

RESUMEN

Los rotavirus son la principal causa de hospitalización de infantes menores de dos años de edad durante las temporadas de Otoño e Invierno. Estos virus representan la principal causa de diarrea en el mundo y producen cerca de un millón de muertes por año. Estudios previos han demostrado en los rotavirus una alta variabilidad genética y antigénica. En este sentido, la producción de una vacuna efectiva es un paso importante para proteger al menos 800,000 a nivel mundial. Sin embargo, para el éxito de esta vacuna es necesario conocer y entender los cambios genéticos y antigénicos en la partícula de rotavirus, así bien como la especificidad de los anticuerpos neutralizantes que se producen contra rotavirus en los infantes infectados. En este estudio, nosotros reportamos la epidemiología molecular de rotavirus y la especificidad de los anticuerpos neutralizantes en el suero de niños infectados. Mil doscientas muestras fecales de infantes con síntomas de gastroenteritis se analizaron para determinar el RNA genómico de los rotavirus, y un número representativo de ellos se analizaron por RT-PCR y por un sistema de SSCP (Single Strand Conformational Polimorphism). Los resultados muestran diferentes modelos de migración así como la predominancia y estabilidad del genotipo P[8]. En base a la variabilidad genética, se eligieron 197 cepas aisladas para determinar la variabilidad antigénica. Los resultados de la ELISA, revelan la predominancia del serotipo P1A con la presencia de los epítopes 1A10 y F:45. Por otro lado, se estudió la respuesta inmune de anticuerpos neutralizantes en 71 sueros de niños infectados donde el epítope 1A10, parece ser el más importante en inducir esta respuesta de anticuerpos. Aunque estos resultados muestran que en nuestra región existe variabilidad genómica y antigénica en los rotavirus, la mayoría de las cepas comparten un epítope común que resultó ser el más importante en inducir la producción de anticuerpos neutralizantes en los infantes infectados

INTRODUCCIÓN

Cada año, especialmente durante las temporadas de otoño e invierno, los rotavirus producen brotes epidémicos que azotan principalmente a la población infantil. Se estima que los casos de diarrea causados por estos virus ascienden a nivel mundial a cerca de 125 millones de casos por año (Bresee et al., 1999). De esta cantidad, más de un millón de infantes muere por deshidratación severa, siendo en los países en vías de desarrollo con alto grado de desnutrición, donde más decesos ocurren. (Kapikian et al., 1988; Kapikian et al., 1996; Santosham et al., 1985).

Esta enfermedad se presenta como una inflamación del tracto intestinal, donde se establece una fuerte actividad de replicación del virus. Aunque el 50 % de los casos cursan con fiebre moderada, los principales síntomas son la diarrea acuosa y el vómito (Staat et al., 2002). Durante la fase activa, los pacientes pueden tener episodios diarreicos con más de 30 evacuaciones por día. Estos síntomas inician de 24 a 48 horas después de la infección y dependiendo del manejo del paciente puede durar en resolverse de uno a diez días. La severidad de la enfermedad se aprecia más en infantes y personas de la tercera edad, ya que son los individuos con mayor riesgo de deshidratación y es frecuente la hospitalización para una pronta recuperación de los líquidos perdidos. Por tal motivo, además de los graves problemas de salud, se requieren fuertes recursos económicos para asegurar un buen manejo hospitalario durante cada brote epidémico (Chang et al., 2001; Kapikian et al., 1996).

Aunque la transmisión de los rotavirus a personas susceptibles se realiza por la ruta fecal-oral, se ha observado que este virus también se multiplica en el tracto respiratorio alto, por lo que aparentemente la ruta respiratoria puede jugar un papel más importante en su diseminación (Lewis et al., 1979; Ushijima et al., 1994). Sin embargo, se acepta que los principales factores que aumentan las infecciones son los inadecuados servicios sanitarios, la contaminación de los depósitos de agua, la aglomeración de infantes en escuelas y guarderías, así

como la falta de atención hospitalaria oportuna de los niños infectados. Una vez presente la infección, el virus se disemina a través de un contacto estrecho con las personas infectadas (Butz et al., 1993). No obstante, aun y cuando estos factores influyen considerablemente en la alta tasa de infección, existe suficiente evidencia de que el mejoramiento de los sistemas sanitarios no es capaz por si mismo de detener las infecciones por estos virus (Frühwirth et al., 2001)

En diversos estudios epidemiológicos se ha observado que en los primeros cinco años de vida cerca del 80% de los infantes son susceptibles de desarrollar diarrea por rotavirus (Rodríguez et al., 1987; Midthun et al., 1996) De estos, uno de cada siete puede requerir atención médica y durante los meses de diciembre y enero, más del 50 % de los pacientes puede requerir hospitalización (Glass et al., 1996; Tucker et al., 1998; Matson et al., 1990; Rodríguez et al., 1980). Los niños con problemas de nutrición y los infantes prematuros son los que presentan un mayor riesgo de sufrir una deshidratación severa (Newman et al, 1999; Scrimshaw et al., Tomkins et al., 1981).

Los rotavirus se caracterizan por presentar un genoma constituido de 11 segmentos de RNA de doble cadena, rodeado por tres capas concéntricas de proteínas. Estas proteínas son denominadas VP1, VP2 y VP3 que conforman la capa más interna, VP6 que constituye la capa media y VP4 y VP7 que conforman la capa más superficial (Prasad et al., 1997; Estes 1996).

Al igual que todos los virus de RNA, los rotavirus pasan por múltiples mutaciones por la falta de mecanismos de reparación de su transcriptasa. Aunado a lo anterior, por su genoma segmentado, existe evidencia experimental de que el genoma de los rotavirus también sufren rearrreglos genéticos, donde segmentos de uno o varios de sus genes se recombinan entre si (Mendez et al., 1992; Gault et al., 2001; Desselberger et al., 1996; Maunula et al., 2002). Estos mecanismos conducen a cambios en sus genes, lo cual constantemente se reflejan como cambios antigénicos en sus proteínas de superficie. Aumentando la probabilidad

de la aparición de nuevas variedades que dificulta su control (Palombo et al., 1996; Ludert et al., 1998; Zao et al., 1999).

De las seis proteínas que conforman la estructura del virus, la proteína VP6 define los grupos de rotavirus. El análisis antigénico de esta proteína indica la presencia de siete grupos denominados con las letras A a la G (Kapikian, 1996). Por su parte las proteínas VP4 y VP7 las cuales durante los mecanismos de replicación se segregan de forma independiente, son las responsables de los serotipos. A la fecha, se han definidos 14 serotipos de cada una de estas proteínas. La proteína VP7 por ser glicosilada define a los serotipos G, mientras que la proteína VP4 define los serotipos P. Este nombre se debe a que esta proteína sufre un corte proteolítico para aumentar la eficiencia de penetración del virus a la célula hospedero (Crawford et al., 2001).

Diversos estudios inmunológicos indican que los infantes adquieren inmunidad protectora contra las infecciones por rotavirus aproximadamente a los tres años de edad (Fischer et al., 2002). Aunque es difícil determinar con precisión el número total de infecciones por rotavirus que los niños sufren durante este período, existe evidencia que la infección se establece con varios serotipos y que la respuesta inmune inducida por un serotipo infectante puede estar dirigida contra varios serotipos (lo que se conoce como respuesta heterotípica). Lo cual es de gran interés para el desarrollo de una vacuna efectiva (Menchaca et al., 1998).

En nuestra región, estudios epidemiológicos desarrollados desde 1993 a la fecha en el área metropolitana de Monterrey, N.L. indican la aparición de brotes epidémicos cada año con predominancia de los serotipos G1 y G3 (Contreras et al., 1995). Lo anterior es de suma importancia epidemiológica ya que indica la presencia de dos de los serotipo G con mayor circulación en la mayoría de las regiones del mundo.

Por otro lado, el análisis de los serotipos P en muestras de campo también muestran la predominancia del serotipo P1A. En este caso, los estudios indican que cerca del 85% de las cepas analizadas corresponden a este serotipo, lo que la

ubica como una proteína de interés para determinar la presencia de epítopes comunes entre las diferentes cepas en circulación, que permitan considerarlo en la producción de un biológico efectivo (Contreras et al., 1995; Menchaca et al., 1998)

En este sentido, en un estudio preliminar en nuestra región, los infantes muestran la presencia de varios epítopes inmunodominantes pero con predominancia del epítope 1A10, ya que este epítope fue detectado en todas las cepas analizadas. (Contreras et al., 1995). Por tal motivo, consideramos que 1A10 es un epítope común entre las cepas que circulan en nuestra región. Por lo anterior, en el presente trabajo fue nuestro interés realizar la caracterización molecular y la presencia de epítopes comunes entre las cepas de rotavirus obtenidas de infecciones naturales, con el propósito de determinar las variaciones antigénicas y genéticas que aunado a la caracterización de la respuesta de anticuerpos neutralizantes, nos indique la importancia de estos epítopes en la inducción de una inmunidad de anticuerpos protectores.

ANTECEDENTES

Generalidades

En el año de 1973, Ruth Bishop estudió por microscopía electrónica el epitelio duodenal de niños con diarrea no bacteriana. En sus observaciones, Bishop detectó partículas virales de aproximadamente 70 nanómetros de diámetro (Bishop, 1973). Estas partículas fueron subsecuentemente observadas en muchos casos de diarrea infantil y aunque al inicio, a estos virus se les consideró como *Orbivirus*, poco tiempo después se reubicaron como rotavirus, los cuales previamente habían sido descubiertos como causantes de problemas gastrointestinales en diversas especies animales (Flewett et al., 1974; Woode et al., 1976)

Antes de este descubrimiento, a un gran número de casos de diarrea humana no se les relacionaba con agente etiológico conocido (bacterias o protozoarios). Por tal motivo, éste descubrimiento impactó de manera inmediata, ya que pronto fueron registrados como la causa más común de la gastroenteritis deshidratante infantil alrededor del mundo (Bern et al., 1992; Cook et al., 1990; Parashar, 1998) Actualmente, solo en los Estados Unidos, un país con alta infraestructura de servicios sanitarios, más de 2.7 millones de infantes menores de 5 años de edad son infectados por rotavirus cada año (Parashar, 1998; Tucker et al., 1998), y se considera que en los países en vías desarrollo, del 20 al 70 % de las hospitalizaciones, y los más de un millón de muertes por año, son causados por estos virus. Por tal motivo, se desarrolla intensa investigación para producir un biológico efectivo para la prevención de esta enfermedad (Institute of Medicine 1986; Pérez et al., 2002).

Los rotavirus están clasificados como uno de los nueve géneros que comprenden la familia *Reoviridae*. Además de los humanos, el número de especies animales que pueden infectar es tan amplio que se han aislado de una extensa variedad de

especies de mamíferos y aves (Bridger et al., 1994; Tsunemitsu et al., 1992; Woode et al., 1976).

Estructura y Moléculas de Rotavirus:

Las partículas de los rotavirus presentan un diámetro aproximado a los 70 nanómetros. Al igual que la mayoría de los virus que infectan el tracto digestivo, inclusive de familias virales filogenéticamente distantes a estos virus, los rotavirus carecen de envoltura lipídica y su arquitectura muestra una simetría de tipo icosaédrica. Esta estructura posee tres capas concéntricas de proteínas. La capa mas interna, se organiza en un complejo ribonucleoproteico formado por el RNA genómico y las proteínas denominadas VP1 (125 KDa) y VP3 (88 KDa), que a su vez, están rodeadas por la proteína VP2 (102 KDa) (Prasad et al., 1996). Por su parte, la capa intermedia y la más externa, forman dos cápsides de estructura icosaédrica, lo cual es una característica distintiva de la familia *Reoviridae* (Chasey, 1977; Esparza et al., 1980). Considerando la capa intermedia, su estructura la forman 260 trímeros de la proteína VP6 (41 KDa). Mientras que la capa más superficial, esta constituida de dos proteínas; la denominada VP7 (37 KDa), la cual se organiza formando una capa lisa de 780 moléculas, y la proteína VP4 (84 KDa) que a su vez se organiza en 120 moléculas que se proyectan al exterior en forma de espículas de 12 nanómetros de largo cada una (Shaw et al., 1996). Mediante esta proteína la partícula viral es capaz de aglutinar glóbulos rojos de humano y diferentes especies animales, además, es responsable de la adherencia al receptor celular, por lo que esta involucrada en los procesos de penetración del virus a la célula hospedero (Mackow et al., 1989).

En su conjunto, la partícula de rotavirus presenta diferentes ejes de simetría, dos de estos ejes se localizan en la cara de los triángulos que forman el icosaédrico, tres ejes de simetría en los bordes de esos mismos triángulos y cinco se localizan en los vértices donde se encuentran ubicados los pentámeros de la cápside (Shaw et al., 1996).

Desde el punto de vista etimológico, el término *rota* significa rueda (latín) y se deriva de la apariencia de la partícula viral completa cuando se observa por tinción negativa en una posición donde los cinco ejes de simetría se encuentran acéntricos. En estas condiciones, también se pueden observar los componentes proteicos que se originan desde el centro de la partícula hasta la superficie, resaltando la forma de canales que presentan y que atraviesan las tres capas de proteínas. Estos canales están formados por la proteína VP2 y son los responsables de la comunicación entre el centro del virus (core) y el citoplasma de la célula infectada. Dentro de las funciones de estos canales, está el permitir la entrada de los metabolitos necesarios para la transcripción del genoma viral, con lo cual se sintetizan los primeros RNAs mensajeros durante el curso replicativo de los virus, así como para la salida de estos RNAs mensajeros recién sintetizados para su posterior traducción en proteínas, y síntesis de RNAs complementarios de polaridad negativa (Lawton et al., 1997). Como dato adicional, estos RNAs mensajeros presentan cap en su extremo 5' pero no presentan poli A en su extremo 3' (Imai et al., 1983; Lawton et al., 1999).

