoral, el plásmido pSINrep21-VP2 i.r., al parecer indujo un ligero aumento en la producción de anticuerpos séricos pero muy inferior al los detectados en la inoculación i.m. (Fig. 10A). No se observó producción de IgA's intestinales antes del reto (Fig. 10B). Al desafiar a los ratones con el rotavirus murino, no se observó ningún efecto sobre la replicación viral (Fig. 10C).

En el caso del plásmido pSINrep21-VP6 inoculado i.r., no se detectó la producción significativa de anticuerpos séricos (Fig. 11) ni de IgA's intestinales antes del reto, ni una potenciación en la producción de IgA's intestinales post-reto (Fig. 12B, D, E). En el ensayo de protección, se observó una ligera tendencia de reducción en la replicación viral (Fig. 12A, C, F), en donde la reducción en el día 2 es significativa para las tres experimentos independientes realizando un análisis de varianza (ADEVA), sin embargo, este efecto no es suficiente para eliminar o al menos disminuir la infección, ni para resolverla en menor tiempo a pesar de que en los ensayos de expresión de la proteína *in vivo* en intestino se observó una gran cantidad de proteína sintetizada (Fig. 7).

A. Ensayos de protección contra rotavirus EDIM en ratones BALB/c inoculados intrarrectalmente con el replicón pSINrep21-VP2.

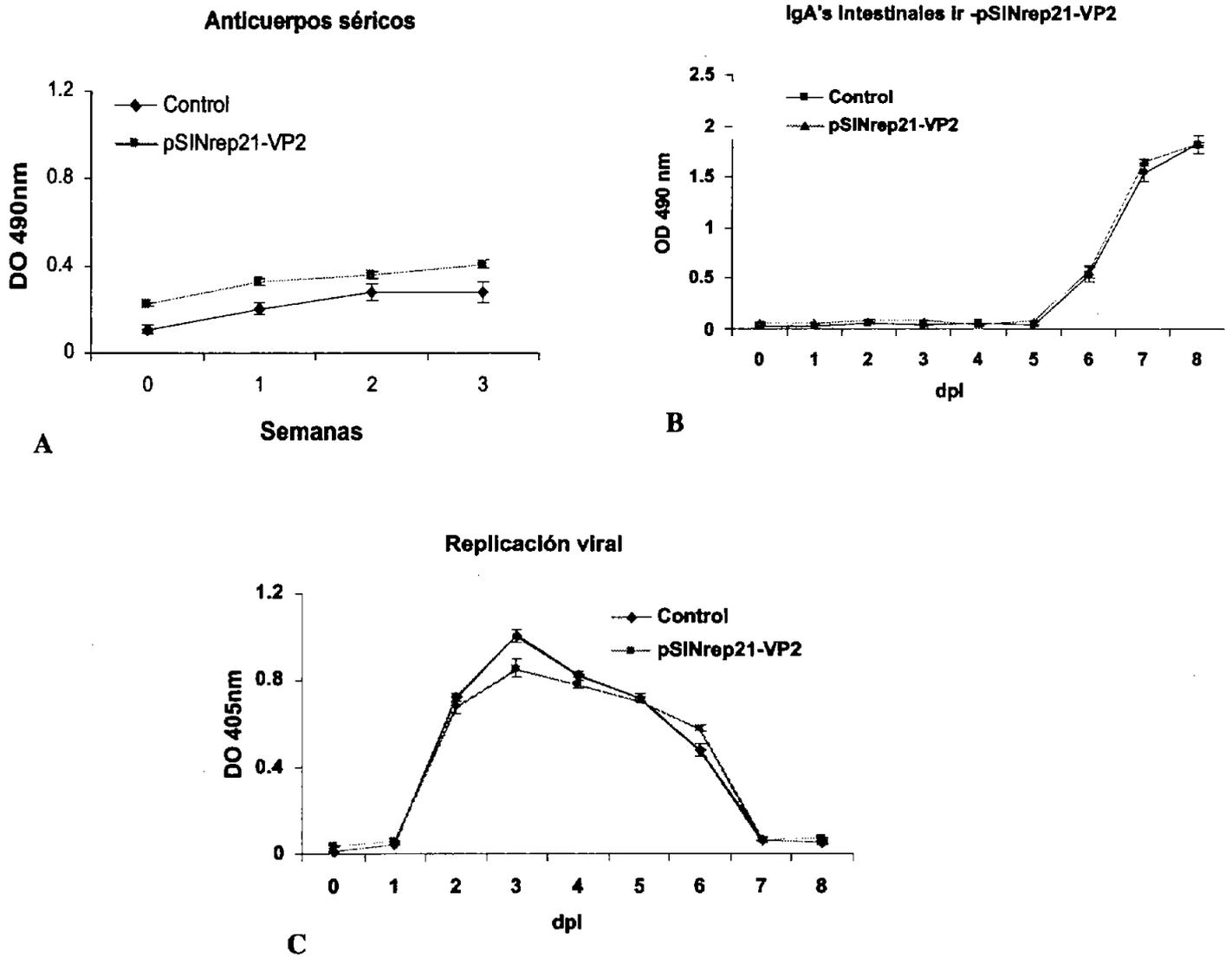


Figura 10. Ensayo de protección vía i.r. pSINrep21-VP2. A. Título de anticuerpos séricos anti-rotavirus, los sueros fueron colectados antes de cada inmunización. B. Título de anticuerpos IgA's anti-rotavirus en heces post-reto. C. Antígeno viral excretado en heces post-reto. dpi días post-infección.

B. Ensayos de protección contra rotavirus EDIM en ratones BALB/c inoculados intrarrectalmente con el replicón pSINrep21-VP6.

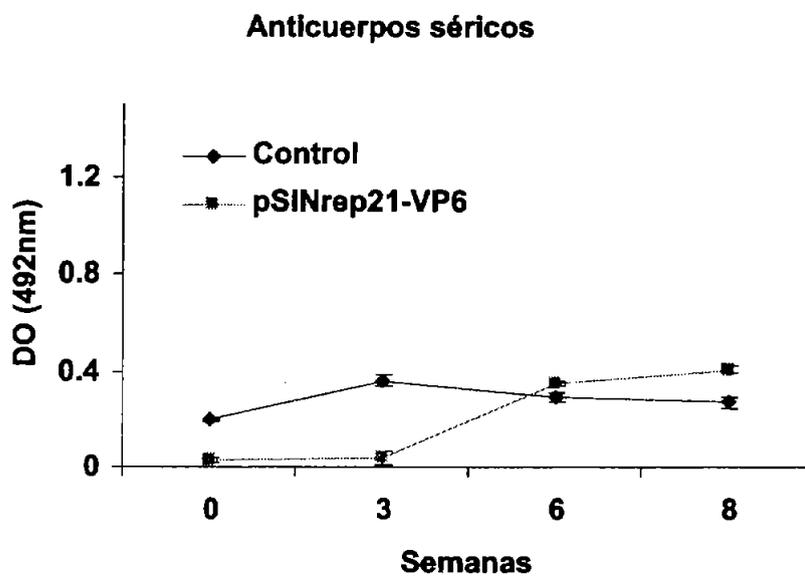


Fig.11. Título de anticuerpos séricos anti-rotavirus de ratones inoculados i.r. con el plásmido pSINrep21-VP6. Los sueros fueron colectados antes de cada inoculación y analizados por ELISA. Como control positivo se utilizó un suero de ratón inmunizado con el rotavirus EDIM (dato no mostrado).

