

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EPITOPES INMUNODOMINANTES EN LA SUBUNIDAD VP8*
DE LA PROTEINA VP4 DE CEPAS HUMANAS DE ROTAVIRUS
CON GENOTIPO P[8]

Por

M.C. GRISELDA EDITH MENCHACA RODRÍGUEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS
con Especialidad en Microbiología

San Nicolás de los Garza, N.L.

Agosto, 2011

EPITOPES INMUNODOMINANTES EN LA SUBUNIDAD VP8*
DE LA PROTEINA VP4 DE CEPAS HUMANAS DE ROTAVIRUS
CON GENOTIPO P[8]

Aprobación de la Tesis:



Dr. Juan Francisco Contreras Cordero
Director de la Tesis



Dra. Licet Villarreal Treviño
Secretaria



Dr. José Santos García Alvarado
Vocal



Dra. Norma Laura Heredia Rojas
Vocal



Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna
Vocal

LUGAR DE TRABAJO

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Inmunología y Virología, del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Juan Francisco Contreras Cordero, con el apoyo del proyecto No. 52036-CONACYT y SA 1683-97-PAICYT-Universidad Autónoma de Nuevo León.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas e instituciones, que me ayudaron a iniciar, realizar y terminar este proyecto para obtener mi grado académico de Doctor en Ciencias.

Gracias al **Dr. Juan Francisco Contreras Cordero**, Asesor y Director de mi tesis, por darme la oportunidad y todas las facilidades para realizar mi Doctorado en su laboratorio. Pero sobre todo, gracias por apoyarme incondicionalmente en todos los aspectos, para mi formación académica.

Gracias a mi Comité de tesis formado por la **Dra. Licet Villarreal Treviño**, **Dr. José Santos Alvarado García**, **Dra. Norma Laura Heredia Riojas** y **Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna**, por sus valiosas observaciones sobre la edición del escrito de Tesis, así como también por formar el jurado en mi examen profesional.

Gracias a la **Dra. Laura Trejo Ávila** y la **Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales**, quienes fueron Tutoras de mi trabajo de Doctorado, por su valiosa retroalimentación durante el desarrollo del trabajo de investigación, las cuales ayudaron a mejorar las diferentes estrategias para alcanzar los objetivos de este proyecto.

Gracias a la **Dra. Rocío Infante Ramírez** de la Universidad Autónoma de Chihuahua, por su invaluable ayuda en la recolección de muestras de suero de niños con gastroenteritis en la Cd. de Chihuahua, Chihuahua, las cuales fueron la base para el desarrollo de este proyecto de investigación. Pero también quiero agradecerle, por tu compañerismo, tu entusiasmo y tú siempre disponibilidad en apoyarme durante mi Doctorado.

Gracias al **Dr. Carlos F. Arias Ortiz** y la **Dra. Susana López** del Instituto de Biotecnología, UNAM, por otorgarme todas las facilidades apoyándome con reactivos biológicos, los cuales fueron fundamentales para la realización del trabajo de Doctorado.

Gracias al **Laboratorio de Inmunología-Unidad de Inmunobiología y Formulación de Biológicos** especialmente a la **Srita. Enriqueta Monreal Cuevas** y **M.C. Gabriela Damas Buenrostro** por su apoyo y siempre disponibilidad para permitirme el uso de equipo, para el desarrollo del proyecto de Doctorado.

Gracias al **Dr. Ernesto Méndez Salinas** del Instituto de Biotecnología, UNAM, por su valiosísimo apoyo para la estandarización de las técnicas de cultivo celular.

Gracias al **Dr. Carlos E. Hernández Luna** del Laboratorio de Enzimología del Departamento de Química, de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, por permitirme el uso de su equipo, pero sobre todo, por la siempre disposición de su parte, para asesorarme en técnicas de purificación y cuantificación de proteínas.

Gracias al **Dr. Benito Pereyra Alférez** y a la **Dra. María Magdalena Iracheta Cárdenas** del Laboratorio 4 del Instituto de Biotecnología, de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, por

permitirme el uso de su equipo, pero también agradezco a la Dra. Magdalena, su invaluable ayuda para mejorar las técnicas de detección de proteínas.

Gracias a mis compañeras **M.C. Guadalupe González Ochoa** y **M.C. Diana Linda Cárdenas Chávez**, estudiantes de Doctorado del Postgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, por su valiosísima ayuda en aspectos técnicos, para la estandarización de los protocolos de Biología Molecular utilizados en el proyecto de investigación. Pero también gracias por su amistad y sobre todo, su apoyo y comprensión moral, para afrontar y resolver todos los altibajos durante la realización de este proyecto.