El genoma completo de los rotavirus constituye el 16 % de las moléculas del virus. Este genoma se organiza en 11 segmentos de RNA lineal de doble cadena, los cuales muestran distinta talla molecular, por lo tanto, se pueden resolver en un corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida (PAGE) (Beards et al., 1982; Ghosh et al., 1989; Himagawa et al., 1993). Los 11 segmentos de rotavirus presentan un total de 18,556 nucleótidos (nt). El segmento más largo, presenta 3302 nt., mientras que el más pequeño consta de 667 nt. Estos distintos segmentos del genoma presentan de 9 a 49 nucleótidos no traducidos en su extremo 5' y de 17 a 182 nucleótidos en su extremo 3'. A su vez, estos segmentos no codificables presentan secuencias consenso. Para el extremo 5' se localiza la secuencia G-G-C-(A,U)*n* donde "n" es de 6 a 9 nucleótidos, mientras que para la región 5' se detecta la secuencia A-U-G-U-G-A-C-C. Estas secuencias son altamente conservadas entre distintas cepas de rotavirus (Estes and Cohen 1989;

Patton et al., 1995; Patton et al., 2001).

Con respecto a las regiones codificables, el genoma completo codifica para 12 proteínas, de las cuales seis son estructurales (VP1 a VP4, VP6 y VP7) y seis no estructurales (NSP1 a NSP6). Las proteínas no estructurales solamente se detectan en la célula durante la replicación y ensamble del virus. De las 12 proteínas, 10 son codificadas por cada uno de los primeros 10 segmentos ya que solo presentan un marco de lectura abierto, mientras que el segmento 11 codifica para dos proteínas traducidas por dos distintos marcos de lectura que se encuentran traslapados (Estes, 1996).

Genes y proteínas de superficie de rotavirus

De los 11 genes que presenta el genoma de los rotavirus, el gen 4 codifica para la proteína de superficie VP4 (Viral Protein), mientras que el gen 7, 8 o 9 dependiendo de la cepa viral, codifica para la proteína VP7 (Gentsch et al., 1992, Santos et al., 1999). El estudio de estos genes reviste gran importancia para la producción de una vacuna contra rotavirus, ya que las proteínas que codifican son las responsables de la antigenicidad de la partícula viral e inducen la respuesta inmune tanto humoral como celular. Por lo tanto, son responsables de la producción de anticuerpos neutralizantes que pueden anular la infectividad del virus a la célula hospedero (Shaw et al., 1986; Hoshino et al., 1994; Franco and Greenberg, 2000).

El gen que codifica la proteína VP7, esta constituido de 1062 nt., con un marco de lectura de 978 bases que codifica una proteína de 326 aminoácidos. Este marco de lectura inicia en la posición 49 con el codón de iniciación ATG, y termina en la posición 1025 con uno de los tres codones de terminación. Por tal motivo, existen dos regiones no traducidas y son altamente conservadas entre diferentes cepas de rotavirus, una de estas regiones se encuentra en el extremo 5' y es de 48 nt. de

largo, mientras que la otra región, se localiza en el extremo 3' y presenta 36 nt. (Urasawa et al., 1993). Además de estas dos regiones, existen otras porciones del gen que también se conservan entre distintas cepas, lo que ha conducido al diseño de distintos oligonucleótidos para la amplificación de regiones específicas, con el propósito de estudiar la presencia de diferentes o nuevas cepas de rotavirus entre la población susceptible (Arista et al., 1999; Wen et al., 1997; Steele et al., 1995; Fisher et al., 2000).

Con respecto a la región codificante, se ha observado que dentro de esta región del gen de VP7, algunas cepas presentan dos codones de iniciación en fase, uno en la posición 49-52, el cual es el primeramente utilizado en la traducción de la proteína de 326 aminoácidos, y otro en la posición 136 -138 que en ocasiones puede ser funcional como sitio de iniciación (Chan et al., 1986).

La porción amino terminal de la proteína VP7 presenta dos regiones hidrofóbicas las cuales están localizadas después de cada uno de los dos codones de iniciación. En realidad, la proteína VP7 es una glicoproteína, y el sitio de glicosilación se encuentra ubicado en el residuo 69 que corresponde a una asparagina (Asn), la cual se conserva entre la mayoría de las cepas de rotavirus. Asimismo, también presenta ocho residuos altamente conservados de cisteína los cuales participan en la conformación de la proteína por el establecimiento de los enlaces bisulfuro (Estes & Cohen, 1989).

Por su parte, el gen 4 varía en el número de nt. dependiendo del origen de la cepa. Para el caso de la mayoría de los rotavirus aislados de animales, este gen está constituido por 2362 nt., mientras que para la generalidad de las cepas de origen humano, es tres nucleótidos más pequeño y corresponde a 2359 nt. (Huang et al., 1993; Li et al., 1993). Sin embargo, aunque se ha observado, que cepas aisladas de diferentes especies animales y del humano muestran diferencias significativas en la secuencia de nucleótidos, y por consecuencia en el producto proteico, se ha observado que a pesar de estas diferencias filogenéticas, comparten

características comunes, entre las que destacan, además del número de nucleótidos que la componen (Urasawa et al., 1993; Taniguchi et al., 1994), la capacidad hemaglutinante dependiente del ácido siálico (Ciarlet et al., 2002; Svensson et al., 1992; Fuentes-Pananá et al., 1995). Esto último da evidencia de posibles recombinaciones genéticas entre las cepas durante la replicación viral, ya que la mayoría de las cepas aisladas de humano no presentan la capacidad hemaglutinante. (Nakagomi et al., 1992)

Considerando su estructura, el gen de la proteína VP4, muestra la presencia de un marco de lectura que inicia en la posición 10 de todas las cepas de rotavirus con el codón de iniciación ATG y termina en la posición 2337. Por lo tanto, el gen de VP4 también presenta dos regiones no codificantes, una de 9 nt. para extremo 5' y otra de 25 nt. para el extremo 3'. Asimismo, en el extremo 5' se puede apreciar una secuencia consenso que incluye el codón de iniciación ATG y tiene la secuencia ANNATGG (Huang et al., 1993). Existen evidencias de que esta secuencia consenso se utiliza para el reconocimiento de la molécula de RNAm por los ribosomas eucarióticos, durante el proceso de iniciación de la traducción.

Aunque el gen 4 codifica para la proteína VP4 de 775 o 776 aminoácidos (dependiendo de la cepa), en el proceso de penetración del virus a la célula hospedero, esta proteína requiere pasar por un corte proteolítico para dar lugar a dos productos proteicos (lo que aumenta la eficiencia de penetración). Estos productos son los denominados VP8 (231 aa) y VP5 (545 aa) (Ludert et al., 1996). A nivel genómico, VP8 es codificado por la región 5' que comprende desde el nucleótido 10 hasta la posición del codón 241 o 247, que corresponden a los nucleótidos 732 y 750 respectivamente. Estos nucleótidos a su vez, forman parte de los codones de arginina, residuos que son altamente conservados en VP4 entre la mayoría de las cepas de rotavirus y son el blanco de la tripsina para el procesamiento de VP4 en las dos proteínas mencionadas (VP8 y VP5). Por tal motivo, el largo de estas proteínas puede variar ligeramente dependiendo del sitio de corte de la tripsina (Patton et al., 1993). Asimismo, entre los codones para

estos dos residuos de arginina, los seis codones espaciadores también son conservados entre la mayoría de las cepas humanas y animales .

Por otro lado, esta proteína (VP4) también presenta residuos de cisteína que se conservan entre las diferentes cepas de rotavirus. Sin embargo, cuatro de estos aminoácidos se detectan de manera general entre las cepas humanas y uno más entre las cepas de origen animal. En estudios utilizando mutantes en estos residuos de cisteína, muestran la formación de dos puentes disulfuro dentro de esta proteína en cepas de rotavirus animales, y sólo un enlace de esta naturaleza en las cepas humanas (Patton et al., 1993). Sin embargo, existen evidencias de la formación de nuevos residuos de cisteína dentro de esta proteína, por lo que su estructura puede variar dependiendo de la presencia de estos enlaces disulfuro (Cuadras et al., 1998).

Propiedades antigénicas de las proteínas de rotavirus

Los rotavirus presentan tres proteínas de importancia antigénica que se han utilizado para su clasificación en grupos (VP6), subgrupos (VP6) y serotipos. (VP4 y VP7). (Mattion et al., 1994). Aunque es de gran valor epidemiológico, esta clasificación es limitada ya que de los siete grupos conocidos solamente el Grupo A esta definido en subgrupos y serotipos (Beards, 1982). La especificidad de subgrupo también esta mediada por la proteína VP6. Actualmente se conocen cuatro subgrupos del grupo A donde los subgrupos denominados SG1 y SG2, presentan un epítoto específico que los define, mientras que un tercer subgrupo presenta a la vez estos dos epítotos. El cuarto subgrupo no presenta especificidad para estos dos determinates antigénicos (Hoshino and Kapikian, 1994). Por su parte, la especificidad de serotipo esta definida por las proteínas de superficie VP4 y VP7 las cuales inducen la producción de anticuerpos de forma independiente. A la fecha, se han definido 14 serotipos para cada una de estas proteínas (Hoshino et al., 1985; Gorziglia et al., 1990) .

Proteína VP6

Aunque los estudios iniciales en la clasificación de rotavirus se basaron en la identificación de subgrupos los cuales son definidos por epitopes presentes en la proteína VP6, actualmente, además de esta clasificación, esta proteína presenta los epitopes con los cuales los rotavirus se clasifican en los 7 grupos que a la fecha se han detectado (Kohli et al. 1992) Estos grupos son denominados con las letras A – G, y aunque la mayoría de las cepas humanas pertenecen al grupo A, recientes estudios han detectado a los grupos B y C como causantes de múltiples brotes epidémicos, por lo que la importancia epidemiológica de estos grupos ha aumentando considerablemente y existe fuerte investigación para establecer su verdadera participación en los distintos brotes epidémicos (Bonsdorf et al., 1988; James et al., 1997; Jiang et al., 1995; Steele et al., 1999)

La proteína VP6 es un producto del gen seis del genoma de rotavirus y esta constituida por 397 aminoácidos con un peso molecular de 41 KDa, esta proteína es la más abundante del virión ya que por sí sola constituye el 51% de las proteínas totales del virus. Está organizada en 260 trimeros por lo que existen 780 copias de la misma en la partícula viral completa. Además de su importancia antigénica, esta proteína sirve de enlace en la estructura del virus, al interactuar por la cara interna con la proteína VP2, mientras que con la cápside externa lo hace con las proteínas VP4 y VP7 (Shaw et al., 1996)

La presencia de epitopes comunes entre las cepas del mismo grupo, ha despertado el interés por investigar su potencial en inducir una respuesta inmune protectora. A la fecha diversos estudios con esta proteína indican la presencia de epitopes en la proteína VP6, los cuales inducen una respuesta inmune protectora al menos en modelos de ratón. Por lo que la investigación en este sentido continúa en la búsqueda de los mejores epitopes que pueden utilizarse para este propósito (Choi et al., 2000; McNeal et al., 2002).

Sin embargo, son las proteínas de la cápside externa VP7 y VP4 las que más interés han despertado para estudiar las características antigénicas. La proteína VP7 también se denomina glicoproteína o proteína G. Esta proteína es codificada por los genes 7 8 o 9 dependiendo de la cepa viral. Por su parte, la proteína VP4, como es una proteína que sufre un corte proteolítico durante la infección del virus a la célula hospedero, también se denomina proteína P y es codificada por el gen 4 en todas las cepas virales. Estas dos proteínas determinan el serotipo viral y forman la base de clasificación binaria de los serotipos G y P de los rotavirus. Ambas proteínas inducen la producción de anticuerpos neutralizantes por lo que son importantes en la eliminación del virus.

Proteína VP7

Los estudios iniciales de las características antigénicas de las proteínas de superficie, se dirigieron principalmente a la proteína VP7, por ser la proteína más abundante de la superficie del virus y aparentemente la más antigénica. Para 1980, cuatro serotipos fueron identificados entre las cepas que previamente se habían aislado de muestras humanas. El proceso de serotipificación consistió en adaptar los rotavirus humanos a crecer en cultivo de células MA104 (células de riñón de mono) y mediante la prueba de reducción de focos infecciosos con anticuerpos monoclonales, se logró neutralizar específicamente la infectividad de los virus (Beards et al., 1980). Actualmente, son 14 serotipos (G1 – G14) los que se han aislado tanto de humano como de diversas especies animales y además de la prueba mencionada para el estudio de los serotipos, actualmente se utilizan diversas técnicas como la prueba de neutralización de reducción de placas (PRNT), neutralización de focos fluorescentes (FFN) y la prueba de ELISA (Beards et al., 1980; Coulson et al., 1987; Ward et al 1996). El criterio utilizado para definir un nuevo serotipo, es que exista al menos una diferencia de 20 veces en el título neutralizante o una diferencia de al menos ocho veces en la absorbancia cuando se titula por ELISA entre cepas con diferente serotipo (Wyatt et al., 1983).

Para realizar los estudios de serotipificación, varios investigadores de forma independiente se enfocaron a producir anticuerpos monoclonales utilizando las cepas de referencia ya identificadas para aumentar los estudios en las muestras de campo. Por tal motivo, actualmente se cuenta con toda una batería de anticuerpos monoclonales que reconocen diferentes epítopes dentro de la misma proteína VP7 para detectar un mismo serotipo (Greenberg et al. 1983; Unicomb et al., 1989; Padilla-Noriega et al., 1990; Ward et al., 1991).

Esta situación de contar con diferentes anticuerpos que reaccionan con un mismo serotipo, dio lugar a diversos estudios epidemiológicos con el propósito de evaluarlos y determinar la presencia de los diferentes serotipos entre la población infectada. De esta manera, la prevalencia de los serotipos G1-G4 se hizo evidente entre las cepas aisladas. Sin embargo, cuando diferentes anticuerpos que reaccionan con un mismo serotipo se utilizaron en la misma cepa, se detectaron diferencias significativas en los modelos de reactividad, ya que aunque se encontraron cepas que se definían como un serotipo G particular, estas cepas no reaccionaban con todos los anticuerpos específicos para ese serotipo y por lo tanto mostraron evidencias de que un mismo serotipo presenta diferencias antigénicas (Ward et al., 1991). Por tal motivo se hizo evidente ampliar los estudios e investigar las regiones antigénicas de la proteína VP7 para entender este comportamiento antigénico.