C. Ensayos de protección contra rotavirus EDIM en ratones BALB/c inoculados intrarrectalmente con el replicón pSINrep21-VP6.

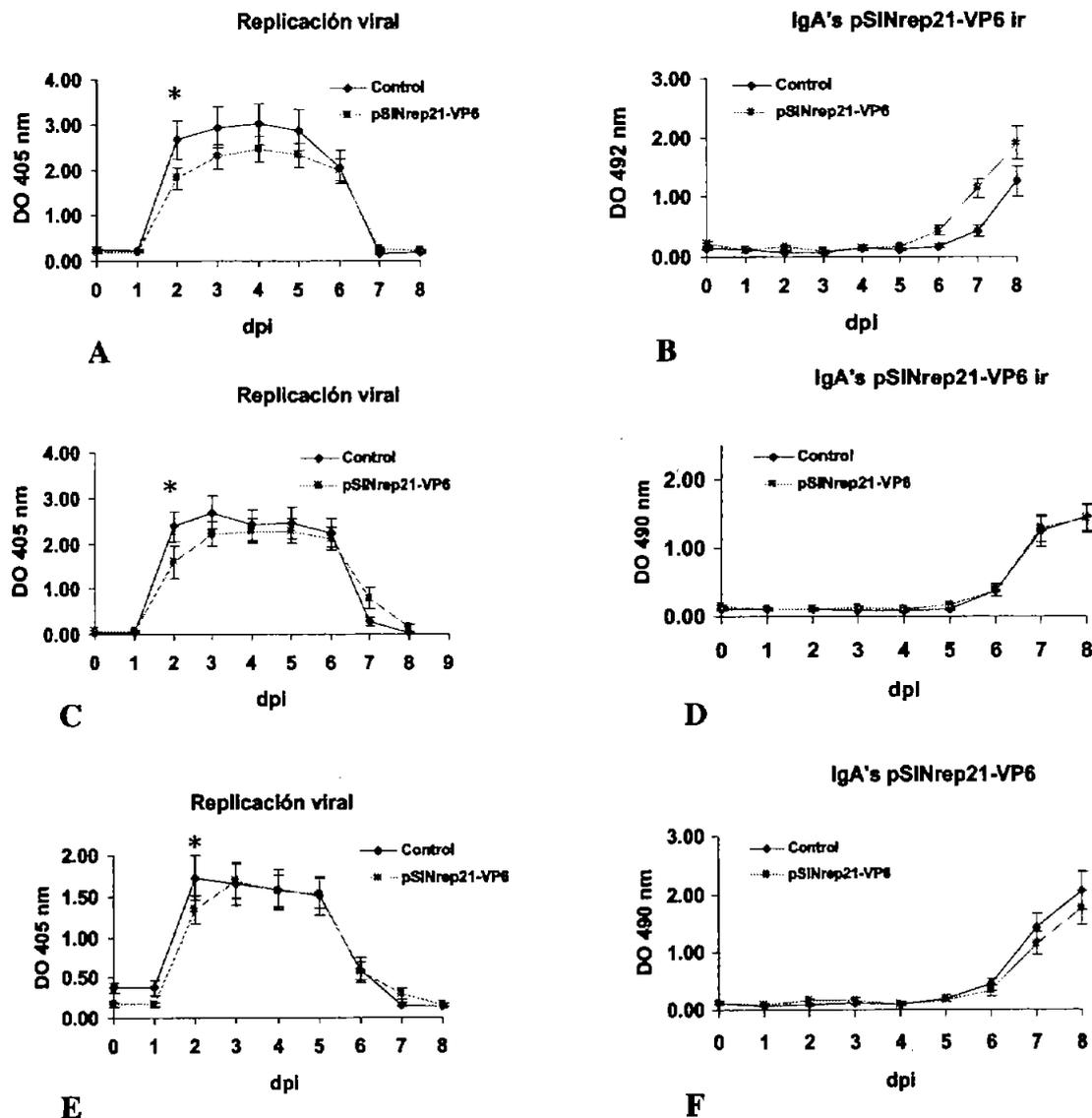


Fig. 12. Ensayos de protección pSINrep21-VP6 i.r. A, C, E. Replicación viral en heces post-reto. B, D, F. Título de anticuerpos IgA's anti-rotavirus en heces post-reto. *Reducción significativa (ADEVA) ($P > 0.001$).

6.6 Ensayos de protección en ratones inoculados intrarrectalmente con los replicones de RNA retados con un rotavirus heterólogo.

El ratón adulto es susceptible a la infección por rotavirus homólogos y heterólogos, la infección es asintomática en ambos casos, sin embargo, la infección con virus heterólogos, es decir de otra especie, se lleva a cabo de una manera naturalmente atenuada, por lo que la replicación viral es menor que la de un virus murino (Burns et al., 1995).

Con la finalidad de detectar un mayor grado de protección con el protocolo de inmunización vía i.r. utilizando pSINrep21-VP6, se realizó un solo ensayo utilizando una cepa de rotavirus heterólogo, en este caso RRV que es una cepa que infecta simios y tiene una replicación menor en el modelo del ratón. Bajo este protocolo de infección, si fue posible observar un efecto de disminución en la replicación viral, sin embargo, este resultado no es concluyente, ya que se requiere mayor número de repeticiones del mismo (Fig. 13) para determinar el efecto observado.