Gracias a mis compañeros del Laboratorio de Virología Unidad L-11, **Ana María, Leocadia, Pablo, Nora, Verónica** y **Nayelly**, por todos los momentos que compartimos, haciendo más placenteras las horas de trabajo. Pero sobre todo, gracias por permitirme compartir y retroalimentar con ustedes mis conocimientos. Agradezco muy especialmente a **Erika Cázares** por tu valiosa ayuda, siendo mi compañera hablando el mismo idioma en la producción de proteínas recombinantes.

Gracias a la **Dra. María Cristina Rodríguez Padilla**, Directora del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, por permitirme realizar mi Doctorado en este laboratorio.

Gracias a la **Subunidad de Estudios de Postgrado**, de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, por brindarme todas las facilidades para estudiar y realizar mi estudios de Postgrado.

Gracias al **Concejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el apoyo económico otorgado a mi persona, para la realización y manutención durante mis estudios de Postgrado.

Gracias a **mi familia**, por su apoyo incondicional. A mis padres **Pedro Avelardo** y **Eloisa**, quienes siempre me han estimulado a superarme. A mis suegros **Martín** (q.e.p.d.) y **Jovita**, por permitirme ser parte de su familia. A mis hermanos **Pedro, Héctor, Diana, Miguel, Silvia, Oscar** y **Edgar**, por darme siempre ánimos, deseo que cada uno también se sienta realizado en su vida. A todos mis cuñados y cuñadas, muy especialmente a **Iza Nelly Gómez Soto**, por ser mi amiga y sobre todo por ayudarme siempre con mi hijo. A todos mi sobrinos, a quienes quiero como hijos, gracias por permitirme compartir su vida, ¡Nunca desistan de sus metas!

Gracias a **Dios**, por darme vida, salud y fortaleza día con día, para sobrellevar este proyecto que me ha permitido superarme profesional y espiritualmente.

Griselda Edith Menchaca Rodríguez

DEDICATORIA

Deseo dedicar este trabajo, que empezó como una meta y después, se transformó en toda una experiencia de vida...

A mi esposo, *Luis Martín Gómez Soto* y
A mi hijo, *Luis Antonio Gómez Menchaca*

Porque ustedes dos, son el mejor presente que tengo en mi vida.
Gracias a ustedes, tengo la motivación día a día, de vivir y realizarme,
compartiendo todos mis sueños y proyectos, para unimos más como familia.

Gracias por su apoyo...los amo.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS.....	iv
DEDICATORIA.....	vi
LISTA DE TABLAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
NOMENCLATURA.....	xv
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. HIPÓTESIS.....	6
3. OBJETIVOS.....	7
3.1 Objetivo general.....	7
3.2 Objetivos particulares.....	7
4. ANTECEDENTES.....	8
4.1 Estructura viral.....	8
4.2 Clasificación antigénica de rotavirus.....	9
4.3 Características antigénicas de la proteína VP7.....	10
4.4 Características antigénicas de la proteína VP4.....	12
4.4.1 Características antigénicas de la subunidad VP8* y VP5*.....	15
4.5 Respuesta inmune contra la proteína VP4.....	17
4.6 Genotipos P, linajes y sublinajes de la proteína VP4.....	20
4.7 Vacunas contra rotavirus.....	24
5. METODOLOGÍA.....	28
5.1 Muestras de heces y suero.....	28

5.2 Cepas de rotavirus.....	28
5.3 Subcultivo de células MA-104.....	28
5.4 Propagación de cepas de rotavirus en cultivo celular.....	29
5.4.1 Microtitulación de unidades formadoras de focos (UFF/ml).....	30
5.4.2 Neutralización de focos infecciosos.....	31
5.5 Extracción de ARN viral.....	32
5.5.1 Electroforesis de ARN.....	33
5.5.2 Obtención del cADN del gen 4 de rotavirus mediante RT-PCR.....	34
5.5.3 Amplificación de la subunidad VP8*.....	34
5.6 Clonación de la subunidad VP8*.....	35
5.6.1 Ligación del producto PCR y plásmido pGEM-T.....	36
5.6.2 Transformación de <i>E. coli</i> DH5 α competentes.....	36
5.6.3 Purificación de plásmidos de bacterias transformadas.....	37
5.6.4 Análisis de plásmidos purificados.....	37
5.7 Secuenciación de la subunidad VP8*.....	38
5.7.1 Análisis de la secuencia de ADN.....	39
5.8 Producción de la subunidad VP8* y péptidos A, B, C recombinantes.....	40
5.8.1 Amplificación de fragmentos A, B y C de la subunidad VP8*.....	40
5.8.2 Expresión de la subunidad VP8* y péptidos A, B, C.....	42
5.8.3 Preparación del inserto y plásmido de expresión.....	42
5.8.4 Ligación del producto PCR y plásmido pET-28a(+)......	43
5.8.5 Transformación de <i>E. coli</i> DH5 α competentes.....	43
5.8.6 Análisis para comprobar la orientación del inserto en el plásmido pET-28a(+)......	44
5.8.7 Transformación y análisis de <i>E. coli</i> BL21(DE3) competentes.....	45
5.8.8 Inducción de la expresión de proteínas recombinantes.....	45
5.8.9 Lisis bacteriana.....	46
5.8.10 SDS-PAGE.....	47
5.9 Purificación de péptidos recombinantes.....	47
5.9.1 SDS-PAGE de fracciones recombinantes.....	48
5.9.2 Western blot.....	48