En los primeros estudios se realizó un mapeo de los antígenos presentes en una cepa de rotavirus aislada de mono Rhesus (RRV). Este rotavirus está clasificado como serotipo G3. La estrategia utilizada fue a través de un sistema de ELISA utilizando diez diferentes anticuerpos monoclonales que previamente se demostró que reaccionan específicamente con el serotipo G3, (ya que fueron producidos a partir de la cepa de rotavirus de mono Rhesus). En esta investigación, se determinó la habilidad de los anticuerpos monoclonales, los cuales se marcaron con biotina para competir con anticuerpos monoclonales homólogos sin marca

para reaccionar con la cepa de rotavirus Rhesus (RRV). Los resultados de estos estudios mostraron diferencias significativas de reactividad por estos anticuerpos lo que dio evidencia de que existen diferentes dominios de neutralización sobre la proteína VP7 (Shaw et al., 1986).

Posteriormente estudios de análisis de secuencia y predicción de la secuencia de aminoácidos entre los 14 serotipos de rotavirus humanos y animales, mostraron la presencia de regiones con alta variabilidad de secuencia de aminoácidos. A estas regiones se les denominó regiones VR (regiones variables), estas regiones están constituidas de entre 8 a 17 aminoácidos, y son altamente conservadas entre cepas del mismo serotipo, pero difieren entre cepas de distinto serotipo. La extensión de esos estudios utilizando cepas de rotavirus que escapan a la neutralización por los referidos anticuerpos monoclonales, mostró que la especificidad de serotipo está confinada principalmente a las regiones VR5, VR7, y VR8, que corresponden a las regiones antigénicas A (87-101), B (142-152), y C (208-221) de acuerdo a la identificación de Dyll-Smith (Coulson & Kirkwood, 1991; Dunn et al., 1993; Dyll-Smith, 1986; Lazdins et al., 1995).

Sin embargo, como son diversos los anticuerpos monoclonales que se han producido para detectar el mismo serotipo, para evitar confusión en la nomenclatura de los serotipos, se introdujo el término monotipo, con el fin de identificar sólo aquellas cepas de rotavirus que comparten el mismo serotipo pero que presentan diferente modelo de reactividad contra los diferentes anticuerpos monoclonales que identifican al serotipo (Coulson et al., 1996).

Otra importante observación que se derivó de estos estudios antigénicos fue la reactividad cruzada de ciertos anticuerpos monoclonales contra cepas con diferente serotipo. A los anticuerpos con esta característica se les conoce como anticuerpos de reacción cruzada y la respuesta de los mismos se conoce como respuesta heterotípica. Esta característica es de gran importancia para el desarrollo de una vacuna (Crawford et al., 1999).

Lo anterior, condujo a ampliar el estudio de las características antigénicas de VP7, y realizar un mapeo de los sitios antigénicos responsables de la especificidad de serotipo, monotipo y reacción cruzada. La estrategia utilizada en este tipo de estudios fue la de generar cepas mutantes que escapan a la neutralización por los anticuerpos monoclonales, a través de estudios de neutralización de focos infecciosos. Aquellos mutantes que se seleccionaron de esta manera, se les analizó la secuencia del gen, y la predicción de la secuencia de aminoácidos de VP7 para identificar el sitio de las mutaciones y determinar su participación en la reactividad con los anticuerpos monoclonales (Hoshino et al., 1994).

Los resultados de esos estudios muestran que los epítopes de neutralización cruzada se encuentran localizados en las regiones VR5, VR8 y VR9 en donde el cambio de un sólo aminoácido es suficiente para cambiar las características antigénicas de la cepa de rotavirus. Estos cambios pueden ser debidos a la presencia de aminoácidos importantes en el reconocimiento por el anticuerpo, o por la presencia de un residuo que genera un sitio potencial de glicosilación, lo que a la postre altera el plegamiento de la proteína. Por tal motivo, estos estudios claramente mostraron que existe una correlación entre el cambio de un aminoácido con la reactividad del anticuerpo monoclonal.

A diferencia de los epítopes de reacción cruzada, el estudio de los monotipos se realiza en cepas con un mismo serotipo. Como se mencionó, los anticuerpos específicos de serotipo son tan variados que se han producido en diferentes laboratorios todo un conjunto de anticuerpos monoclonales que en forma individual pueden ser utilizados para la definición de serotipo. Cuando varios anticuerpos de esta naturaleza se utilizan para determinar el modelo de reactividad de diferentes cepas con el mismo serotipo, es posible detectar cepas que escapan a la neutralización por alguno de estos serotipos. A estas cepas se les conoce como mutantes que escapan a la neutralización, y han sido muy utilizadas en este tipo de estudio de variación intratípica. Los análisis de secuencia de estas mutantes

también han mostrado que existe una diferencia puntual entre las cepas del mismo serotipo, y que esta mutación en punto es suficiente para determinar el cambio de un aminoácido en la proteína. Cuando este cambio se da en ciertas posiciones principalmente en los residuos de las regiones VR5, VR7 y VR8, el resultado es la falta de reactividad de alguno de los anticuerpos utilizados para el reconocimiento de serotipo (Diwakarla and Palombo 1999). Situación que es muy frecuente para esta proteína, lo que limita su utilización en la producción de un biológico efectivo.

Proteína VP4

Antes de 1988, la proteína VP4 (proteína viral 4) era conocida como VP3 en virtud de que no se tenía evidencia del producto del gen 3. Cuando se demostró que este gen codifica para una proteína no estructural, el término VP3 se quedó para definir una proteína que forma parte de la capa interna de proteínas, con actividad de polimerasa y se asocia al genoma viral. Por tal motivo la proteína de superficie codificada por el gen 4 recibió el nombre de VP4 para estar acorde al segmento que la codifica (Hoshino et al., 1985).

Al igual que VP7, la proteína VP4 ha sido tema de innumerables estudios para definir su importancia antigénica. Los primeros indicios de que esta proteína podía jugar un papel importante en la inmunidad datan de la demostración de que durante la morfogénesis del virus VP4 se segrega de manera independiente a VP7 (Hoshino et al., 1985). Por tal motivo, también presenta especificidad de serotipo y esta especificidad es independiente de la proteína VP7 (Greenberg et al., 1983).

A diferencia de los serotipos G, para establecer el sistema de los serotipos P de la proteína VP4, se utilizó antisuero de cobayos inmunizados con la proteína VP4 expresada en baculovirus. Con estos anticuerpos, se realizaron ensayos de neutralización contra todas las cepas conocidas, tomando como base el criterio de que exista al menos una diferencia de ocho veces en el título de anticuerpos

neutralizantes para considerar una cepa como un serotipo diferentes (Gorziglia et al., 1990).

Sin embargo, desde los primeros anticuerpos monoclonales que se produjeron para identificar los serotipos P, se mostró evidencia de que esos anticuerpos, con mayor frecuencia presentan reactividad cruzada hacia cepas distintas de las que se utilizaron para su producción. Por tal motivo, los esfuerzos en entender esta proteína desde el punto de vista antigénico también se centraron en realizar un mapeo de los sitios antigénicos de la proteína.

En los primeros estudios, Taniguchi demostró que en la proteína VP4 existen al menos tres tipos de epítopes de reacción cruzada. La manera en que realizó el estudio fue utilizando seis anticuerpos monoclonales producidos a partir de cepas con diferentes serotipos G, (G1, G3, G4). Dos anticuerpos fueron producidos por serotipo G1 (KU-4D7, KU-6B11), tres a partir de serotipo G3 (YO-1E6, YO-1S3, YO-2C2) y uno a partir de serotipo G4 (ST-1F2). Para comprobar que los anticuerpos estaban dirigidos contra VP4 y no contra VP7, Taniguchi realizó ensayos de inmunoprecipitación donde demostró que estos anticuerpos *verdaderamente precipitan con VP4*. Después de establecer esta especificidad, el siguiente paso fue realizar ensayos de neutralización utilizando estos seis anticuerpos monoclonales contra 17 cepas con distintos serotipos G. En sus resultados, Taniguchi observó tres diferentes modelos de reactividad con estos anticuerpos, lo que dio evidencia de que esta proteína presenta al menos tres epítopes con estas características, *un epitope por cada modelo de reactividad encontrado* (Taniguchi et al., 1987).

Otro paso importante en el entendimiento de estos epítopes de reacción cruzada, fue realizado cuando se localizaron los aminoácidos asociados la antigenicidad en estos epítopes. La estrategia fue secuenciar cepas mutantes que escapan a la neutralización por los seis anticuerpos producidos por Taniguchi (Taniguchi et al., 1987), Los resultados de estos estudios mostraron un sólo cambio en una base en

todo el gen de VP4 que ocasionó el cambio de un aminoácido que era el responsable de la falta de reactividad por el anticuerpo correspondiente. En cada mutante los codones responsables de esta substitución se localizaron en las posiciones 305 para el epítipo reconocido por YO-2C2, el codón 392 para el epítipo reconocido por los anticuerpos KU-6B11, YO-1S3 y ST-1F2, y el codón 433 para el epítipo reconocido por KU-4D7, por lo que dichas posiciones corresponden a la subunidad VP5 (Taniguchi et al., 1988).

Para determinar si verdaderamente los epítipos de reacción cruzada se encuentran confinados a la subunidad VP5, se clonaron y se expresaron en *E. coli* los productos de corte de VP4 (VP8 y VP5), y se produjo antisuero en cobayos contra cada una de las subunidades. Estos antisueros fueron utilizados en ensayos de neutralización y por posteriores ensayos de coprecipitación con el antisuero específico para VP8 o VP5, demostraron que la proteína VP8 es la responsable de llevar los epítipos específicos de serotipo, mientras que VP5 verdaderamente presenta los epítipos de reacción cruzada, ya que este antisuero fue capaz de neutralizar cepas que presentan distintos serotipos de VP4 (Larralde et al., 1991).

Sin embargo, en otro experimento similar, pero clonando y expresando por separado, tres secuencias de nucleótidos que codifican para tres péptidos (A, B, y C), y que juntos representan toda la subunidad VP8, se dio evidencia que realmente la especificidad de serotipo recae en esta subunidad preferentemente en la región que comprende el péptido B, (residuos 80 al 180), también se demostró que en los otros péptidos existe reactividad cruzada contra otros serotipos P, por lo que estos epítipos no son exclusivos de VP5 sino que se pueden distribuir a lo largo de toda la proteína VP4 (Larralde & Gorziglia 1992).

Otro paso importante en este experimento fue la evidencia que se obtuvo sobre la naturaleza de los epítipos en los tres péptidos, Cuando los antisueros antipéptido se utilizaron para neutralizar la cepa homóloga, aunque se observó neutralización

en los niveles de 1:120, esta neutralización fue 16 veces más baja cuando se utilizó antisuero producido contra la subunidad VP8 completa. Lo anterior, se reforzó con experimentos de absorción del antisuero neutralizante anti VP8 específica de serotipo. Cuando este antisuero fue absorbido con antígeno nativo pero no con una mezcla de los peptidos A, B, y C indicó que los epítopes específicos de serotipo en la subunidad VP8 son epítopes conformacionales y por lo tanto, dependen de la molécula entera para la inmunogenicidad (Larralde & Gorziglia 1992).

Epidemiología Molecular

La producción de anticuerpos monoclonales para detectar los epítopes específicos de serotipo, ha sido de gran ayuda para identificar los 14 serotipos G y 14 serotipos P que actualmente se conocen (Estes et al., 1996; Larralde et al.1991). Sin embargo, con respecto a los serotipos P, aunque actualmente se acepta que la mayoría de los epítopes específicos de serotipos se encuentra presentes principalmente en la subunidad VP8, existen varios factores que impiden un análisis más completo de los serotipos P entre la población susceptible. Entre los más importantes se pueden mencionar: a) la presencia de epítopes de reacción cruzada, b) la presencia de monotipos, y c) la falta de suficientes anticuerpos monoclonales para detectar todas las variedades antigénicas que aparecen durante los brotes epidémicos. Lo que ha frenado de forma significativa el conocimiento real del polimorfismo de la proteína VP4 entre las cepas que infectan a los infantes (Liprandi et al.,1991) .

Por tal motivo, los experimentos de análisis de secuencia del gen de VP4 de cepas prototipo, se han convertido en la base para comprender la epidemiología molecular de los rotavirus. En los estudios iniciales, mediante hibridación RNA-RNA del genoma de rotavirus de diversas cepas que previamente se habían recuperado de infantes con y sin síntomas de gastroenteritis, se demostró el

primer indicio de fuerte variabilidad en el gen de VP4. En este estudio, las cepas Wa, P, VA-70, DS-1, y RV-5; representaron a las cepas sintomáticas, mientras que M37, 1076, McN13, y ST3 representaban a las cepas asintomáticas. Las pruebas de hibridación mostraron diferencias significativas entre cada uno de los grupos probados, mostrando que existen al menos dos tipos del gen de VP4 uno para cada grupo de cepas (Flores et al., 1986).

Para comprobar que la diferencia entre las cepas sintomáticas y asintomáticas se encuentra en los niveles de secuencia de nucleótidos del gen de VP4, se realizó una síntesis de cDNA a través del diseño de oligonucleótidos para amplificar los diferentes serotipos de cepas sintomáticas y asintomáticas. Cuando se analizó la secuencia de aminoácidos de cada una de estas cepas, los resultados mostraron una mayor diferencia entre las cepas, ya que se observaron tres distintos modelos de secuencia. Donde tres de las cinco cepas sintomáticas presentaron una homología mayor del 94 % entre cada una de ellas, mientras que en las otras dos la homología fue mayor, ya que se ubicó arriba del 98% entre ellas, pero menor del 90 % entre las otras tres. Cuando se analizaron de la misma manera las cuatro cepas asintomáticas, estas presentaron una homología mayor del 95 % entre ellas pero menor del 77 % cuando se compararon contra las cepas sintomáticas. Aunque en estos estudios se refleja la diferencia en secuencia entre las cepas sintomáticas y asintomáticas, los resultados indicaron claramente que en las nueve cepas analizadas existen tres distintos alelos de VP4. Estos alelos están representados por la cepa Wa, cepa DS-1, y cepa ST-3 (Gorziglia et al., 1988).

Con los estudios de secuencia de las cepas conocidas, quedó claro que existen regiones con alta divergencia entre cepas, por tal motivo, los primeros análisis de la distribución de los alelos entre infantes infectados, se desarrollaron a partir de la producción de sondas específicas para cada alelo identificado. Los estudios realizados con estas sondas mostraron la predominancia de las cepas identificadas como Wa. Sin embargo, también fue posible identificar nuevos alelos entre la población infectada.