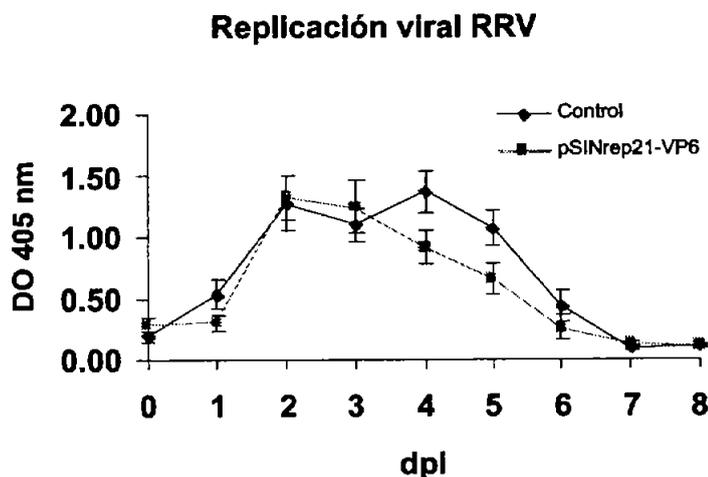


Fig. 13. Ensayo de protección retando con un rotavirus heterólogo de simio RRV. Antígeno viral excretado en heces post-reto. dpi = días post-reto

VII. DISCUSION.

Uno de los problemas para generar una vacuna efectiva contra rotavirus ha sido la existencia de cuatro serotipos de importancia epidemiológica para el humano, por lo que uno de los objetivos principales es el diseño de una vacuna capaz de generar una protección heterotípica contra la infección. El aprovechamiento de las técnicas moleculares permite explorar nuevas estrategias de vacunación utilizando vectores de expresión que codifiquen para los determinantes antigénicos de mayor relevancia presentes en la partícula viral. Dentro de las nuevas estrategias en el desarrollo de vacunas, utilizando tecnología recombinante, es el uso de replicones de RNA, el cual se ha visto incrementado en los últimos años principalmente para la generación de una respuesta inmune protectora contra tumores, y para algunos patógenos.

Los resultados con el uso de replicones de RNA han sido variables y con estrategias de inmunización muy diferentes, tanto por vía parenteral como por vía mucosa, que van desde el uso de plásmidos que codifican para un RNA autorreplicativo, RNA autorreplicativo desnudo obtenido mediante transcripción *in vitro*, así como el uso de partículas de replicones virales (VRP) generadas en cultivo celular (Kamrud, 1999).

En el presente trabajo se evaluó la capacidad de replicones basados en el virus Sindbis para generar una respuesta inmune protectora contra la infección por rotavirus en un modelo de ratón adulto. Se utilizaron dos diferentes replicones, pSINrep19 y pSINrep21. Estos vectores codifican para las cuatro proteínas no estructurales del virus Sindbis. Estas proteínas denominadas nSP1-nSP4, funcionan como una maquinaria de replicación independiente de las polimerasas celulares, en donde el RNA que se transcribe, se traduce en el citoplasma celular. Una vez traducido, este RNA es tomado por la polimerasa viral como templado para generar intermediarios de RNA de polaridad negativa, que a su vez sirven como templado para un segundo RNA mensajero subgenómico. Bajo el promotor de este último, se encuentran codificadas las proteínas heterólogas de interés. Este mecanismo de autorreplicación da como resultado un importante incremento en la expresión de las proteínas codificadas en estos vectores.

Como se menciona anteriormente, la protección heterótípica es una característica importante en el desarrollo de una vacuna contra rotavirus. Por esta razón las proteínas estructurales VP2 y VP6 resultan ser buenas candidatas para cumplir con este objetivo por las siguientes características: Son las proteínas más abundantes y conservadas en la partícula viral de diferentes cepas, y expresadas en el sistema de baculovirus en células de insecto, son capaces de ensamblarse formando VLPs. Además se ha demostrado que estas pseudopartículas inoculadas parenteralmente y o en mucosas han generado protección parcial y total contra la infección en modelos animales. (O'Neal *et al.*, 1998 y Crawford *et al.*, 1999).

Por otra parte, la proteína VP6 en protocolos de vacunación génica, utilizando plásmidos que codifican para esta proteína, ha dado resultados alentadores. En el laboratorio del Dr. Esquivel, pcDNA-VP6 inoculado intramuscularmente, es capaz de generar alrededor del 30% de protección contra el desafío con rotavirus. Además co-inoculando pcDNA-VP6 y pcDNA-VP2, se encontró que la respuesta inmune protectora se ve potenciada (Arias N., 2002). Otros grupos han reportado altos niveles de protección dependiendo de la vía y del adyuvante utilizado cuando han empleado plásmidos que expresan la proteína VP6, por ejemplo, inoculando DNA mediante la técnica de biobalística en el epitelio anorrectal, se han alcanzando niveles de casi el 100% de protección (Chen , 1999). Por vía intramuscular, este DNA es capaz de generar un protección parcial de manera tanto homotípica como heterotípica en el modelo del ratón (Yang, 2001).

Tomando en cuenta las características de VP2 y VP6, así como la alta inmunogenicidad que ha sido reportada para los replicones de RNA, se construyeron replicones que codifican para dichas proteínas, pSINrep21-VP2 y pSINrep21-VP6.

Con la finalidad de determinar si los replicones eran capaces de dirigir la expresión de las proteínas VP2 y VP6 en células de mamífero, se realizaron inmunofluorescencias en células BHK-21 transfectadas. En el caso de las células transfectadas tanto con el RNA obtenido *in vitro* a partir del plásmido pSINrep19-VP6, como con el plásmido pSINrep21-VP6, la proteína VP6, se observó en forma de filamentos dentro de las células. Este patrón

de expresión por VP6 ya ha sido reportado anteriormente (Nilsson M, 1998) utilizando VRPs del virus Semliki Forest expresando VP6 en células BHK-21 transfectadas. Al parecer la expresión de esta proteína individualmente, genera fibras o filamentos. Por el contrario, en una célula infectada por rotavirus, VP6 se observa estando asociada a VP2 formando estructuras de doble capa (DLPs) que se encuentran en viroplasmatas, regiones en donde se lleva a cabo la replicación viral. Tenemos evidencias recientes de que esta proteína es capaz de generar este tipo de patrón bajo ciertas condiciones de infección. En nuestro laboratorio, se ha observado que en células MA104 infectadas con la cepa RRV, a las cuales se les interfiere la traducción de la proteína NSP5 mediante RNAs de interferencia (iRNAs), VP6 forma filamentos, lo que sugiere que esta proteína requiere de otros elementos que favorezcan la formación de estructuras similares a las encontradas en una infección natural. De no ser así, esta proteína, se polimeriza y forma estos filamentos, que además mediante inmunofluorescencia al parecer no se encuentran asociados a proteínas de citoesqueleto como son actina y tubulina (López T, datos no publicados).

El caso del gen de VP2 clonado en el plásmido pSINrep 21, y expresado en células BHK-21 transfectadas con el replicón, se observa una distribución citoplásmica uniforme por inmunofluorescencia. En contraste, en una infección por rotavirus en células cultivo, VP2 se observa, al igual que VP6, dentro de los viroplasmatas.

