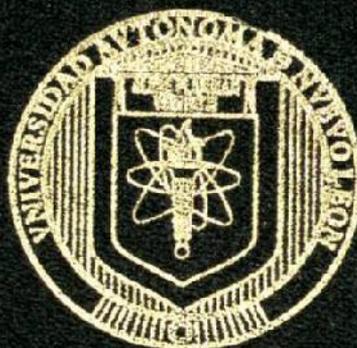


**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**"BASES MOLECULARES DE LA RESPUESTA  
INMUNE EN UNA INFECCION NATURAL  
POR ROTAVIRUS"**

**TESIS  
QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD  
EN MICROBIOLOGIA**

**PRESENTA  
M.C. JUAN FRANCISCO CONTRERAS CORDERO  
SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.      ABRIL DEL 2003**

TD  
RJ456  
.D5  
C6  
2003  
c.1



1080124441

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE LEÓN  
INSTITUTO DE CIENCIAS QUÍMICAS  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



"EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA  
INMUNE LEIDIVA A INFECCIÓN NATURAL  
POR ROTAVIRUS"

TESIS  
QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD  
EN MICROBIOLOGÍA

PRESENTA  
M.C. JUAN FRANCISCO CONTRERAS CORDERO  
SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.      ABRIL DEL 2008

TD

RS456

:DS

CG

2003



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**“BASES MOLECULARES DE LA RESPUESTA INMUNE EN UNA  
INFECCIÓN NATURAL POR ROTAVIRUS”**

**TESIS**

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA**

**PRESENTA**

**M.C. JUAN FCO. CONTRERAS CORDERO**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



**"BASES MOLECULARES DE LA RESPUESTA INMUNE EN UNA  
INFECCIÓN NATURAL POR ROTAVIRUS"**

TESIS

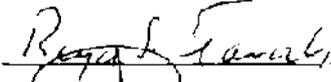
QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR  
EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA

PRESENTA

**M.C. JUAN FCQ. CONTRERAS CORDERO**

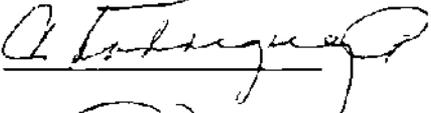
COMISIÓN DE TESIS

PRESIDENTE: DR. REYES S. TAMEZ GUERRA

  
\_\_\_\_\_  


SECRETARIO: DR. BENITO PEREYRA ALFÉREZ

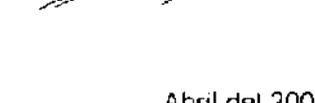
VOCAL: DRA. CRISTINA RODRÍGUEZ PADILLA

  
\_\_\_\_\_  


VOCAL: DRA. DIANA RESÉNDEZ PÉREZ

  
\_\_\_\_\_  


VOCAL: DR. JOSÉ SANTOS GARCÍA ALVARADO

  
\_\_\_\_\_  


**ÍNDICE**

<b>DEDICATORIA</b>	<b>I</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>II</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS</b>	<b>III</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>1</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>ANTECEDENTES</b>	<b>7</b>
Generalidades	7
Estructura y moléculas de rotavirus	8
Genes y proteínas de superficie de rotavirus	10
Propiedades antigénicas de las proteínas de rotavirus	13
Proteína VP6	14
Proteína VP7	15
Proteína VP4	19
Epidemiología molecular	22
Vacunas	25
Inmunidad	29
<b>OBJETIVOS</b>	<b>34</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODO</b>	<b>35</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>48</b>
Electroferotipos	49
Relación Genotipo – Electroferotipo	51
Genotipo – SSCP	56
Serotipos	59
Caracterización de epítopes	62
Respuesta inmune	66
<b>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</b>	<b>73</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>80</b>

## **DEDICATORIA**

### **A MIS PADRES:**

**SR. NICOLÁS CONTRERAS GODINA  
SRA. JUANA CORDERO DE CONTRERAS**

**Por su ejemplo de seguir siempre adelante**

### **A MIS HERMANOS:**

**GABRIEL, JOSÉ HERIBERTO, JULIO, JESÚS, GUADALUPE, LETICIA Y  
MARTHA ELVA**

**Porque cada logro de cualquiera de nosotros es un logro propio**

### **A MI ESPOSA:**

**TERESA DE JESÚS ARAIZ DE CONTRERAS**

**Y**

### **A MI HJA:**

**LUZ ANGÉLICA CONTRERAS ARAIZ**

**Porque gracias al apoyo que me han brindado pude dedicarle el  
tiempo a esta investigación, tiempo que inclusive era de ellas.**