Con este tipo de estudios quedó claro el polimorfismo que existe entre las proteínas VP4 de las cepas de rotavirus. Sin embargo, para evitar confusiones en la nomenclatura de los alelos con respecto a los serotipos, se introdujo el término genotipo, junto con un sistema numérico para todos los genotipos identificados. Este sistema incluye el prefijo P por ser una proteína sensible a proteasa y el número encerrado en corchetes (Estes, 1989)

De esta manera, los genotipos derivados de las cepas Wa y DS1 fueron ubicados como P[8] y P[4] respectivamente, el genotipo derivado de la cepa M37 recuperado de neonatos con infección asintomática fue renombrado como genotipo P[6]. El derivado de la cepa K8 fue el genotipo P[9], mientras que el genotipo P[10] fue dado a las cepas 69 M. Un sexto genotipo de VP4 fue identificado por Gerna, por lo que el estudio de la variabilidad de esta proteína es importante desde el punto de vista epidemiológico.

Un dato importante que mostraron los estudios de campo sobre serotipo G y genotipos P, fue que con mayor frecuencia se observa una asociación entre ellos. De esta manera aunque es muy variado el modelo de combinación entre serotipo G y genotipo VP4, en la mayoría de los genotipos P se ha detectado en asociación con el serotipo G1.

Actualmente, se conocen 20 distintos alelos detectados por análisis de secuencia y/o RT-PCR (Santos et al., 1994; Sereno et. al., 1994;), donde el diseño de oligonucleótidos ha sido de gran valía para realizar estudios masivos de campo sobre la distribución de estos genotipos. De esta manera se ha demostrado que el genotipo p[8] seguido de P[4] son los que con mayor frecuencia se detectan entre la población infectada. Sin embargo, existen numerosas ocasiones en que no es posible detectar el genotipo principalmente por la presencia de mutaciones en la región de reconocimiento de los oligos. Lo que aunado a la frecuencia de mutación que ocurre entre las cepas durante la replicación, limita los estudios de campo.

Dificultando así el análisis completo de las cepas entre la población susceptible.

Por tal motivo para llegar a un control adecuado de este patógeno a través de la elaboración de una vacuna, es necesario realizar estudios moleculares que permitan tener un conocimiento más amplio del polimorfismo de estos virus desde el punto de vista antigénico y genético, así como de la inmunidad de anticuerpos neutralizantes que se generan durante la infección.

Vacunas

La presencia de epítopes de reacción cruzada sobre las proteínas VP7 y VP4 adquieren suma importancia cuando se estudia la respuesta inmunológica de anticuerpos con propósitos de establecer medidas preventivas por la vía de producción de vacunas.

En este sentido, diversos estudios en animales experimentales han mostrado que en una infección natural la respuesta de anticuerpos neutralizantes es efectiva, ya que la especificidad de esos anticuerpos puede ser medida por la prueba de neutralización de focos infecciosos y/o la de neutralización de reducción de placas (PRNT), las cuales se fundamentan en la neutralización de las cepas rotavirus por los anticuerpos producidos en el individuo infectado, lo que indica que estos anticuerpos se encuentran en niveles protectores.

Estos resultados fueron la base para estimular la producción de vacunas contra rotavirus. La primera estrategia que se utilizó fue la de producir una vacuna jenneriana, esto es, aprovechar los serotipos de los rotavirus animales para inducir la protección contra rotavirus humanos, disminuyendo la probabilidad de inducir una gastroenteritis por el hecho de utilizar una cepa inocua para los humanos. Los primeros estudios se desarrollaron en ganado vacuno gnobiótico. La estrategia utilizada fue la de inocular *in utero* a embriones vacunos libres de patógenos con

la cepa de rotavirus bovino denominada NCDV, esta cepa presenta un serotipo G6,P6 y por lo tanto no corresponden a los serotipos con mayor predominancia entre la población humana, lo que de inicio ya es una limitante para la protección de infantes. Después del nacimiento, estos animales se inoculaban con la cepa patógena y como se esperaba, no se enfermaban de gastroenteritis, caso contrario a los controles que no recibieron la inmunización *in útero*. Esto condujo a probar esta misma cepa de rotavirus en una cepa distinta al ganado vacuno, y con la misma estrategia de la inoculación *in útero* se probó su capacidad de proteger cerdos gnobióticos, los cuales mostraron una disminución considerable en la excreción de rotavirus, inclusive cuando se retaban con diferentes rotavirus humanos (Wyatt et al., 1975; Zissis et al., 1983).

Estos resultados, fueron la base para preparar la primera vacuna contra rotavirus, la cual fue atenuada a través de diversos pasajes en células de riñón bovino fetal (FBK) y posteriormente en células de riñón de mono *Cercapithecus* (Delem et al., 1984). En total, se realizaron 9 estudios para evaluar esta vacuna, cinco en Finlandia, uno en Arizona, uno en Gambia, uno en Rwanda y uno en Perú con un total 1310 muestras analizadas en los nueve estudios. Aunque los resultados de uno de estos estudios muestran que en Finlandia hubo una buena protección contra la diarrea severa, en la mayoría de ellos se observan diferencias significativas en la protección de los infantes con respecto a los placebos, ya que existieron casos donde la vacuna fue totalmente ineficiente (DeMol et al., 1986). Mientras que en otros, mostraron una protección parcial entre la población susceptible, principalmente por la condición monovalente de la vacuna y la presencia predominante del serotipo G1 entre la población estudiada, factores que influyeron en una protección limitada con una respuesta predominantemente homotípica (Vesikari et al., 1991; Vesikari, et al., 1993) .

Al igual que la vacuna a base de NCDV, dos vacunas monovalentes se prepararon a partir de cepas rotavirus de mono Rhesus (RRV), y cepas de rotavirus bovino (WC3) (Bernstein et al., 1990; Bernstein et al., 1995). Las características

serológicas es que la cepa WC3 es serotipo G6, mientras que RRV pertenece al serotipo G3 el cual es uno de los cuatro serotipos predominantes en los brotes epidémicos. Los resultados de los estudios de vacunación en infantes de distintas localidades fueron similares a los obtenidos con la cepa NCDV en el sentido de proveer una protección parcial. Sin embargo, aunque la respuesta predominante fue homotípica, en algunos casos se observó una respuesta heterotípica preferentemente contra el serotipo G1 y G4 (Vesikari et al., 1990).

La observación de que la respuesta heterotípica es limitada con las vacunas monovalentes condujo a desarrollar la siguiente estrategia en la producción de vacunas pero con la obtención de cepas rearreglantes. Estas cepas se preparan en cultivos celulares los cuales son infectados a la vez (coinfección) con distintos serotipos G. El objetivo de esta co-infección es producir una cepa que contenga las proteínas de superficie con distintos serotipos de tal manera que puedan inducir la producción de anticuerpos neutralizantes contra esos diferentes serotipos y por lo tanto ampliar el rango de protección (Gorrell et al. 1997). Al inicio, se produjeron cepas rearreglantes monovalentes aprovechando la condición atenuada de la cepa vacunal RRV para obtener tres distintas cepas que expresaron en su superficie una VP7 con los serotipos G1(D), G2 (DS1) y G4 (ST3) humano (Rennels et al., 1996; Lanata et al., 1992).

Para determinar la eficiencia de las vacunas rearreglantes a base de RRV con los distintos serotipos humanos, se desarrollaron pruebas en infantes menores de seis meses para determinar los efectos secundarios, la inmunogenicidad y la excreción de partículas virales. La estrategia que se utilizó para probar estas vacunas fue comparar la respuesta a RRV y a las cepas rearreglantes en tres diferentes estudios. En el primero se administró solo RRV o la vacuna monovalente reareglante denominada D X RRV la cual expresa la proteína VP7 con serotipo G1, en un segundo estudio la administración fue la combinación de dos cepas monovalente rearreglante, la D X RRV (serotipo G1) y la DS1 X RRV (serotipo G2), mientras que en el tercer estudio se administró al infante una combinación de

RRV (serotipo G3) con dos vacunas monovalentes rearreglantes, la D X RRV (Serotipo G1) y DS1 X RRV (serotipo G2) (Lanata et al., 1992; Madore et al., 1992; Vesikari et al., 1992). Los resultados de estos estudios muestran diferencias en la respuesta de anticuerpos ya que sólo la cepa rearreglante DS1 X RRV indujo una producción de anticuerpos en un rango cercano al 70 % de los infantes inmunizados, mientras que en los otros estudios, la producción de anticuerpos fue similar a los inducidos por la cepa vacunal RRV con fuertes variaciones dependiendo de la cepa de rotavirus presente en el brote epidémico (Madore et al., 1992; Lanata et al., 1992).

Después de los estudios con las vacunas rearreglantes monovalente, se realizaron preparaciones tetravalentes que contenían cantidades similares de unidades formadoras de placa (UFP) de cada una de estos rearreglantes. Es decir, esta nueva preparación representaba juntos los cuatro serotipo G más importantes (G1-G4) y objetivo fue comparar su eficiencia con los resultados obtenidos en las muestras de campo con las vacunas monovalentes. Por tal motivo, el siguiente paso fue inmunizar a los infantes con una vacuna tetravalente.

Aunque la aplicación de esta modalidad de vacuna indujo una reacción febril similar a la provocada por las vacunas monovalentes (Flores et al., 1990), la respuesta de anticuerpos se incrementó para cada uno de los cuatro serotipos de los cuales estaba formada la vacuna (Perez-Schael et al., 1990)). Sin embargo estos resultados sólo fueron ciertos para todas las regiones donde se probó. Ya que con esta misma preparación en infantes peruanos, la protección fue relativamente limitada ya que en menos del 50% de los infantes se observó seroconversión (Lanata et al., 1992).

Por lo tanto, para evaluar la eficacia de la vacuna tetravalente y determinar la correlación serológica de la inmunidad contra la infección por rotavirus, se realizaron cuatro estudios, dos de los cuales se llevaron a cabo en los Estados Unidos (Rennels et al., 1996; Santosham et al., 1997), uno en Finlandia (Joensuu

et al., 1997) y otro en Venezuela (Perez-Schael et al., 1997). Los resultados de los cuatro estudios fueron similares en el sentido de que demostró una eficiencia del 70 al 100% para prevenir la severidad de la diarrea. Sin embargo es importante resaltar que la evaluación de la vacuna no incluyó un estudio preliminar de la inmunidad en los infantes vacunados, ni tampoco el estudio de los epítopes a los cuales va dirigida esta inmunidad de anticuerpos por lo que únicamente se realizó a nivel del serotipo infectante. No obstante, la vacuna fue efectiva al disminuir la duración de la enfermedad con respecto a los placebos, inclusive cuando el serotipo infectante fue distinto al serotipo predominante G1. Lo que indujo a su aplicación de forma masiva para prevenir la gastroenteritis por rotavirus.

Por consecuencia, después de los estudios donde se analizaron los efectos secundarios y la respuesta de anticuerpos, esta vacuna fue recomendada para infantes en edades de dos, cuatro y seis meses con tres dosis por la American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases en 1998. De esta manera se administraron 1.5 millones de dosis desde septiembre de 1998 hasta julio de 1999, cuando se pospuso la utilización de esta vacuna tetravalente por la provocación de intosusepción en 15 infantes que recibieron la vacuna (Centers for Disease Control and Prevention, 1999). Posteriores estudios para determinar la magnitud de estos efectos secundarios mostró un riesgo elevado para contraer este síndrome entre los infantes inmunizados preferentemente entre los tres y catorce días posvacunación (Hwa-Gan et al., 2001; Murphy et al., 2001), por lo que fue suspendida la licencia para inmunizaciones masivas.

Inmunidad

No obstante que se han desarrollado esfuerzos en la elaboración de una vacuna efectiva e independientemente de los efectos secundarios por los cuales la vacuna tetravalente fue retirada para inoculaciones masivas, la principal limitante a la que se ha enfrentado la producción de este biológico han sido la falta de reproducibilidad de una buena protección inmunológica entre poblaciones de

diferentes regiones del mundo. Por tal motivo, para obtener una vacuna que mejore la producción de anticuerpos neutralizantes antirotavirus, se requiere realizar un estudio exhaustivo para entender la inmunidad que se genera contra rotavirus preferentemente cuando infecta de manera natural a los infantes.

En este sentido, diversos estudios han mostrado en animales tanto experimentales como en aquellos que se infectan de manera natural, que la respuesta de anticuerpos puede ser muy importante en la neutralización y eliminación del virus (Richardson et al., 1993).

Aunque estos estudios se han dirigido para las dos proteínas de superficie de los rotavirus VP7 y VP4, donde los resultados con VP7 estimularon la producción de vacunas a base de esta proteína, existe evidencia que una mejor inmunidad puede estar dirigida principalmente contra la proteína VP4 (Ward et al., 1993), y considerando que el serotipo predominante de esta proteína (P1A) se encuentra en combinación con diversos serotipo G, adquiere importancia el realizar una caracterización molecular en muestras de campo directamente en infantes infectados y determinar el papel que juega esta proteína en el establecimiento de una respuesta inmune.

Los estudios iniciales en el entendimiento de esta proteína incluían la determinación del serotipo P. Sin embargo, la falta de suficientes anticuerpos monoclonales específicos de serotipo, y el requerimiento de adaptar a las cepas de campo a crecer en cultivo de células, limitaron el número de virus que se pudieron analizar. Por tal motivo, todavía en la actualidad es muy pobre el conocimiento de la diversidad de los serotipos P en una comunidad particular, por lo que a su vez no existen suficientes datos de los epítopes presentes en la proteína VP4 ya que sólo unos pocos laboratorios cuentan con anticuerpos monoclonales para realizar esta tarea (Coulson et al., 1993). Por otro lado, el análisis por RT-PCR del gene de VP4 el cual se ha establecido como un método de tipificación, tiene el inconveniente de que no necesariamente refleja la

diversidad antigénica de la proteína, por lo las cepas con el mismo genotipo pueden tener variaciones en la especificidad de los anticuerpos inducidos (Masendycz et al., 1997).