La técnica de inmunofluorescencia mostró que los replicones son capaces de dirigir la expresión de las proteínas rotavirales en células de mamífero, sin embargo, mediante esta técnica no es posible comprobar si estas proteínas están completas o si la traducción se está llevando de manera parcial dando lugar a proteínas truncadas. Por esta razón, los pesos moleculares de las proteínas expresada a partir de estos vectores fueron corroborados por Western blot a partir de lisados de células transfectadas.

Para el caso de las células transfectadas con el replicón pSINrep21-VP6 o el transcrito de pSINrep19-VP6, se observó una banda que corresponde al peso de 46 kDa de la proteína VP6 de rotavirus. Al transfectar células con el plásmido pSINrep21-VP2, se observaron cuatro bandas, una de 102 kDa correspondiente a la VP2 completa en el virus, y tres más de

aproximadamente 94, 85 y 74 kDa. Estos productos ya han sido caracterizados con anterioridad por otros grupos, y al parecer son productos de degradación de VP2, ya que agregando inhibidores de proteasas, estas bandas no se observan cuando VP2 es analizada por geles desnaturalizantes (Zeng C, 1994, Labbé *et al.*, 1991). Estos mismos productos de VP2 han sido observados al analizar partículas de doble capa sin genoma, sin embargo cuando estas partículas contienen RNA, los productos ya no son detectables, lo que sugiere que VP2 asociada a RNA viral es protegida de la actividad proteolítica celular (Brussow *et al.*, 1990).

Los resultados anteriores, indican que las proteínas VP2 y VP6 codificadas en los replicones, se sintetizan en células de mamífero. Se intentó cotransfectar las células BHK con ambos replicones, para determinar si era posible la generación de VLPs 2/6 dentro de las células transfectadas bajo este sistema, sin embargo, esto no fue posible debido a las bajas eficiencias de transfección (datos no mostrados). La eficiencia de transfección de los plásmidos que codifican para replicones de RNA, ha sido comparada con la de plásmidos convencionales. Paradójicamente los niveles de expresión de genes reporteros, son relativamente más bajos con plásmidos que codifican para replicones que con plásmidos convencionales. Estos resultados sugieren que el transporte de los plásmidos que codifican para los replicones al núcleo, es ineficiente o alternativamente, el transporte de los RNAs transcritos hacia el citoplasma es mucho menos eficiente para los replicones que para plásmidos de menor tamaño (Dubensky, T, 1996).

Una vez comprobada la expresión de los replicones en células *in vitro*, se prosiguió a demostrar la capacidad del replicón pSINrep21VP6 de expresarse en los tejidos de ratones inoculados intramuscularmente e intrarrectalmente. Para demostrarlo, se realizaron cortes histológicos de los tejidos muscular y rectal de ratones inoculados, según fuera el caso, en donde efectivamente se observó la expresión de la proteína VP6 por inmunohistoquímica. En el tejido rectal, se observó acumulación de la proteína al parecer en órganos linfoides que se encuentran asociados a lo largo del recto. La expresión se vio disminuida conforme se aproxima a la región anal, y de manera contraria conforme se avanza a la parte distal del corte, la expresión aumentó. Esta particularidad concuerda con la forma en que se llevó a

cabo la inoculación, ya que la punta se introdujo dentro del recto casi 1 cm de profundidad, lo que nos dice que el plásmido posiblemente sea asimilado por células fagocíticas que posteriormente migran a los órganos linfoides, donde finalmente la proteína es expresada y/o procesada. También se observó señal de la proteína en las microvellocidades del intestino. Este ensayo se llevo a cabo a las 72 hrs post-inoculación, en donde aparentemente hay una gran expresión de antígeno. Como control positivo se realizaron cortes de íleon de un ratón infectado con rotavirus EDIM al día 5 post-infección, en donde se observó una gran cantidad de antígeno viral, así como destrucción de los enterocitos. En el músculo, a diferencia del recto, se observaron muy pocas fibras expresando la proteína, sin embargo, la expresión de VP6 es muy clara, a los 7 días post-inoculación.

Cabe mencionar que aunque estos vectores habían sido evaluados en células en cultivo, nunca se habían probado en modelos animales. Los replicones pSINrep21-VP2 y pSINrep21-VP6 poseen promotor RSV, a diferencia de la mayoría de las vacunas de DNA y de otros replicones de DNA ya probados en modelos animales, los cuales poseen promotor CMV. Este último promotor es mucho más usado con este fin, debido a que tiene la capacidad de expresarse en cualquier célula, ha funcionado con genes reporteros en todas la líneas celulares analizadas. Por las características biológicas de los replicones, esta deficiencia se ve compensada con la autorreplicación que genera una gran cantidad de antígeno, de tal forma que no se considera que esta sea una diferencia significativa para la expresión del antígeno en células animales.

Con base a los resultados obtenidos por el Dr. Esquivel y *cols.* inoculando i.m. pcDNA que codifica para la proteína VP6 y VP2, en donde se induce la producción de anticuerpos séricos específicos y en el caso de VP6, cierto grado de protección en ratones retados con rotavirus, se decidió evaluar esta ruta de inoculación para verificar mediante la producción de anticuerpos específicos, que los replicones eran capaces de inducir una respuesta inmune humoral sistémica capaz de generar protección. La vía i.r. se eligió con la finalidad de generar una respuesta inmune a nivel de mucosa, ya que existe conexión entre diferentes sitios efectores a lo largo de todo el tracto epitelial mucoso. Se ha reportado que las placas de Peyer pueden ser sitios muy eficientes de proliferación de precursores de células B

productoras de IgA's, que posteriormente poblarán órganos linfoides distantes asociados a mucosas, incluyendo lamina propia del tracto respiratorio y viceversa. Esto fue demostrado al inocular VLPs de rotavirus i.n. con los adyuvantes CT y LT, en donde se generó una alta producción de anticuerpos tanto séricos como intestinales, siendo esta una ruta mucho más eficiente que la vía oral o parenteral (O'Neal, 2001).

Los resultados obtenidos por vía i.m. inoculando una dosis inicial de 50 µg y dos subsecuentes de 25 µg del replicón pSINrep21-VP2 y de pSINrep-VP6, no mostraron diferencia entre la replicación viral de los ratones inmunizados con el replicón y los ratones controles inmunizados con el plásmido vacío, ni un aumento en producción de IgA's intestinales antes del desafío con rotavirus. Estos resultados, confirman que las inmunizaciones parenterales (regiones anatómicas no asociadas a mucosas) no son muy eficientes induciendo inmunidad en mucosas. Este protocolo de inmunización no generó protección contra el reto, sin embargo, se observó la presencia de anticuerpos séricos, lo que nos sugiere que si hay activación de células B a nivel sistémico.