## **AGRADECIMIENTOS**

Un trabajo de investigación siempre requiere un gran esfuerzo y no culmina si no existe ese valioso apoyo que ofrecen nuestra Institución, nuestros asesores y nuestros amigos. Por tal motivo aprovecho esta oportunidad que me brinda la vida para agradecer en todo lo que vale

**A LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, U.A.N.L.** Gracias, por la oportunidad que me brindó para subir otro escalón en mi formación académica.

**AL LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA Y VIROLOGÍA.** Gracias, porque su dinámica de trabajo contagia a todos los que formamos parte de este laboratorio.

**AL DR. REYES S. TAMEZ GUERRA** Maestro y Amigo. Gracias por su dedicación e impulso para el desarrollo de este trabajo.

**A LA DRA. CRISTINA RODRÍGUEZ PADILLA.** Gracias, por sus valiosos comentarios y su gran disponibilidad para la realización de esta tesis.

**AL DR. BENITO PEREYRA ALFÉREZ.** Gracias, por sus valiosas sugerencias en la revisión de esta tesis.

**A LA DRA. DIANA RESÉNDEZ PÉREZ.** Gracias, por la dedicación y gran interés en la revisión del presente manuscrito.

**AL DR. JOSÉ SANTOS GARCÍA ALVARADO.** Gracias, por sus comentarios y sugerencias en la realización de esta tesis.

**AL DR. CARLOS F. ARIAS.** Gracias, Por abrirme las puertas de su laboratorio para la realización de parte de esta investigación.

**AL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.** Gracias, por su gran disponibilidad en la toma de muestras para la realización del presente trabajo.

**A TODOS MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS DEL LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA Y VIROLOGÍA.** Gracias, por inducir un ambiente de armonía entre todos nosotros que hace que el trabajo sea más placentero.

### **Y MUY ESPECIALMENTE**

A mi esposa Teresa de Jesús Araiz de Contreras y a mi hija Luz Angélica Contreras Araiz. Porque su constante apoyo me permitió concluir este trabajo.

## **DEDICATORIA**

### **A MIS PADRES:**

**SR. NICOLÁS CONTRERAS GODINA  
SRA. JUANA CORDERO DE CONTRERAS**

**Por su ejemplo de seguir siempre adelante**

### **A MIS HERMANOS:**

**GABRIEL, JOSÉ HERIBERTO, JULIO, JESÚS, GUADALUPE, LETICIA Y  
MARTHA ELVA**

**Porque cada logro de cualquiera de nosotros es un logro propio**

### **A MI ESPOSA:**

**TERESA DE JESÚS ARAIZ DE CONTRERAS**

**Y**

### **A MI HIJA:**

**LUZ ANGÉLICA CONTRERAS ARAIZ**

**Porque gracias al apoyo que me han brindado pude dedicarle el tiempo a esta investigación, tiempo que inclusive era de ellas.**