La información obtenida de diversos estudios, indica que hasta un 70% de las infecciones por rotavirus en niños menores de dos años son de tipo sintomático. Lo anterior refleja que un alto porcentaje de las infecciones cursan de manera asintomática. Asimismo, se ha observado que los virus que infectan neonatos en las maternidades tienden a persistir en el tiempo y ser distintos de las cepas que circulan en la comunidad. En dos estudios independientes, se concluyó que estas cepas que infectan neonatos de manera asintomática eran genéticamente distintas de las cepas de rotavirus aisladas de niños mayores de tres meses de edad con infecciones sintomática. Esta observación sólo involucró al gen 4 que codifica la proteína VP4 como el gen responsable del fenotipo atenuado. Por lo que cobró importancia el estudio de las cepas con esta atenuación para la prevención de la enfermedad (Flores et al., 1986; Gorziglia et al., 1988). Sin embargo actualmente no existe suficiente evidencia de que las infecciones asintomáticas sea producto de una cepa con estas características o a la condición fisiológica de los infantes infectados.

Por otro lado, en las infecciones de tipo sintomático, estos estudios también indican que los infantes adquieren inmunidad protectora contra las infecciones por rotavirus aproximadamente a los tres años de edad. Aunque es muy difícil el determinar con precisión el número total de infecciones por rotavirus que los niños sufren durante este periodo, es probable, de acuerdo a los datos obtenidos de diferentes estudios longitudinales prospectivos, que la infección de tipo sintomática se establece por varios serotipos durante esos primeros tres años de vida. Sin embargo, Estos estudios también sugieren que durante ese tiempo la protección contra varios serotipos se puede establecer por la inducción de una inmunidad heterotípica (Brussow et al., 1988; Brussow et al.1991; Matson et al., 1992).

En este sentido, la información obtenida ha mostrado que las infecciones por rotavirus pueden inducir anticuerpos neutralizantes dirigidos contra el serotipo de la cepa infectante (homotípicos), así como contra otros serotipos (heterotípicos). Se ha reportado, que tanto VP4 como VP7 tienen epitopes que inducen anticuerpos que son capaces de neutralizar a más de un serotipo. Sin embargo de acuerdo a previos estudios en nuestra región, parece ser que VP4 es la proteína más importante en esta respuesta de anticuerpos neutralizantes, ya que, aunque se han encontrado varios serotipos entre los infantes infectados, existe la prevalencia del serotipo P1A en mayor proporción que cualquiera de los serotipos G, ya que la presencia de este serotipo fue detectado en más del 70% de los casos analizados. Por lo que es probable que esta proteína sea responsable de una respuesta heterotípica hacia varias cepas de rotavirus en una infección natural (Contreras et al., 1995).

Estudios en humanos y modelos animales también apoyan a la proteína VP4 como la más inmunodominante, ya que a pesar de que ambas proteínas (VP4 y VP7), tienen la capacidad de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes en forma independiente, al parecer esta respuesta no se produce en la misma magnitud, ya que mientras en humanos adultos después de la administración de una cepa patógena de rotavirus, cerca del 80 % de los anticuerpos producidos presentaron especificidad hacia VP4, en infantes, después de la administración oral de dos cepas atenuadas fue posible detectar en el suero anticuerpos exclusivamente con especificidad a la proteína VP4 (Ward et al., 1988; Vesikari et al., 1993).

De igual forma, Estudios por ELISA de competencia indican que anticuerpos anti VP4, además de proteger contra la cepa homóloga, también dejan protección contra otras cepas de serotipo diferente. Aunque los resultados obtenidos permitieron establecer una estrategia inicial de inmunización con miras a la protección heterotípica, utilizado virus rearreglantes conteniendo las dos proteínas, en realidad no está del todo claro el papel que juegan cada una de estas proteínas

en el establecimiento de la respuesta de anticuerpos neutralizantes.

Por tal motivo para entender las bases moleculares de esta respuesta heterotípica en una infección natural por rotavirus, se requiere realizar una búsqueda efectiva de las variantes antigénicas y genéticas de las cepas infectantes, así como determinar la especificidad de los anticuerpos neutralizantes que se producen contra estas cepas, con el objetivo de definir los principales epítopes que son responsables del establecimiento de una inmunidad duradera.

OBJETIVOS

- ❖ **Evaluar el polimorfismo genético de las cepas de rotavirus aisladas durante el periodo de estudio**
- ❖ **Caracterizar los epítopes predominantes de la proteína VP4 de las cepas de estudio**
- ❖ **Establecer la correlación entre los epítopes predominantes y la especificidad de la respuesta inmune de anticuerpos neutralizantes**

MATERIAL Y MÉTODO

Muestra de pacientes:

Las muestras fecales que se utilizaron en el presente estudio, fueron colectadas sin conservador en diferentes brotes epidémicos desde 1995 al 2000. Estas muestras se tomaron de 1200 infantes menores de dos años de edad, los cuales fueron hospitalizados por gastroenteritis aguda en diversos hospitales del área metropolitana de Monterrey, N.L. Después de la colecta, se preparó una suspensión fecal del 10 al 20 % en buffer salino de fosfatos (PBS) y se mantuvo en congelación hasta su utilización para la detección del genoma de rotavirus.

Extracción de RNA viral

La extracción del RNA de doble cadena, se realizó mediante una versión modificada reportada previamente (Herring et al., 1982). Para tal efecto, se utilizaron doscientos microlitros de la suspensión fecal y se homogenizaron con un volumen igual de una suspensión amortiguadora de Tris base conteniendo dodecil sulfato de sodio (SDS) con el propósito de romper la integridad de la cápside del virus y β -mercaptoetanol como agente reductor. La extracción del RNA viral, se realizó por el método de fenol – cloroformo el cual es efectivo para desnaturalizar las proteínas del virus y liberar el genoma de RNA de doble cadena. Después de la centrifugación a 14,000 rpm por 5 minutos, la fase acuosa con el RNA de doble cadena se precipitó con etanol absoluto manteniéndose durante toda la noche a – 20 °C. Después de centrifugar a 14,000 rpm por 15 minutos, la pastilla del RNA se secó por 15 minutos en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar y se resuspendió en 20 μ l de agua nanopura estéril. Ésta se mantuvo en congelación hasta su utilización.

Detección del RNA viral y electroferotipos

La detección del genoma viral se realizó mediante electroforesis en un sistema continuo de geles de poliacrilamida al 10 % a 100 voltios constantes durante 4 horas a temperatura de laboratorio. Después de la electroforesis el gel se tificó con nitrato de plata y se reveló en condiciones básicas con hidróxido de sodio 10 M y formaldehído (Herring et al. 1982). Para la detección del modelo de migración de los genes cognato y los electroferotipos, la electroforesis se realizó en geles al 12 % y se modificó el voltaje a 80 voltios durante 6 horas para una mejor separación de los segmentos génicos.

Genotipos de VP4

El genotipo de VP4 de las cepas de rotavirus fue determinado en una selección de virus aislados donde se consideraron tres criterios: a) se seleccionaron todas las cepas con diferente modelo de migración del genoma c) se seleccionó una muestra representativa de los electroferotipos largos y d) se analizaron todas las cepas aisladas con electroferotipo corto para su genotipificación.

El genotipo de las cepas virales se determinó, con ciertas modificaciones de acuerdo al método descrito previamente por Gentsch (Gentsch et al., 1992). Para la genotipificación, el RNA de las cepas de rotavirus se extrajo por el método de TRIZOL de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, seguida por una precipitación con etanol. La pastilla del RNA genómico se obtuvo después de secar durante 30 minutos en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar y posteriormente fue resuspendida en 20 μ l de agua nanopura y mantenida en congelación hasta su utilización.

Antes de realizar el proceso de retrotranscripción, se determinó la concentración y pureza del RNA genómico en un espectrofotómetro Shimadzu UV mini 1240 a una longitud de onda 260 y 280 nanómetros. La pureza se determinó por la relación

de la absorbancia a 260 nanómetros entre la absorbancia a 280 nanómetros, donde una buena pureza de RNA es aquella que presenta una relación mayor de 1.8

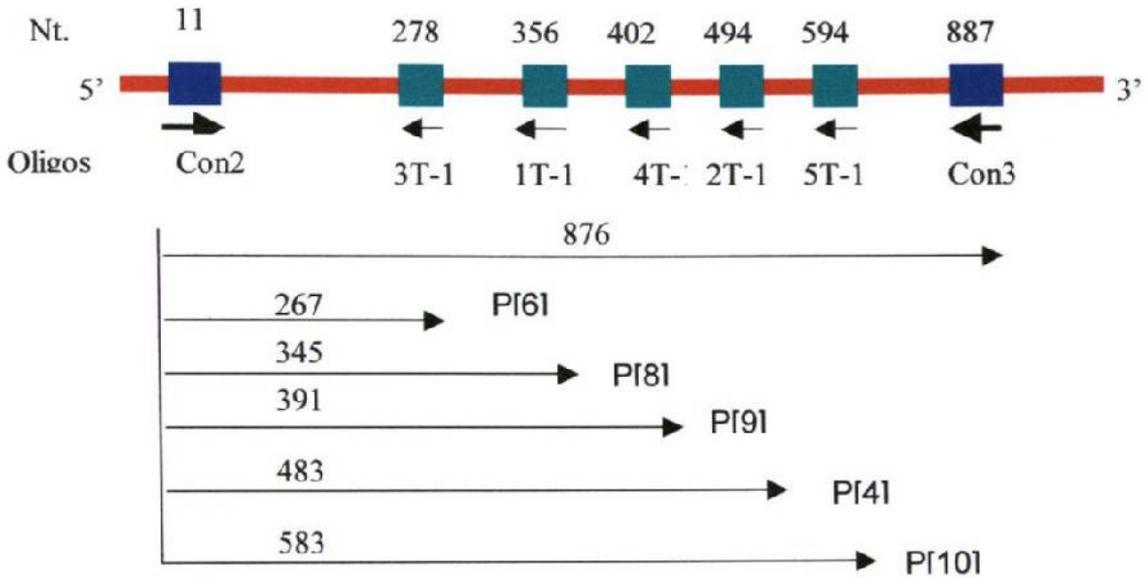
La concentración del RNA genómico se realizó de acuerdo a la formula

Concentración del ácido nucleico ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

$A_{260} \times 50 \times \text{dilución}/1000$

donde 50 es una constante para el RNA de doble cadena

El RNA purificado con una pureza mayor de 1.8, fue sujeto a una transcripción reversa con la retrotranscriptasa Super Script II, a 42 °C por 30 minutos en la presencia de los oligonucleótidos Con2 y Con3, donde con 2 reconoce una región de 20 nucleótidos en la posición 868 a 887 y Con3 se alinea en la posición 11-32 nucleótidos (nt) en el extremo 5'. Después de la retrotranscripción, el cDNA producido, se amplificó en un termociclador Hybay durante 30 ciclos a 95 °C por 30 segundos para desnaturalizar el cDNA, 42 °C por 30 segundos para el alineamiento de los oligonucleótidos y después a 72 °C por 40 segundos para la extensión de las cadenas. Posteriormente se realizó una segunda amplificación semianidada utilizando los oligonucleótidos 1T1, 2T1, 3T1, 4T1 y 5T1, los cuales son específicos para identificar los genotipos P[8], P[4], P[6], P[9], y P[10] respectivamente dentro de la región de VP8, la cual es divergente en los distintos alelos de VP4 pero conservada dentro de los miembros del mismo genotipo. Los fragmentos esperados con estos oligonucleótidos corresponden a bandas de 345 (1T1), 483 (2T1), 267 (3T1), 391 (4T1) y 583 (5T1) nucleótidos respectivamente, como se ilustra en la siguiente figura.



Transcripción reversa

A continuación se detallan los reactivos y concentraciones utilizados en la transcripción inversa.

Se prepara la siguiente mezcla maestra 1 X en un tubo eppendorff de 500 μ l

- 2.0 μ l Buffer RT 5X (Tris-HCl 250 mM; MgCl₂ 40 mM; KCL 150 mM; DTT 5 mM; pH 8.5).
- 1.0 μ l MgCL₂ 25 mM
- 3.2 μ l dNTPs 2.5 mM cada uno (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
- 0.1 μ l Transcriptasa inversa 200 u/ μ l

Total 6.3 μ l

Adicionalmente se prepara en un tubo de 0.5 μ l la siguiente mezcla de reacción

- 2 μ l RNA de doble cadena
- 1 μ l Oligonucleótido negativo (1 μ M)

0.7 μ l Agua nanopura.

Se calienta a 95 °C durante 5 minutos y se transfiere inmediatamente a hielo

Se mezcla perfectamente con 6.3 μ l de la mezcla maestra y se incuba por 30 minutos a 42 °C y posteriormente 5 minutos a 94 °C. El Volumen final de reacción es de 10 μ l

Primera amplificación, reacción PCR-1

En la primera amplificación para obtener el segmento de 876 pb se preparó la siguiente mezcla de reacción.

1.0 μ l	RT-cDNA
6.75 μ l	Agua nanopura
1.25 μ l	Buffer 10X (Tris-HCl 100 mM, MgCl ₂ 15 mM, KCl 500 mM, pH 8.3)
0.5 μ l	MgCl ₂ (25 mM)
0.25 μ l	Con3 (25 μ M)
0.25 μ l	Con2 (25 μ M)
2.0 μ l	DNTPs (2.5 mM)
0.5 μ l	Taq polimerasa (1u/ μ l)

Volumen final 12.5 μ l

GENOTIPIFICACIÓN, Reacción semianidada PCR II

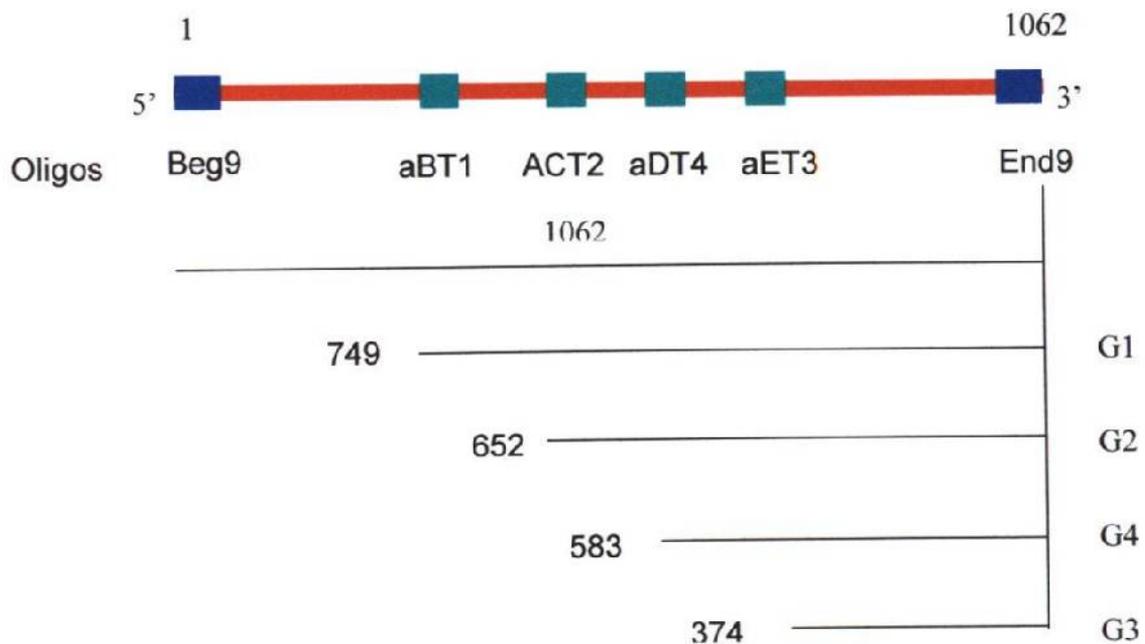
Para determinar el genotipo de las cepas de estudio, se preparó la siguiente mezcla de reacción.