5.10 Cuantificación de proteínas recombinantes.....	49
5.10.1 Desalación.....	49
5.10.2 Método de Bradford.....	50
5.11 ELISA.....	51
5.12 Western blot con suero de niños con gastroenteritis.....	52
6.RESULTADOS.....	53
6.1 Producción de cepas de rotavirus en cultivo celular.....	54
6.2 Producción de péptidos recombinantes de la proteína VP4 de la cepa de rotavirus Wa.....	55
6.2.1 Amplificación y clonación de la subunidad VP8*.....	55
6.2.2 Análisis de la secuencia de nucleótidos/ aminoácidos de la subunidad VP8*.....	56
6.2.3 Expresión y purificación de la subunidad VP8*.....	60
6.2.4 Amplificación, clonación y expresión de péptidos A, B y C de la subunidad VP8*.....	63
6.3 Determinación de anticuerpos contra la subunidad VP8* recombinante en suero de niños con una infección natural por rotavirus.....	65
6.3.1 Anticuerpos neutralizantes contra la cepa de rotavirus Wa.....	65
6.3.2 Anticuerpos IgG contra la subunidad VP8*-Wa recombinante.....	65
6.3.3 Anticuerpos IgG contra los péptidos A, B y C recombinantes-VP8*-Wa.....	68
6.4 Análisis de la secuencia de aminoácidos de la subunidad VP8* de cepas de rotavirus de campo.....	68
6.4.1 Amplificación y clonación de la subunidad VP8*.....	68
6.4.2 Análisis de la secuencia de aminoácidos de la subunidad VP8*.....	70
6.5 Producción de la subunidad VP8* y péptidos sobrelapados de la cepa de rotavirus de campo CH659-08.....	73
6.5.1 Clonación, expresión y purificación de VP8*, Péptidos A y B.....	73
6.6 Análisis de la especificidad de anticuerpos contra la subunidad VP8*-linaje P[8]-1 y P[8]-3 en suero de niños con una infección natural por rotavirus.....	74

6.6.1 Anticuerpos IgG contra la subunidad VP8*-linaje P[8]-1 y P[8]-3 recombinante.....	74
6.6.2 Anticuerpos IgG contra epitopes inmodomiantes en los péptidos A y B recombinantes linaje P[8]-1 y P[8]-3.....	75
6.7 Análisis antigénico de la subunidad VP8* de cepas de rotavirus con linaje P[8]-1 y P[8]-3.....	76
7. DISCUSIÓN.....	78
8. CONCLUSIONES.....	83
9. BIBLIOGRAFÍA.....	84
APÉNDICE I: Protocolos y soluciones.....	98
APÉNDICE II: Secuencias de nucleótidos/aminoácidos de la subunidad VP8* de la Proteína VP4 de cepas de rotavirus aisladas de niños con gastroenteritis.....	111
RESUMEN BIOGRÁFICO.....	122
ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN.....	123

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Relaciones antigénicas entre cepas de rotavirus humanas determinadas mediante ensayos de neutralización.....	14
II	Estructura antigénica de la proteína VP4 en cepas de rotavirus humanas, determinada por anticuerpos monoclonales y cepas mutantes que escapan a la neutralización.....	18
III	Clasificación de rotavirus basada en los 11 genes de ARN.....	24
IV	Secuencia de oligonucleótidos utilizados para producir fragmentos sobrelapados del gen 4 que codifica para la subunidad VP8* de rotavirus.....	40
V	Datos generales de niños con gastroenteritis por rotavirus.....	53
VI	Análisis de la especificidad de anticuerpos contra la subunidad VP8* recombinante de rotavirus Wa en suero de niños con gastroenteritis.....	67
VII	Anticuerpos contra la subunidad VP8* recombinante de cepas de rotavirus linaje P[8]-1 y P[8]-3 en suero de niños con gastroenteritis.....	75