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Perfiles electroforéticos de cepas de rotavirus mostrando los modelos de migración de sus genes cognato.	49
Figura 2:	Perfiles electroforéticos de cepas de rotavirus mostrando diferentes modelos de migración de sus genes cognato. Los electroférotipos cortos corresponden a cepas aisladas en la temporada 1999-2000.	50
Figura 3.	Modelos electroforéticos del genoma de rotavirus mostrando electroferotipos largos.	50
Figura 4.	absorbancia a 260 y 280 del RNA obtenido por método de Trizol	51
Figura 5.	Amplificación por RT-PCR de gen 4 de cepas de rotavirus.	52
Figura 6.	Amplificación por RT-PCR del gen de VP7 de cepas de Rotavirus.	52
Figura 7.	Amplificación del gen de VP4 por RT.PCR de cepas de rotavirus. Detección del genotipo (P[8]).	53
Figura 8	Tipificación de cepas de rotavirus a través de RT-PCR mostrando los productos de 345 pb (P[8]) y 483 (P[4]).	53
Figura 9.	Tipificación de cepas de rotavirus a través de RT-PCR cepas que amplifican los productos de 345 y 483 pb.	54
Figura 10	Tipificación por RT-PCR de cepas de rotavirus de Infantes con gastroenteritis, producto de 652 pb específico del serotipo G2.	56
Figura 11.	Análisis por SSCP del producto de 345 bases del genotipos P[8].	56
Figura 12.	Análisis por SSCP del producto de 483 bases genotipos P[4].	57
Figura 13.	Titulación de focos infecciosos en células MA104 utilizando cepas de referencia en los procesos de infección	58
Figura 14.	Neutralización de focos infecciosos. Las células MA104 se infectaron con cepas conocidas en presencia de suero de infantes con gastroenteritis.	67
Figura 15:	Neutralización de focos infecciosos. Las células MA104 se infectaron con cepas conocidas en presencia de suero de infantes con gastroenteritis.	67

**LISTA DE TABLAS**

Tabla 1.	Relación Electroferotipo – Genotipo P en cepas aisladas de infantes con gastroenteritis	55
Tabla 2.	Frecuencia de serotipos de rotavirus aislados de infantes con gastroenteritis. presencia de serotipos en muestras fecales	60
Tabla 3.	Frecuencia de serotipos de rotavirus aislados de infantes con gastroenteritis. Coinfecciones con predominancia de serotipos G1 y G3	61
Tabla 4.	Serotipos P aislados de heces de infantes con una infección por rotavirus	62
Tabla 5.	Anticuerpos monoclonales utilizados para identificar los epítopes correspondientes en la proteína VP4 de las cepas de estudio.	63
Tabla 6.	Caracterización Molecular de la Proteína VP4 de Cepas de Rotavirus Aisladas de Infantes con Gastroenteritis.	64
Tabla 7.	Epítopes presentes en la proteína VP4 de rotavirus aislados de una infección Natural.	65
Tabla 8.	Frecuencia de epítopes en el serotipo P1A de la proteína VP4 de Rotavirus aislado de infantes con infección natural.	66
Tabla 9.	Seroconversión de anticuerpos neutralizantes a las cepas Wa, S2, P y ST3 en suero de infantes infectados con serotipos G1 y G3.	68
Tabla 10.	Seroconversión homotípica y heterotípica de anticuerpos Neutralizantes a las cepas Wa, S2, P y ST3 en suero de infantes infectados con serotipos G1 y G3.	69
Tabla 11.	Número de sueros con seroconversión de anticuerpos neutralizantes a los serotipos G de la proteína de superficie VP7.	70
Tabla 12.	Número de sueros con seroconversión de anticuerpos neutralizantes a los serotipos P de la proteína de superficie VP4.	71

## ABSTRACT

Rotaviruses are an important cause of hospitalization of infants under two years old during fall and winter seasons. These viruses represent the main cause of diarrhea and produce over a million of infant deaths worldwide per year. Previous studies have highlighted the presence of high antigenic and genomic variability within rotaviruses. In this sense, vaccine production being a very important step in order to protect around of 800,000 infants in the world. For a successful rotavirus vaccine it is necessary to know and understand antigenic changes in the rotavirus particle, as well as the specificity of the neutralizing antibodies against rotavirus in infected children. In this study, we report the molecular epidemiology of rotavirus and the specificity of neutralizing antibodies in sera of children infected. One thousand and two hundred fecal samples from infants with gastroenteritis symptoms were analyzed to determine the RNA pattern bands and a representative number of them were also analyzed by RT-PCR and Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP). Results, show us different migration patterns and the predominance and stability of genotype P[8]. Based on genetic variability we chose 197 samples to determine the antigenic variability. The ELISA results revealed the predominance of serotype P1A with the presence of epitopes 1A10 and F:45. On the other hand the immune response was studied by using serum of 71 children, where the 1A10 epitope seems to be the most important one inducing neutralizing antibodies. Although this results show that in our region exist genomic and antigenic variability within rotaviruses, the majority of the strains share a common epitope who seems to be the most important epitope inducing neutralizing antibodies in the children studied.