0.2 μ l	Producto de PCR-I
7.425 μ l	Agua nanopura
1.25 μ l	Buffer 10X (Tris-HCl 100 mM, MgCl ₂ 15 mM, KCl 500 mM, pH 8.3)
0.125 μ l	MgCL ₂
0.5 μ l	Con3 (25 μ M)
0.5 μ l	1T-1 (25 μ M)
2.0 μ l	dNTPs
0.5 μ l	taq polimerasa (1u/ μ l)

Volumen final 12.5 μ l

Genotipo VP7

Para la determinación del genotipo de la proteína VP7 se utilizó el mismo protocolo que para VP4 (Gentsch et al.1992). Los oligonucleótidos utilizados para la primera amplificación son Beg 9 y End 9 que corresponden a la posición 1-28 en el extremo 5' y 1062 a 1036 en el extremo 3' respectivamente, por lo que se espera una banda de 1062 pb. Con respecto a la PCR semianidada, se utilizaron los oligonucleótidos aBT1, aCT2, aDT4 y aET3 cuyas posiciones corresponden a 314-335 (aBT1), 411-435 (aCT2), 480-498 (aDT4) y 689-709 (aET3) con bandas esperadas de 749, 652, 583 y 374 nucleótidos respectivamente de acuerdo a la siguiente figura.



Polimorfismo entre genotipos

Para determinar si entre los genotipos identificados existe polimorfismo genético, se realizó un sistema de SSCP (Single Strand Conformacional Polimorphism) de acuerdo al método descrito previamente con ciertas modificaciones. Para este análisis se utilizaron los productos obtenidos por RT-PCR para detectar el polimorfismo conformacional de cadenas simples del DNA amplificado (Sekiya et al, 1993). El protocolo consistió en preparar 10 μ l de una dilución 1:10 del producto de PCR en formamida, se calentó a 95 °C por 5 minutos y rápidamente se pasó a hielo y se mantuvo a -20 °C hasta su utilización. Un microlitro de esta suspensión se cargó en un gel de poliacrilamida al 10%. El corrimiento electroforético se realizó a 100 voltios constantes en una mini cámara de electroforesis vertical Hoefer Scientific Instruments modelo SE250 durante cuatro horas manteniendo la temperatura por debajo de los 20 °C. Las bandas se tiñeron con nitrato de plata y se revelaron en formaldehído e hidróxido de sodio.

Serotipos G.

Un panel de anticuerpos monoclonales específicos de serotipos de VP7, se utilizaron para determinar el serotipo de las cepas aisladas a través de un sistema inmunoenzimático de emparedado directo. Estos anticuerpos fueron proporcionados gentilmente por el Dr. Carlos Arias del Instituto de Biotecnología, UNAM. Esos anticuerpos incluyeron 5E8 (específico para serotipo G1), 1C10 (serotipo G2), 159 (serotipo G3), ST-2G7 (serotipo G4). En este estudio también se utilizó como control el anticuerpo monoclonal 129, el cual detecta los diferentes serotipos G estudiados (G1-G4). Para la prueba de ELISA se utilizó el método de Padilla-Noriega, donde microplacas de 96 pozos se sensibilizaron toda la noche a 4 °C con 75 μ l de una dilución de 1:2000 en PBS para los anticuerpos de captura

5E8 y 1C10, una dilución de 1:5000 para el anticuerpo 129, y una dilución 1:10000 para los anticuerpos 159 y ST-2G7 (Padilla-Noriega 1990).

Después de lavar con PBS-Azida (todos los lavados fueron con esta solución), las placas se bloquearon con suero fetal de bovino al 5 % en PBS-Azida. Después de la incubación de una hora a 37 °C, se adicionaron 75 µl de la suspensión al 5% de muestra de heces en una solución de suero fetal de bovino (SFB) al 5 % en PBS-azida y 75 µl del sobrenadante de un lisado de células infectadas con las cepas de referencia Wa, S2, Price y ST3 las cuales presentan los serotipos G1 al G4 respectivamente y que fueron utilizadas como controles positivos. Las placas se incubaron 1:30 hrs a 37 °C. Después del lavado de las placas se adicionaron 75 µl de una dilución 1:2500 de un suero hiperimmune antirotavirus producido en conejo. Las placas se incubaron 1 hora a 37 °C para permitir que el anticuerpo se una a la partícula de virus capturada. Después de cuatro lavados, se adicionaron 75 µl de un anticuerpo antirotavirus producido en cabra y conjugado con fosfatasa alcalina. Después de la incubación a 37 °C por una hora, las placas se lavaron y a cada pozo se le adicionó 75 µl del sustrato p-Nitrofenil fosfato disodio diluido en amortiguador dietanolamina pH 9.8. Posterior a un periodo de incubación de 45 minutos, se registró la absorbancia a 405 nanómetros en un micro lector de ELISA. Las lecturas con una diferencia de absorbancia de 0.2 con respecto al control fueron consideradas positivas.

Serotipo P

El ensayo de ELISA para tipificar VP4 se realizó como se describe previamente para VP7 (Padilla-Noriega et al, 1993). Los anticuerpos para capturar el antígeno viral correspondieron a F45:4, 1A10, 2A3, y 2G1 (serotipos P1A), RV5:2 (serotipo P1B), HS6, HS9, HS10, HS11, y ST3:3 (Serotipo P2), 2G1 (serotipo P3). Para la detección de las cepas negativas con estos anticuerpos, se utilizó el anticuerpo YO-2C2 que detecta cepas con diferente serotipo P. Las cepas de referencia

fueron las mismas que para la determinación del serotipo G: cepa Wa serotipo P1A, S2 serotipo P1B, Price serotipo P1A, ST3 serotipo P2. al igual que en los serotipos G, las lecturas con una diferencia de absorbancia de 0.2 con respecto al control fueron consideradas positivas.

Epitopes de VP4

La presencia de epitopes sobre la proteína VP4 se realizó a través del sistema de ELISA de acuerdo al método de Padilla-Noriega (Padilla Noriega et al.1993). Los anticuerpos monoclonales utilizados correspondieron a F45:4, 1A10, 2A3, y 2G1, RV5:2, HS6, HS9, HS10, HS11, y ST3:3 los cuales fueron previamente producidos para diferentes serotipos P. Estos anticuerpos fueron utilizados a diferentes diluciones para sensibilizar las microplacas de ELISA de 96 pozos. Las diluciones correspondieron a 1:2000 (F45:4), 1:200 (1A10), 1:2000 (2A3), 1:2000 (2G1) 1:4000 (RV5:2), 1:8000 (HS6), 1:2000 (HS9), 1:2000 HS10, y 1:2000 (ST3:3). Después de lavar las placas con PBS-azida, se adicionó 75 μ l de suero fetal de bovino al 5 % en PBS-Azida para bloquear los espacios libres de anticuerpos. Después de la incubación de una hora a 37 °C, se adicionaron 75 μ l de la suspensión de virus en suero fetal de bovino al 5 % en PBS-azida, como control positivo se utilizó 75 μ l del sobrenadante de un lisado de células infectadas con las cepas de referencia Wa, S2, Price y ST3 las cuales presentan los serotipos P1A (Wa), P1B (S2), P1A (Price) y P2 (ST3) respectivamente. Las placas se incubaron 1:30 hrs a 37 °C. Después del lavado de las placas se adicionaron 75 μ l de una dilución 1:2500 de un suero hiperinmune antirotavirus producido en conejo. Las placas se incubaron 1 hora a 37 °C para permitir la interacción del anticuerpo con la partícula de virus capturada. Después de cuatro lavados, se adicionaron 75 μ l de un anticuerpo antirotavirus producido en cabra y conjugado con fosfatasa alcalina. Posterior a la incubación a 37 °C por una hora, las placas se lavaron y a

cada pozo se le adicionó 75 μ l del sustrato p-Nitrofenil fosfato disodio diluido en buffer dietanolamina pH 9.8. Posterior a un periodo de incubación de 45 minutos, se registró la absorbancia a 405 nanómetros en un microlector de ELISA. El criterio utilizado para considerar la presencia de uno o varios epitopes sobre la proteína VP4, fue cuando el valor de la absorbancia a 405 nanómetros dada por la reactividad de un anticuerpo monoclonal fue igual o mayor de 0.4, y la presencia de un segundo o tercer epitope sobre la misma proteína VP4 se consideró positiva cuando otro u otros anticuerpos reaccionaron con el mismo virus y que daban una absorbancia mayor de 0.2. Valor que a su vez correspondía a más de la mitad de la máxima absorbancia registrada por el principal anticuerpo.

Pacientes y suero

Para el presente estudio, se colectaron 70 sueros de fase aguda y convaleciente de infantes menores de dos años que fueron hospitalizados por un cuadro agudo de gastroenteritis. Los sueros de fase aguda se colectaron de 1 a 3 días después de los síntomas y los sueros de fase convaleciente de 3 a 4 semanas después de la primera toma. Todos los sueros se mantuvieron en congelación hasta su utilización.

Virus y titulación de focos infecciosos

Las cepas de rotavirus utilizadas para cuantificar los anticuerpos neutralizantes correspondieron a Wa (G1, P1A), S2 (G2,P1B) Price (G3,P1A) y ST3 (G4,P2). Previamente estas cepas se utilizaron para realizar una titulación de focos infecciosos con el objetivo de tener una comparación en la reducción de focos infecciosos durante la cuantificación de anticuerpos neutralizantes (Arias et al., 1994). A placas de 96 pozos se adicionaron 90 μ l de MEM sin suero y a partir de una dilución 1:5 de la cepa viral activado con tripsina, se realizaron diluciones al doble. Placas de 96 pozos con células MA104 confluentes y lavadas con PBS se les adicionó 100 μ l de MEM sin suero y 50 μ l de cada dilución de virus por

duplicado. Se incubaron por 14 horas a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% y después de dos lavados con PBS las células se fijaron con 150 ml de una solución acetona-PBS (80:20). Después de lavar con PBS, se adicionaron 75 µl del anticuerpo anti YM producido en conejo. Se incubó a 37°C durante 1:30 hrs y se detectó el anticuerpo con un conjugado proteína A-peroxidasa. Posterior a las mismas condiciones de incubación, la enzima fue detectada al adicionar 75 µl de sustrato preparado con carbazol en buffer de acetatos 1X y peróxido de hidrógeno. El título de focos infecciosos se obtuvo al realizar una lectura microscópica de las placas a 20X.

Cuantificación de anticuerpos neutralizantes

Los títulos de anticuerpos neutralizantes en los sueros de fase aguda y convaleciente de los niños infectados se midieron por la prueba de reducción de focos infecciosos (Padilla-Noriega et al, 1998). El título de anticuerpos neutralizantes en las muestras de suero se definió como la dilución mas alta del suero donde se apreció una reducción de al menos el 60 % en el número de las células infectadas cuando se compararon con los controles donde se utilizó PBS en lugar de suero agudo o convaleciente. Para una mejor lectura y para la comparación de los focos infecciosos, se utilizó una cepa de referencia con serotipos conocidos a una dilución donde se produjeran de 150 a 200 focos infecciosos. Después de la activación de estas cepas se les adicionó con un volumen igual de diferentes diluciones de los sueros de fase aguda o convaleciente y se procedió a la detección del antígeno viral sobre la monocapa de células utilizando de manera secuencial anti YM, proteína A- peroxidasa- sustrato.

Especificidad de los anticuerpos neutralizantes

Para determinar la respuesta de anticuerpos hacia las proteínas de superficie VP4 y VP7, se utilizó la misma metodología de reducción de focos infecciosos solo que en lugar de cepas de referencia se utilizaron cepas rearreglantes que presentaban estas dos proteínas con diversos orígenes. Para la detección de VP7 se utilizaron las cepas que expresaban en su superficie VP7 humana y VP4 de cepas de origen animal y viceversa, cuando el objetivo fue determinar la respuesta de VP4 (Padilla-Noriega et al, 1998).

Sistema de ELISA de competencia

Los anticuerpos monoclonales utilizados para la prueba de bloqueo de ELISA fueron 5E8 y 2C9 (específico de G1), 2F1 (Específico de G2), 4F8 (específico de G3), ST-2G7 (específico de G4), y 2A4 (heterotípico para G1 y G3). Los anticuerpos monoclonales para VP4 fueron 1A10 (derivado del serotipo P1A cepa Wa; RV5:2, (derivado del serotipo P1B cepa RV5) y HS6, derivado del serotipo P2A cepa ST3. Estos anticuerpos monoclonales previamente se demostró que son específicos contra cepas de rotavirus recuperadas de humanos con el mismo serotipo del virus inmunizante (serotipo P1A, P1B, o P2A). Además, se utilizó el anticuerpo de reacción cruzada 1E4, derivado del serotipo P1A cepa Wa, y YO-2C2, derivado derivado del serotipo P1A cepa YO, los cuales neutralizan tanto cepas de rotavirus con serotipo P1A como P2A.