Para los ratones inoculados con el replicón pSINrep21-VP2 se observó un aumento en el título de anticuerpos con respecto al grupo control, aunque hay una caída en el título antes del reto, muy probablemente por la falta de activación de las células B por parte de las células transfectadas con los replicones. En los ratones inmunizados con el pSINrep21-VP6, se observó un aumento en el título de anticuerpos, sin embargo, en los ratones del grupo control inoculados con el plásmido vacío, dieron un alto fondo. Este fenómeno ya ha sido reportado con el mismo sistema de replicones inoculados i.m. en cerdos (Boisseson, 2002), en donde al utilizar un plásmido que codifica para un replicón pSIN, que codifica para las glicoproteínas del virus de la pseudorrabia (PRV) encontraron títulos altos de anticuerpos, aún en los cerdos vacunados con el plásmido vacío, en los cuales se indujo, además de la producción de anticuerpos inespecíficos, un nivel alto de protección. Estos hallazgos contrastan con el uso de un vector de DNA convencional, en donde sólo fueron protegidos contra el reto los animales inmunizados con el pcDNA que codifica para las glicoproteínas de PRV.

Una de las razones por las que pudiera estar ocurriendo este fenómeno, es la presencia de secuencias CpG no metiladas en los plásmidos. Se ha descrito que estas secuencias son capaces de inducir una fuerte respuesta inmune del tipo innata a través de la molécula TLR 9 (Boisseson, 2002, Leitner, 2003). Este receptor se expresa principalmente en células B y células dendríticas, así como en fibroblastos y osteoblastos. En ratón, los motivos CpG activan una cascada de señalización en células del sistema inmune principalmente de la respuesta innata, dando como resultado la activación de CPA's, la secreción de Ig polirreactivas por los linfocitos B y la secreción de quimiocinas y citocinas por parte de las células dendríticas, células B, NK (natural killer) y monocitos. Se ha reportado que el reconocimiento de estas secuencias CpG, podrían estar activando de manera diferencial las células del sistema inmune innato (Verthely, 2003). Por otra parte, los estadios de RNA de doble cadena liberados al medio circundante, podrían estar siendo reconocidos a través del TLR 3, también de respuesta innata, siendo estas características potentes adyuvantes dentro de este sistema (Boisseson, 2002, Leitner, 2003). Por lo anterior, se podría estar generando una gran cantidad de anticuerpos policlonales polirreactivos. Por otro lado, no se descarta la posibilidad de que las proteínas no estructurales del virus Sindbis codificadas en los replicones, generen una reacción cruzada contra las proteínas de rotavirus.

Adicionalmente, los replicones inducen apoptosis en las células transfectadas debido a la generación de intermediarios de RNA de doble cadena durante su replicación, activando la respuesta antiviral en las células por la vías PKR y RNAsa L dependientes de RNA de doble cadena (Leitner, 2003). Ambos mecanismos han sido descritos en una infección natural con alfavirus, en donde se midió la autofosforilación de PKR. Esta cinasa una vez activada por el RNAdc, fosforila factores del inicio de la traducción, esto trae como consecuencia que estos factores no puedan ser reciclados y la transcripción de los genes celulares se disminuida de manera drástica. Por otro lado, promueve la liberación de NF- κ B por fosforilación de I κ B, induciendo la muerte celular por apoptosis. La RNAsa L una vez activada, toma como sustrato el RNA, inhibiendo la síntesis de las proteínas celulares y virales, provocando la muerte de la célula. Ambos mecanismos parecen ser inducidos en una infección natural por Sindbis, de tal manera, que los replicones de RNA al conservar su

mecanismo de replicación, mimetizan una infección natural y ambas vías antivirales dependientes de RNAdc son activadas (Ryman, 2002).

La apoptosis tiene consecuencias inmunológicas muy importantes, ya que incrementa la asimilación del antígeno por las CPA's para su procesamiento y presentación por el MHC I activando de esta manera a las células T CD8⁺ (Leitner, 2000). Por lo anterior, la inmunogenicidad y la eficacia de las vacunas de DNA se aumenta mediante el uso de replicones como vectores de expresión, ya que estimulan de manera directa el sistema inmune innato, siendo esta característica un fuerte adyuvante.

Por vía i.r. inoculando tres dosis de 20 µg con el plásmido pSINrep21-VP2 a intervalos de tres semanas, no se detectó la producción de anticuerpos séricos específicos, ni aumento en la producción de IgA's y ningún efecto sobre la replicación viral. Esto sugiere, que la proteína VP2 por si sola bajo este sistema no es capaz de inducir ningún tipo de respuesta inmune contra la infección por rotavirus. Esta proteína al parecer no posee determinantes antigénicos importantes en la protección contra la infección, sin embargo es capaz de potenciar el efecto de VP6 cuando son coadministradas en plásmidos o bien en forma de VLP's.

En cambio, al inocular 20 µg de plásmido replicón pSINrep21-VP6 vía i.r., se observó una ligera tendencia de reducción de la carga viral excretada en los ratones vacunados con respecto a los ratones inoculados con el plásmido vacío. En tres experimento independientes, el día 2 mostró una disminución significativa al hacer un análisis de varianza (ADEVA) ($P < 0.001$) con respecto a los ratones control, sin embargo analizando todos los días de infección, no hubo diferencia significativa entre los ratones vacunados y los ratones control. Debido a que no existe un aumento en las IgA's, ni producción de anticuerpos séricos, se presume que la disminución en la cantidad de virus secretado en los ratones inoculados i.r. con pSINrep21-VP6, es debido a la actividad de células Tc, Th o ambas y no a la actividad de células B.

Cuando en el ratón se utiliza un virus heterólogo, esto es, un rotavirus aislado de una especie diferente al ratón, la infección es menos severa, y es posible observar un mayor efecto en la protección (Offit PA, 1994). Para evaluar si bajo estas condiciones se podía observar algún grado de protección, se realizó un experimento utilizando la cepa RRV (simio) para retar a los ratones inoculados i.r. con pSINrep21-VP6 bajo el mismo protocolo que los anteriores. Como se esperaba, se observó una tendencia de disminución más notable en la replicación viral, sin embargo los resultados son preliminares, por lo que necesario realizar un mayor número de experimentos donde sea posible observar protección heterotípica, ya que como anteriormente se mencionó, VP6 es capaz de proteger contra diferentes serotipos de rotavirus, debido al grado de conservación que mantiene en diferentes cepas.

La falta de respuesta protectora contra la infección en este modelo bajo las vías de inoculación i.m. e i.r., no es clara, ya que al parecer no es un problema de expresión, ni de transfección en los tejidos del ratón. Esto nos lleva a considerar que posiblemente el grado de activación de las células del sistema inmune bajo el sistema de replicones no genera una respuesta inmune adecuada para generar protección en la infección por rotavirus. Lo que se puede concluir del desarrollo de este proyecto es que la respuesta inmune contra la infección por rotavirus es más compleja y multifactorial, por lo que el estudio de los mecanismos por los cuales la infección es eliminada naturalmente por el individuo resulta ser una herramienta muy útil para el desarrollo de vacunas capaces de inducir respuestas rápidas y efectivas contra el virus en una infección primaria, además de generar memoria en el individuo vacunado. Por otro lado, a pesar de que los replicones basados en el virus Sindbis son buenos inductores de actividad celular citotóxica en infecciones virales persistentes o en procesos neoplásicos (Agapov, 1998, Leitner, 2003), en nuestro sistema fueron pobres inductores de respuesta protectora, muy probablemente porque la infección por rotavirus es una infección aguda, no persistente, por lo que el patógeno es eliminado del organismo al poco tiempo de la infección y en donde la actividad citotóxica no parece ser la principal responsable de la eliminación de la infección. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que modificando las condiciones anteriormente utilizadas, así como la

coadministración de pSINrep21-VP2 y pSINrep21-VP6, por otra vía de mucosas, como la intranasal, pueda generar una respuesta protectora efectiva.

VIII. CONCLUSIONES

- Los replicones pSINrep21-VP2 y pSINrep21-VP6, son capaces de dirigir la expresión de las proteínas estructurales VP2 y VP6 de rotavirus en células BHK-21 en cultivo.
- El transcrito obtenido *in vitro*, a partir de la construcción pSINrep19-VP6, es capaz de traducirse y expresar la proteína VP6 en cultivos celulares BHK-21.
- El plásmido pSINrep21-VP6, se expresa *in vivo* en las fibras musculares de ratones inoculados intramuscularmente. De igual manera por la vía intrarrectal, la proteína VP6 se expresa en las células de la región rectal, así como en órganos linfoides asociados a mucosa.
- Bajo las condiciones utilizadas en este proyecto, los replicones pSINrep21-VP2 y pSINrep21-VP6 no indujeron de manera clara una respuesta inmune protectora contra la infección por rotavirus en el modelo del ratón.

IX. PERSPECTIVAS

- La coadministración de replicones de DNA que expresen las proteínas VP2 y VP6 tanto por vía parenteral como por mucosas, podría ser una buena estrategia para generar una respuesta inmune protectora, ya que es probable que coadministrando estas dos proteínas generen VLP's dentro del animal inoculado, lo que aumentaría la inmunogenicidad de la vacuna utilizada. Esto podría lograrse construyendo replicones de RNA bicistrónicos con las proteínas VP2 y VP6, para asegurar que ambas proteínas se expresen dentro de la misma célula transfectada.
- Utilizar otros métodos de inoculación del RNA como por ejemplo lipofección, para aumentar la viabilidad del número de moléculas de RNA por célula y evaluar si la respuesta inmune y la protección inducida por estos vectores se modifica de manera favorable.
- Evaluar otros sitios de mucosas, por ejemplo, intranasal (i.n.), oral e intrarectal (i.r.), con plásmidos que codifiquen para los replicones o bien con RNA desnudo, que codifiquen para las proteínas VP2 y VP6.
- Evaluar inmunizaciones por vía mucosa utilizando VRP's obtenidas en cultivo celular, que codifiquen para las proteína VP2 y VP6.

X. BIBLIOGRAFIA

1. Agapov EV., Folov I., Lindenbach BD., Pragai BM., Schlensinger S., Rice CM., 1998. Noncytopathic Sindbis virus RNA vectors for heterologous gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95(22):12989-12994.
2. Arias CF., López S., 2001. Microbios en línea. <http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/>
3. Arias N., 2002. Vacunas de ADN contra rotavirus en un modelo murino, Tesis de licenciatura. UAEM. 60pp.
4. Baños DM., López S., Arias CF., Esquivel FR., 1997. Identification of a T-Helper Cell Epitope on the Rotavirus VP6 Protein. *Journal of Virology.* 71(1):419-426.
5. Bishop RF., Davison GP., Holmes IH., and Ruck BJ., 1973. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with viral gastroenteritis. *Lancet.* 1281-1283.
6. Bresee JS, Glass RI, Ivanoff B, Gentsch JR, 1998, Current status and future priorities for rotavirus vaccine, development, evaluation and implementation in developing countries. *Vaccine.* 17:2207-222.
7. Burns JW., Siadat-Pajouh M., Krishnaney AA., Greenberg HB., 1995. Protective Effect of Rotavirus VP6-Specific IgA Monoclonal Antibodies that lack Neutralizing Activity. *Science.* 272:104-107.
8. Burns JW, Krishnaney A, Phuoc TV, Rouse RV, Anderson L, Greenberg H, 1994. Analyses of Homologous Rotavirus infection in the Mouse Model. *Virology.* 207:143-153.
9. Brussow H, Bruttin A, Marc-Martin S., 1990. Polypeptide composition of rotavirus empty capsids and their possible use as a subunit vaccine. *Journal of Virology.* 64(8):3635-42.
10. Cara A, Lucarelli E, Cornaglia-Ferraris P., 2000. Engineering viral promoters for gene transfer to human neuroblasts. *Cell Mol Neurobiol.* 20(3):409-15.
11. Clark H, Offit PA, Ellis RW, Eiden JJ, Krah D, Shaw AR, Pichichero M, Treanor JJ, Borian FE, Bell LM, Plotkin SA., 1996. The development of multivalent bovine rotavirus (strain WC3) reassortant vaccine for infants. *J Infect Dis.* 174 Suppl 1:S73-80.