Para la determinación de los epitopes inmunodominantes se realizó una ensayo de bloqueo de ELISA previamente descrito por Shaw con ciertas modificaciones (Shaw et al 1987). placas de 96 pozos fueron sensibilizadas toda la noche a 4 °C con una dilución óptima en PBS de los anticuerpos mencionados. Las placas se lavaron dos veces con PBS-azida y se bloquearon toda la noche a 4 °C con 10%

de SFB en PBS-azida. Posteriormente se lavó dos veces con PBS-azida y se añadió virus homotípico el cual previamente se incubó toda la noche con diluciones seriadas (1:25 to 1:1,600) del suero de fase aguda o convaleciente de los pacientes. Después de tres horas de incubación a 37 °C las placas se lavaron cuatro veces y se añadió un antisuero hiperinmune de conejo anti rotavirus Wa, DS1×RRV, RRV, and ST3 diluido 1:2500 en PBA-2.5% SFB. las placas se incubaron a 37 °C por 2 horas. Se lavaron cuatro veces y se incubaron con una dilución 1:1000 de un anticuerpo anti IgG conjugado con fosfatasa alcalina. Las placas se lavaron cuatro veces y la actividad de fosfatasa fue detectada al añadir el sustrato correspondiente. El título de anticuerpos específicos de epitope se definió como la dilución más alta del suero que dio una densidad óptica menor o igual al 50% del valor de los controles no bloqueados. Los virus homotípicos utilizados fueron Wa para anticuerpos 5E8, 2C9, 1A10, y 1E4; S2 para AcMs 2F1 y RV5:2; Price para AcMs 4F8, 2A4, y YO-2C2; y ST3 para AcMs ST-2G7 y HS6.

RESULTADOS

Como este estudio está enfocado a comprender las bases moleculares de la respuesta inmune que inducen las cepas de rotavirus en una infección natural. La estrategia que se siguió, fue analizar la epidemiología molecular de rotavirus durante diferentes brotes epidémicos para investigar las variedades antigénicas y genéticas que se presentan en nuestra región, así como la respuesta de anticuerpos ante una infección natural por rotavirus. El estudio de las variedades antigénicas incluyeron los serotipos G y P, así como los epítopes inmunodominantes presentes en estas proteínas. Por su parte, las variedades genéticas incluyeron, los electroferotipos, los modelos de migración de los genes cognato de rotavirus (electroforesis), los genotipos (RT-PCR), así como el polimorfismo entre los genotipos P detectados cuando se somete el DNA de doble cadena desnaturalizado a un sistema electroforético (SSCP). Para estudiar la respuesta inmune humoral, a una muestra representativa de los pacientes se les colectó suero de fase aguda y convaleciente con el objetivo de estudiar la especificidad de los anticuerpos anti proteína VP7 y VP4 y anti epítopes presentes en la proteína VP4. Lo anterior condujo a determinar el comportamiento de los rotavirus en nuestra región ya que se demostró la presencia de un epítipo inmunodominante que se mantiene entre la mayoría de las cepas estudiadas, así como a conocer que la especificidad de la respuesta inmune humoral puede ser inducida por cepas homólogas y heterólogas, pero sobre todo que esta respuesta inmune es capaz de amplificarse, ya que puede neutralizar cepas con diferente genotipo.

Epidemiología molecular de rotavirus

Electroferotipos

Un total de 1730 muestras fecales de infantes hospitalizados con síntomas de gastroenteritis fueron colectados entre octubre y febrero en diferentes brotes epidémicos. De estas, rotavirus estuvo presente en 733 (41%) muestras y la mayor frecuencia fue registrada en enero de cada temporada principalmente en niños menores de un año de edad, ya que estos representaron el 71% de todos los infantes analizados.

Para determinar la variabilidad genética de las cepas aisladas, se realizó un análisis en los niveles de RNA de doble cadena, cDNA y DNA de cadena sencilla a través de electroforesis en un sistema continuo de geles de poliacrilamida al 10%, RT-PCR en un sistema de dos pasos y SSCP para detectar el polimorfismo conformacional del DNA de cadena simple.

Los resultados de la electroforesis muestran la predominancia del electroferotipo largo (definido por la separación de los segmentos 10 y 11), ya que de las 733 muestras analizadas 719 (98%) correspondieron a este electroferotipo (figura 1 carriles 1 al 8), y 14 (2%) cepas mostraron electroferotipo corto, identificado por una menor separación de los segmentos 10 y 11 (figura 2 carriles 2, 7 y 8). El análisis de estos electroferotipos en las distintas temporadas de estudio, muestran la predominancia del electroferotipo largo en prácticamente todos brotes epidémicos

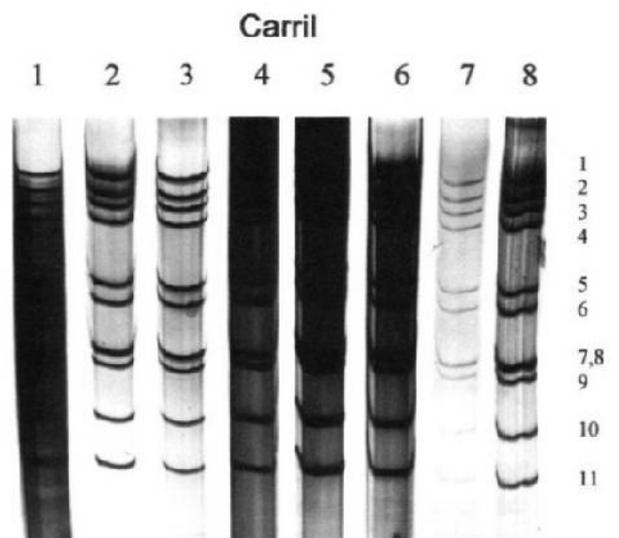


Figura 1: Perfiles electroforéticos de cepas de rotavirus mostrando los modelos de migración de sus genes cognato.

(figura 3) ya que sólo una cepa con electroferotipo corto fue detectada en 1993 y no se presentó otra cepa con esta característica hasta el brote epidémico 1999-2000, donde de 64 cepas estudiadas 53 (82%) mostraron electroferotipo largo, y 11 (18%) presentaron electroferotipo corto.

Ya que las proteínas de interés antigénico corresponden a VP4 y VP7 por ser las proteínas de superficie de rotavirus, el siguiente paso fue analizar los modelos de migración de los genes cognato que codifican para estas proteínas, para el caso de VP7, los genes que la codifican pueden ser el segmento 7, 8 o 9 ya que puede variar entre las distintas cepas. Mientras que para VP4 el único gen que la codifica corresponde al segmento 4. Los resultados de estos estudios, muestran mayores diferencias en migración principalmente entre los tres genes involucrados en codificar para VP7, ya que en las cepas, principalmente en los electroferotipos cortos, se pueden apreciar diferencias significativas en migración, ya que estos segmentos en ocasiones co-migran como una sola banda (figura 2 carril 2 y 8), mientras que en otras cepas se aprecian claramente la

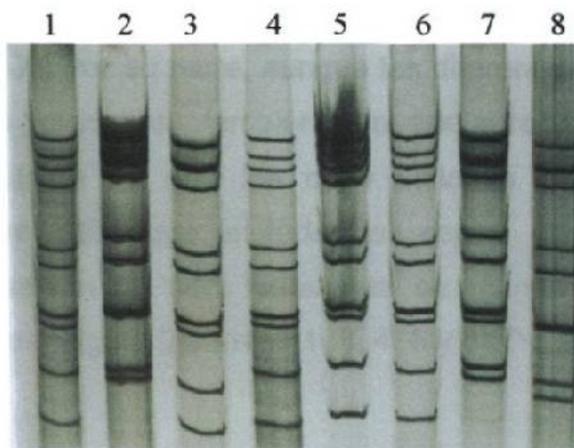


Figura 2: Perfiles electroforéticos de cepas de rotavirus mostrando diferentes modelos de migración de sus genes cognato. Los electroferotipos cortos corresponden a cepas aisladas en la temporada 1999-2000.

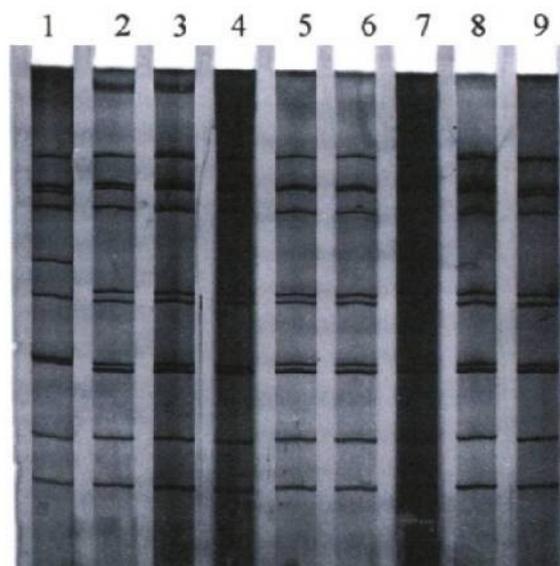


Figura 3: Modelos electroforéticos del genoma de rotavirus mostrando electroferotipos largos. Carril 1, rotavirus SA11, carriles 2 al 9 cepas de rotavirus aisladas antes de 1998.

separación de dos bandas (figura 2 carril 7). Por su parte, aunque las diferencias en la migración del segmento 4 es menos prominente, también se puede apreciar una diferencia significativa en la migración de una las cepa aisladas con electroferotipo corto (figura 2 carril 8), mientras que en todas las cepas con electroferotipo largo el modelo de migración de este segmento se mantuvo constante durante todo el periodo de estudio (figura 2 carriles 1, 3, 4, 5 y 6).

Relación Genotipo – Electroferotipo

Para establecer la relación electroferotipo-Genotipo, el siguiente paso fue analizar las cepas a través de un sistema de RT-PCR con dos amplificaciones, con el objetivo de determinar el genotipo del gen que codifica las proteínas de VP4 y VP7. Para efectuar este estudio, se realizó una extracción del RNA de las cepas aislada mediante el método de TRIZOL de acuerdo a las indicaciones del fabricante, así como la determinación de la pureza y concentración del RNA obtenido.

Para todas las amplificaciones, se tomó como criterio que la pureza del RNA fuera mayor de 1.8 y se utilizaron 2 µg de este RNA para llevar a cabo cada una de las dos amplificaciones.

Los resultados representativos de estas extracciones de RNA se muestran en la grafica de la figura 4, para una absorbancia a 260 y 280 nm.

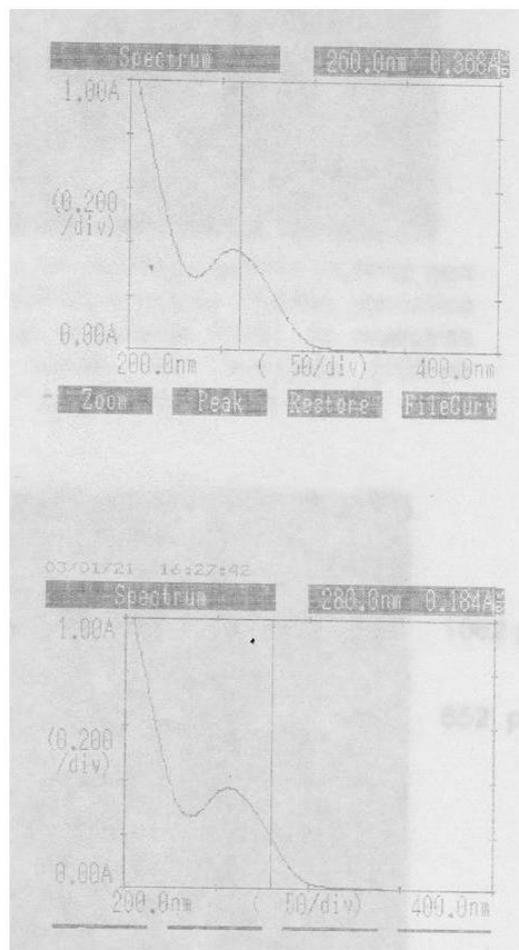


Figura 4: absorbancia a 260 y 280 del RNA obtenido por método de TRIZOL

Amplificación del gen 4 (VP4)

Para establecer el genotipo de las cepas de estudio, se realizó una primera amplificación del gen de VP4 utilizando los oligonucleótidos con3 y con2, que se alinean en una región que es conservada para diferentes genotipos y se expande desde la posición 10 en el extremo 5' hasta la posición 887 del extremo 3'. Este fragmento incluye toda la región de VP8 y los primeros 100 nt de VP5.

Después de la amplificación, los productos obtenidos se revelaron en un gel de agarosa al 1.5 % y se tiñeron con bromuro de etidio. Los resultados de estos experimentos muestran la presencia un fragmento de 876 pb para cada una de las cepas analizadas (figura 5 carriles 1 al 6).

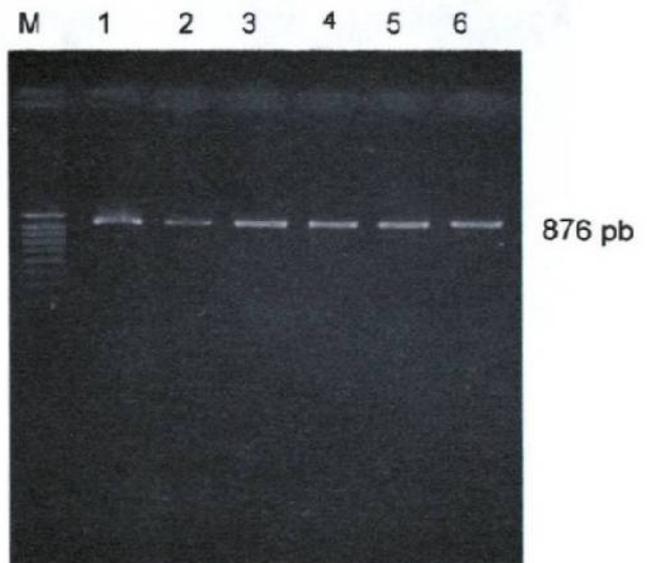


Figura 5: Amplificación por RT-PCR de gen 4 de cepas de rotavirus. El RNA genómico se extrajo mediante Trizol de muestras fecales. Líneas: M, marcador (100-pb ladder); 1 a 6, productos de 876 pb.