12. Chen SC., Fynan EF., Greenberg H, Herrmann J., 1999. Immunity obtained by gene-gun inoculation of rotavirus DNA vaccine to the abdominal epidermis or anorectal epithelium. *Vaccine*. 17:3171-3176
13. Chen SC, Fynan EF, Robinson HL, Lu S, Greenberg HB, Santoro JC, Herrmann JE., 1997 Protective immunity induced by rotavirus DNA vaccines. *Vaccine*. 15(8):899-902.
14. Chen SC, Jones DH, Fynan EF, Farrar GH, Clegg JC, Greenberg HB, Herrmann JE. 1998. Protective immunity induced by oral immunization with a rotavirus DNA vaccine encapsulated in microparticles. *Journal of Virology*. 72(7):5757-61.
15. Cheng WF., Hung CF., Chai CY., Hsu KF., He L., Ling M., Wu TC., 2001. Enhancement of Sindbis virus Self. Replicating RNA Vaccine Potency by Linkage of Herpes Simplex Virus Type 1 VP22 Protein to Antigen. *Journal of Virology*. 75(5):2368-2376.
16. Choi AH., Basu M, McNeal MM., Flint J., VanCott JL., Clementes JD., Ward RL., 2000. Functional mapping of protective domains and epitopes in rotavirus VP6 protein. *Journal of Virology*. 74 (24) 11574-11580.
17. Choi AH., Basu M., Rae MN., McNeal., Ward RL., 1998. Particle-Bombardement-Mediated DNA Vaccination with rotavirus VP4 or VP7 induce high levels of serum rotavirus IgG but fail to protect mice against challenge. *Virology*. 250:230-240.
18. Choi AH, Knowlton DR, McNeal MM, Ward RL., 1997. Particle bombardment-mediated DNA vaccination with rotavirus VP6 induces high levels of serum rotavirus IgG but fails to protect mice against challenge. *Virology*. 232(1):129-38.
19. Choi AH., McNeal M., Flint J., Basu M., Lycke N., Clements J., Bean J., Davis H., McCluskie M., VanCott J., Ward RL., 2002. The level of protection against rotavirus shedding in mice following immunization with a chimeric VP6 protein is dependent of route and the coadministered adjuvant. *Vaccine*.20:1733-1740.
20. Coffin SE, Moser C, Cohen S, Clark Hf, Offit PA, 1997. Immunologic correlates of Protection against Rotavirus Challenge after Intramuscular Immunization of Mice. *Journal of Virology*. 71(10):7851-7856.

21. Cornil IS., Benureau Y., Greenberg H., Hemdrockson B. A., Cohen J., 2002. Heterologous Protection Induced by the Inner Capside Proteins of Rotavirus Requires Transcytosis of Mucosal Immunoglobulins. *Journal of Virolog.* 76(16):8110-8117.
22. Crawford SE, Estes MK, Ciarlet M, Barone C, O'Neal CM, Cohen J, Conner ME. 1999. Heterotypic protection and induction of a broad heterotypic neutralization response by rotavirus-like particles. *Journal of Virology* 73(6):4813-22.
23. Dufour V., De Boissesson C., 2003. Use of a sindbis virus DNA-based expression vector for induction of protective immunity against pseudorabies virus in pigs. *Veterinary immunology and immunopathology.* 93:125-134.
24. Dubensky TW., Driver DA., Polo JM., Belli BA., Latham EM., Ibanez CE., Chada S., Brumm D., Banks T., Mento SJ., Jolly DJ., Chang SM., 1996. Sindbis Virus DNA-Based expression Vectors: Utility for in vitro and in vivo gene transfer. *Journal of Virology.* 70(1): 508-519.
25. Esquivel F. R., López S., Gutiérrez-X L., Arias C., 2000. The internal rotavirus protein VP6 primes for an enhanced neutralizing antibody response. *Archives of Virology.* 145:813-825.
26. Franco MA and Greenberg HB. 2001. Challenges for Rotavirus Vaccine. *Virology* (281):153-155.
27. Franco MA, Greenberg HB. 1999. Immunity to rotavirus infection in mice. *J Infect Dis.* 179 Suppl 3:S466-9.
28. Feng N., Lawton JA, Gilbert J., Kuklin N., Vo P., Prasad V, Greenberg H, 2002. Inhibition of rotavirus replication by non-neutralizing rotavirus VP6- specific IgA mAb. *The Journal of Clinical Investigation.* 109(9):1203-1213.
29. Feng N, Franco M.A., Greenberg H., 1997. Murine Model of Rotavirus Infection. *Adv Exp Med Biol.* 412:233-240.
30. Fromantin C., Jamot B., Cohen J., Piroth L., Pothier P., Kohli E., 2001. Rotavirus 2/6 Virus-Like Particles Administered Intranasally in Mice, with or without the Mucosal Adjuvants Cholera Toxin and *Escherichia coli* Heat-Labile Toxin, Induce a Th1/Th2-Like Immune Response. *Journal of Virology.* 75(22):11010-11016.

31. Frolov I, Agapov E, Hoffman TA, Bela JR, Lippa ML, Schilensinger S, Rice CM, 1999, Selection of RNA Replicons Capable of Persistet Noncytopathic Replication in Mammalian Cell, *Journal of Virology*, 73(5): 3854-3856.
32. Frolov I., Hoffman TA., Pragai BM., Dryga SA., Huang HV., 1996. Alphavirus-based expression vectors: Strategies and applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:11371-11377.
33. Glass RI, Gentsch JR, Ivanoff B. 1996. New Lesson for Rotavirus Vaccine. *Science* (272):46-48.
34. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. 1999. *Immunology*. 4 ed. Ed. W. H. Freeman and Company. USA. Pag: 427-466
35. Jiang B, Estes M, Barone Ch, Barniak V, O'Neal CM, Ottaiano A, Madore PH, Conner ME, 1999, Heterotypic protection from rotavirus infection in mice vaccinated with virus-life particles, *Vaccine*, (17): 1005-1013.
36. Kamrud KI., Hooper., Elgh F., Schmaljohn CS., 1999. Comparison of the protective efficacy of Naked DNA, DNA-based Sindbis Replicon, and Packaged Sindbis Replicon Vectors Expressing Hantavirus Structural Genes in Hamsters. *Virology*.263:209-219.
37. Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM, Perez-Schael I. 1996. Efficacy of a quadrivalent rhesus rotavirus-based human rotavirus vaccine aimed at preventing severe rotavirus diarrhea in infants and young children. *J Infect Dis.* 174(1):S65-72. Review.
38. Kapikian AZ, 2001, A rotavirus vaccine for prevention of serve diarrhoea of infants and young chidren: development, utilization and withdrawl. *Gastroenteritis Viruses*. John Wiley & SomS. LTD. 143:170.
39. Labbe M, Charpilienne A, Crawford SE, Estes MK, Cohen J., 1991. Expression of rotavirus VP2 produces empty corelike particles. *Journal of Virology*. 65(6):2946-52.
40. Lijuan Y, Iosef C, Azebedo MP, Kim Y, Quian Y, Geyer A, Nguyen TV, Chang K, Saif L., 2001. Protective Immunity and Antibody-Secreting Cell Response Elicited by combined Oral Attenuated Wa Human Rotavirus and Intranasal Wa 2/6-VLPs with Mutant *Escherichia coli* Heat-Labile Toxin in Gnotobiotic Pigs. *Journal of Virology*. 75(19):9229-9238.

41. Leitner WW., Hwang LN., deVeer MJ., Zhou A., Silverman RH., Williams BR., Dubensky TW., Ying H., Restifo NP., 2003. Alphavirus-based DNA vaccine breaks immunological tolerance by activating innate antiviral pathways. *Nature Medicine*. 9(1):33-39.
42. Leitner WW., Ying H., Restifo NP., 2000. DNA and RNA-based vaccines: principles, progress and prospects. *Vaccine*. 18:765-777.
43. Leitner WW., Ying H., Driver DA., Dubensky TW., Restifo NP., 2000. Enhancement of tumor-specific immune response with plasmid DNA. *Cancer Research*. 60:51-55.
44. Mandore P.H., Estes M.K., Zarley C.D., Hu B., Parson S., Digravio D., Greiner S., Smith R., Jiang B., Corsaro B., Barniak V., Crawford S., Conner M.E., 1999. Biochemical and immunologic comparison of virus-like particles for rotavirus subunit vaccine. *Vaccine*. 17:2461-2471.
45. McNeal MM, Barone KS, Rae MN, Ward RL., 1995. Effector functions of antibody and CD8+ cells in resolution of rotavirus infection and protection against reinfection in mice. *Virology*. 214(2):387-97.
46. McNeal MM., Broome R.L., Ward R., 1994. Active Immunity against Rotavirus Infection in Mice is correlated with viral replication and Titers of Serum Rotavirus IgA Following Vaccination. *Virology* 204: 642-650.
47. Midthun K and Kapikian AZ, 1996. Rotavirus Vaccines: an Overview. *Clinical Microbiology Research*, 9(3):423-434.
48. Nilsson M., von Bonsdorff CH., Eclewicz K., Cohen J., Svensson L., 1998. Assembly of viroplasm and virus-like particles of rotavirus by a Semliki Forest virus replicon. *Virology*. 242 (2):255-265.
49. Offit P.S., 1994. Rotaviruses: immunological determinants of protection against infection and disease., *Advances in Virus Research*., 44:161-202.
50. O'Neal CM, Clements JD, Estes MK and Conner ME, 1998, Rotavirus 2/6 virus-like particles administered intranasally with cholera toxin, *Escherichia coli* heat-labile toxin (LT), and LT-R192G induce protection from rotavirus challenge. *Journal of Virology*. 72(4): 3390-3393.

51. O'Neal C., Crawford S.E., Estes M.K., Conner M.E., 1997. Rotavirus Virus-Like Particles administered Mucosally Induce Protective Immunity. *Journal of Virology*. 71(11):8707-8717.
52. Patton JT and Spencer E., 2000. Genome Replication and Packaging of Segmented Double-Stranded RNA Viruses. *Virology*. 277:217-225.
53. Palese P., 1998. RNA virus vectors: Where are we and where do we need to go?. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:12750-12752.
54. Pasare C., Medzhitov R., 2004. Toll-like receptors and acquired immunity. *Semin Immunol.* 16(1):23-6.
55. Perri S., Driver DA., Gardener JJP., Sherrill S., Belli BA., Dubensky TW., Polo JM., 2000. Replicon Vectors Derived from Sindbis Virus and Semliki Forest Virus that establish persistent replication in host cells. *Journal of Virology*. 74(20): 9802-9807.
56. Polo JM., Belli BA., Driver DA., Frolov I., Sherrill S., Hariharan MJ., Townsend K., Perri S., Mento SJ., Jolly DJ., Chang SM., Schlesinger S., Dubensky TW. 1999. Stable alphavirus packaging cell lines for Sindbis-virus and Semliki Forest virus-derived vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96:4598-4603.
57. Pushko P, Geisbert J, Parker M, Jahrling P and Smith Jonathan. 2001. Individual and Bivalent Vaccine Based on Alphavirus Replicons Protect Guinea Pigs against Infection with Lassa and Ebola Viruses. *Journal of Virology*. 75(23):11677-11689.
58. Rottinghaus ST., Poland GA., Jacobson RM., Barr LJ., Roy MJ., 2003. Hepatitis B DNA vaccine induces protective antibody responses in human non-responders to conventional vaccination. *Vaccine* 21:4604-4608.
59. Ryman KD., White LJ., Johnston RE., Klimstra WB., 2002. Effects of PKR/Rnase L-Dependent and alternative antiviral Pathways on Alphavirus Replication and Pathogenesis. *Viral Immunology*. 15 (1):53-76.
60. Schlesinger S., 1999. Alphavirus expression systems-Promises and Problems. *ASM News*. 65(10):688-695.

61. Schwartz-Cornil I, Benureau Y, Greenberg H, Hendrickson BA, Cohen J., 2002. Heterologous protection induced by the inner capsid proteins of rotavirus requires transcytosis of mucosal immunoglobulins. *Journal of Virology*.76(16):8110-8117.
62. Tüting T, Austyn J, Storkus W, Falo L., 2000. The immunology od DNA Vaccines. *DNA Vaccines Methods and Protocols*. Humana Press. 37:64.
63. Ulmer J, Deck R, Dewit C, Donnelly J, Lui M., 1996. Generation of MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes by expression of a viral protein in muscle cells: antigen presentation by non-muscle cells. *Immunology*. 89:59-67.
64. Vajdy M, Gardner J, Neidleman J, Cuadra L, Greer C, Perri S, O'Hagan D., Polo JM., 2001. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag-Specific Vaginal Immunity and Protection after Local Immunization with Sindbis Virus-Based Replicon particles. *The Journal Infectious Diseases*. 184:1613-1616.
65. Verthelyi D, Klinman DM., 2003. Immunoregulatory activity of CpG oligonucleotides in humans and nonhuman primates. *Clin Immunol*. 109(1):64-71.
66. Ward RL., 2003. Possible mechanisms of protection elicited by candidate rotavirus vaccines as determined with the adult mouse model. *Viral immunology*. 16(1):17-24.
67. Wash U Alphavirus Group, 1997, Non-cytopathic Sindbis virus vector, Non-CP SIN vectors, 5:1-15.
68. Xiang ZQ, Ertl HC., A simple method to test the ability of individual viral proteins to induce immune responses. *J Virol Methods*. 47(1-2):103-16.
69. Yang K., Wang S., Chang K., Lu S., Saif L., Greenberg H., Brinker J., Herrmann J., 2001. Immune responses and protection obtained with rotavirus VP6 DNA vaccines given by intramuscular injection. *Vaccine*. 19:3285-3291.
70. Ying H., Zaks TZ., Wang R., Irvine KR., Kammula US., Marincola FM., Leitner WW., Restifo NP., 1999. Cancer therapy using a self-replicating RNA vaccine. *Nature Medicine*. 5(7):823-827.

71. Zarozinski CC, Fynan EF, Selin LK, Robinson HL, Welsh RM. 1995. Protective CTL-dependent immunity and enhanced immunopathology in mice immunization by particle bombardment with DNA encoding an internal viron protein. *J Immunol.* 154(8):4010-4017.

72. Zeng C., Labbé M., Cohen J., Prasad V., Chen D., Raming R., Estes M., 1994. Characterization of rotavirus VP2 particles. *Virology.* 201:55-65.