Amplificación del gen 9 (VP7)

Asimismo, Para la amplificación del gen que codifica para VP7, se utilizaron los oligonucleótidos beg9 y end9, que se alinean en una región

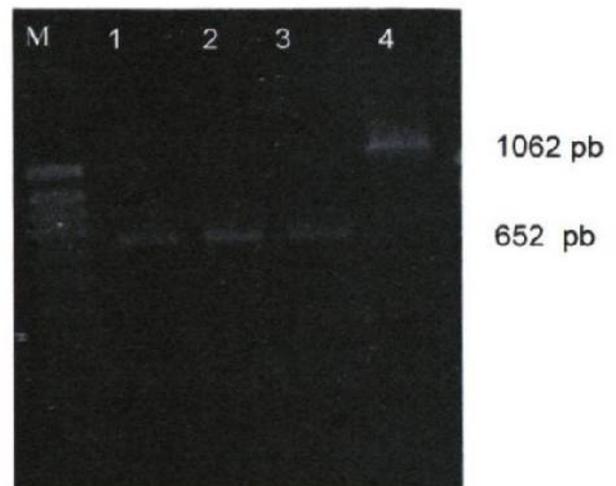


Figura 6: Amplificación por RT-PCR de cepas de rotavirus. Líneas: M, marcador (100-pb ladder); 4, producto de 1062 pb, 1 a 4, producto de 652 pb específico del serotipo G2.

que es conservada para los diferentes genotipos de VP7. El segmento amplificado se expande desde la posición 1 en el extremo 5' hasta la posición 1062 en el extremo 3', de allí el nombre de los oligonucleótidos. por tal motivo, este producto corresponde a todo el gen de VP7. Al igual que con el gen 4, los resultados del corrimiento electroforético en geles de agarosa al 1.5% y teñidos con bromuro de etidio muestran el fragmento esperado de 1062 pb (figura 6 carril 4).

Genotipos P

Después de la obtención del producto de la primera amplificación, el siguiente objetivo fue utilizar 1 µl de cada uno de estos productos para realizar una segunda amplificación con un panel de oligonucleótidos específicos para los genotipos P[4], P[6], P[8], P[9], y P[10] (VP4).

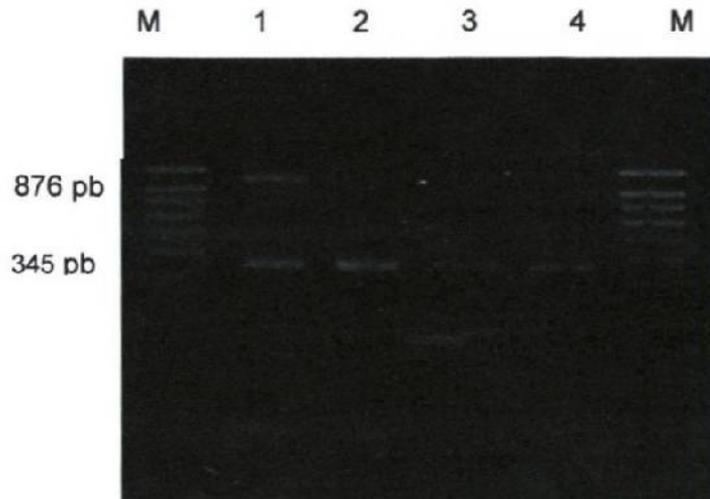


Figura 7: Amplificación del gen de VP4 por RT-PCR de cepas de rotavirus. El RNA genómico fue obtenido de muestras fecales mediante Trizol. Líneas M, Marcador (100-bp ladder); 1 a 4, productos de 345 pb (P[8])

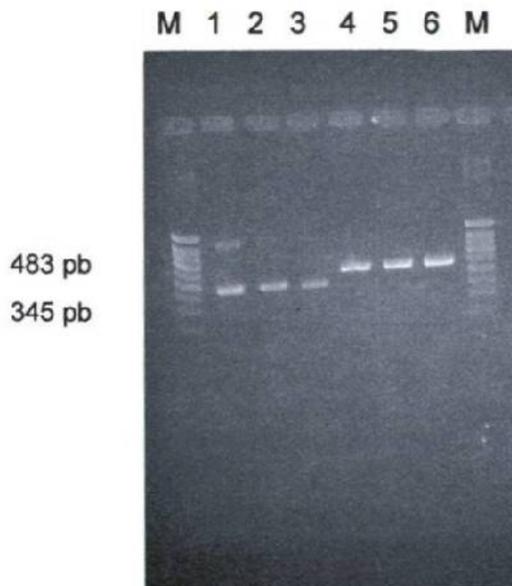


Figura 8: Tipificación de cepas de rotavirus a través de RT-PCR a partir de muestras fecales. Línea M, Marcador (100 pb ladder); a) líneas 1 - 3 producto de 345 pb (P[8]) línea 4 - 6 producto de 483(P[4]).

De esta manera, un total de 350 muestras fueron tipificadas con los oligonucleótidos específicos de VP4. los resultados muestran al genotipo P[8] como el principal genotipo observado durante el periodo de estudio, ya que del total de las muestras analizadas, en 338 (96.5%) cepas que presentaron electroferotipo largo, fue posible detectar una banda de 345 pb que corresponde a este genotipo (figura 7 y 8). Asimismo, como se puede observar, en algunas de esas amplificaciones es posible apreciar la banda correspondiente a 868 pb de la cual se realizó la segunda amplificación de los genotipos mencionados.

Por otra parte, en los 12 electroferotipos cortos detectados, los resultados también muestran la presencia del genotipo P[4] en todos ellos, donde en 10 (83.4%) cepas aisladas, este genotipo se presenta de manera individual (figura 8 carriles 4, 5 y 6), mientras que las dos cepas restantes (16.6 %) se presentan en coinfección con el genotipo predominante P[8] (figura 9 carril 3 y tabla 1).

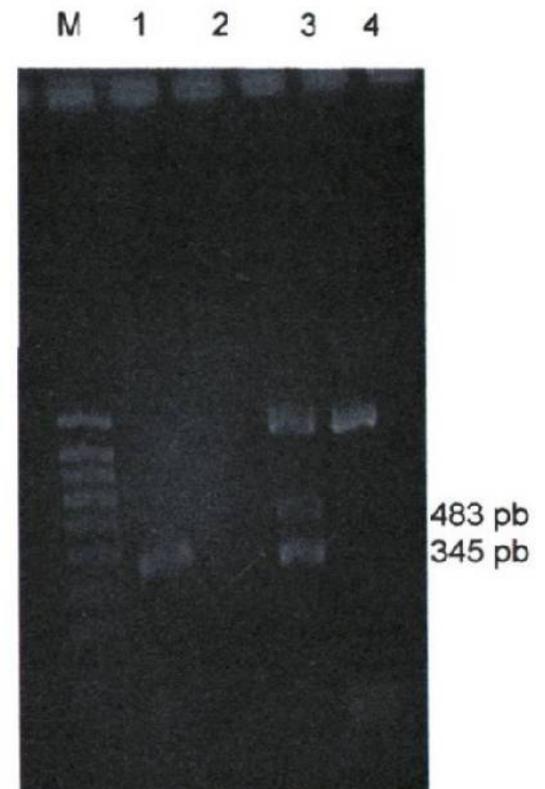


Figura 9: Tipificación de cepas de rotavirus a través de RT-PCR a partir de muestras fecales. Línea M, Marcador (100- pb ladder); a) líneas 1 - 2 producto de 345 pb (P[8]) línea 3 productos de 345 y 483 pb.

Tabla 1: Relación Electroferotipo – Genotipo P en cepas aisladas de infantes con gastroenteritis

Electroferotipo	Frecuencia	P[8]	P[4]	P[8], P[4].	Total
Largo	338	330 (94%)	0	8 (2.3%)	338
Corto	12	0	10 (83.4%)	2 (16.6%)	12
Total	350	330 (94.2%)	10 (2.8%)	10 (2.8%)	350

Genotipo VP7

Considerando que las cepas con electroferotipos cortos están relacionados a los serotipos G2, el siguiente paso fue realizar una tipificación a partir del producto de 1062 pb que previamente se había obtenido con los oligonucleótidos específicos para VP7 (beg9 y end9). Para este propósito se realizó un análisis de PCR semianidado de las 12 cepas que previamente se identificaron con este

electroferotipo. Para su realización se utilizaron cuatro oligonucleótidos denominados aBT1, aCT2, aDT4 y aTE3 los cuales reconocen secuencias en específicas de las cepas Wa, DS1, ST3, y Price que corresponden a los serotipos G1, G2, G3 y G4.

Los resultados de los análisis de las 12 cepas indican la presencia del serotipo G2. En este caso,

las 12 (100%) cepas con electroferotipo corto de la temporada 1999-2000 amplificaron un fragmento de 652 pb característico del serotipo G2 (figura 10).

Genotipo - SSCP

Después de analizar la presencia de estos genotipos, y determinar que en nuestra región existe de manera constante el genotipo (P[8]), y que recientemente ocurrió la introducción del genotipo P[4], como lo demuestra los análisis

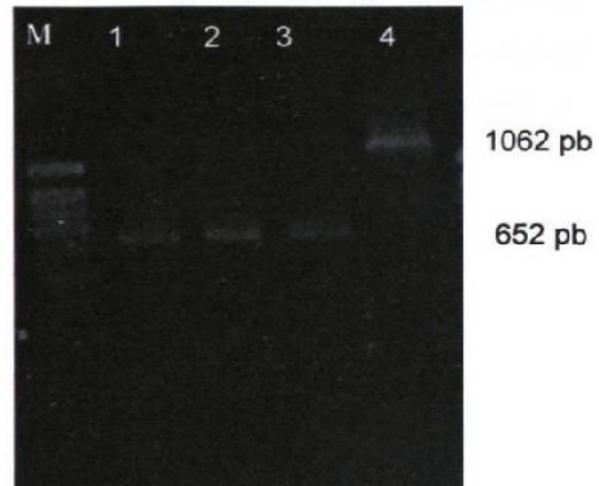


Figura 10: Tipificación por RT-PCR de cepas de rotavirus de Infantes con gastroenteritis. Líneas: M, marcador (100-pb ladder); 1 a 4, producto de 652 pb específico del serotipo G2.

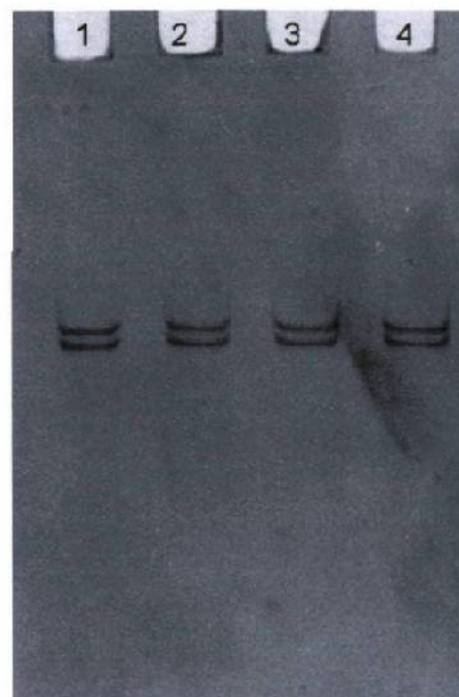


Figura 11: Análisis por SSCP del producto de RT-PCR de cepas de rotavirus de Infantes con gastroenteritis. Líneas 1-4 producto de 345 bases del genotipos P[8].

de la temporada 1999-2000, el siguiente paso fue determinar si en estos genotipos existe polimorfismo a nivel de DNA de cadena simple (SSCP), que nos permitiera tener un mejor entendimiento del comportamiento molecular de las cepas de rotavirus.

Los análisis por SSCP se basan en el hecho de que las moléculas de DNA de cadena simple bajo condiciones no desnaturizantes tienen una conformación intramolecular única que varía dependiendo de la secuencia de nucleótidos. En este sistema el cambio de una sola base puede causar un cambio conformacional en la molécula de DNA y este cambio conformacional es suficiente para ser detectado bajo condiciones no desnaturizantes ya que afecta la movilidad de la molécula en geles de poliacrilamida. Por lo anterior, y considerando que la sensibilidad del SSCP está dada por el tamaño de la molécula, donde los fragmentos cercanos a los 500 nucleótidos pueden ser analizados exitosamente de esta manera, en este trabajo, nos propusimos utilizar esta metodología para determinar si existe polimorfismo entre los genotipos aislados.

Para realizar este estudio, un microlitro de cada uno de los productos de amplificación de los genotipos P obtenidos por RT-PCR se trataron con formamida para desnaturizar las moléculas de DNA y se sometieron a una electroforesis en un sistema continuo en geles de poliacrilamida al 10 % a 100 volts

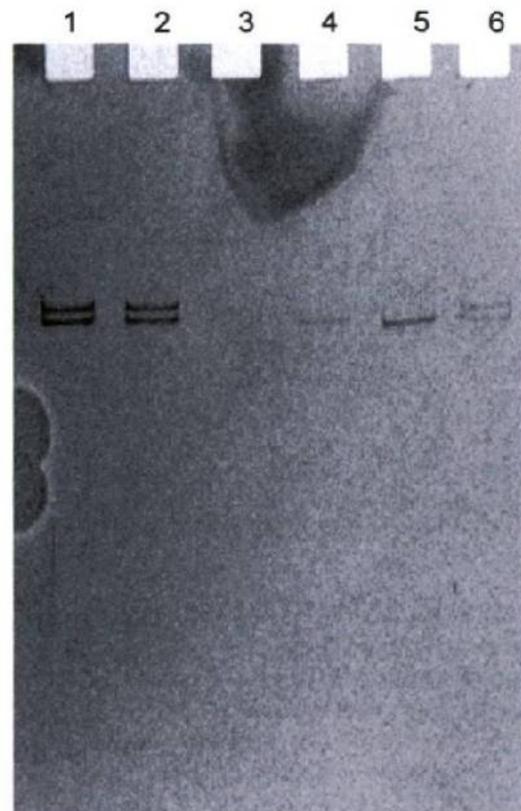


Figura 12: Análisis por SSCP del producto de RT-PCR de cepas de rotavirus de Infantes con gastroenteritis. Líneas 1-6 productos de 483 bases genotipos P[4].