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Representación gráfica de los sitios de unión de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de la subunidad VP8* y fragmentos sobrelapados de cepas de rotavirus.....	41
2	Esquema de la subunidad VP8* de la proteína VP4 de rotavirus, indicando la posición de aminoácidos de los péptidos sobrelapados.....	42
3	Esquema del sitio de clonación múltiple del plásmido de expresión pET-28a (+), indicando la posición del sitio de restricción para las enzimas <i>Bgl</i> II y <i>Sal</i> I.....	44
4	Efecto citopático de rotavirus Wa en células MA-104.....	54
5	Electroforesis de ARN de rotavirus obtenido de lisados de células MA-104.....	55
6	Electroforesis de productos de PCR-VP8* en gel de agarosa 1.5%.....	55
7	Electroforesis de productos de reacción de restricción de plásmidos pGEM-T/VP8*-Wa.....	56
8	Cromatograma de la secuencia de nucleótidos del plásmido pGEM-T/VP8*-Wa obtenido en el secuenciador ABIPRISM 310TM Genetic Analyzer.....	57
9	Análisis de identidad de la secuencia de aminoácidos deducida de la subunidad VP8* de rotavirus Wa utilizando el programa BLAST protein (NCBI).....	58
10	Comparación de la secuencia de aminoácidos de la subunidad VP8* de cepas de rotavirus Wa.....	59
11	Comparación de la secuencia de nucleótidos de la región génica que codifica para la subunidad VP8* de cepas de rotavirus Wa.....	59
12	Electroforesis de productos de reacción de restricción.....	60
13	SDS-PAGE de proteínas de <i>E.coli</i> BL21(DE3) inducidas en gel de poliacrilamida 11%.....	61

Figura	Página
14 SDS-PAGE de fracciones cromatográficas obtenidas de la purificación de VP8*-Wa recombinante en gel de poliacrilamida 11%.....	62
15 Western-blot de proteínas VP8*-Wa recombinante.....	62
16 Electroforesis de productos de PCR de fragmentos de la subunidad VP8* de rotavirus Wa.....	63
17 SDS-PAGE de péptidos A, B y C recombinantes purificados por cromatografía de afinidad en gel de poliacrilamida 12%.....	64
18 Western-blot de péptidos A, B y C recombinantes de rotavirus Wa, identificados con anti-rotavirus rhesus.....	64
19 Comparación de la secuencia de aminoácidos de la subunidad VP8* de la cepa animal RRV y la cepa humana Wa (CLUSTAL W/BioEdit Sequence Aligment Editor v7.0).....	65
20 Determinación de anticuerpos neutralizantes contra rotavirus Wa En suero de niños con gastroenteritis.....	66
21 Electroforesis de ARN y productos de PCR de cepas de rotavirus de campo.....	69
22 Electroforesis de reacción de restricción con las enzimas <i>Bam</i> HI y <i>Sal</i> I de plásmidos pGEM-T purificados de bacterias DH5 α en gel agarosa 1.5%.....	69
23 Alineamiento de la secuencia deducida de aminoácidos de la subunidad VP8*, de la cepa de rotavirus humana Wa y cepas de rotavirus, aisladas en Chihuahua, México (CLUSTAL W/BioEdit Sequence Aligment Editor v7.0).....	71
24 Árbol filogenético de la secuencia de aminoácidos deducida de la subunidad VP8* de cepas de rotavirus aisladas en Chihuahua, México y secuencias reportadas en el GenBank (Programa MEGA v4.1).....	72
25 Electroforesis de productos de PCR de la subunidad VP8* y fragmentos VP8* de la cepa de campo CH659-08 en gel de agarosa 1.5%.....	73
26 SDS-PAGE de proteínas recombinantes purificadas de las cepas de rotavirus Wa y CH659-08 en gel de poliacrilamida 12%.....	74
27 Análisis de Western blot de suero de niños con gastroenteritis y péptidos recombinantes de cepas de rotavirus con linaje P[8]-1 y P[8]-3.....	77

Figura

Página

28	Análisis de Western blot de anticuerpos policlonales producidos en conejo y péptidos recombinantes de cepas de rotavirus con linaje P[8]-1 y P[8]-3.....	76
----	--	----

NOMENCLATURA

aa	Aminoácidos
ABTS	2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazolin-6-ácido sulfónico)
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADNc	Acido desoxirribonucleico copia
ARN	Acido ribonucleico
BL21(DE3)	Nombre de cepa de <i>E. coli</i> utilizada para producir péptidos recombinantes
DH5 α	Nombre de cepa de <i>E. coli</i> utilizada en protocolos de clonación
D-MEM	Medio de Eagle modificado de Dulbecco's
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
$^{\circ}\text{C}$	Grados centígrados
HRP	Peroxidasa de rábano
Hrs	Horas
IPTG	Isopropil β -D-1-thiogalactopyranosido
kDa	Kilo Dalton

LB	Luria-Bertoni
M	Mol
mA	Miliamperios
mg	Miligramos
mM	Milimoles
μ M	Micromoles
min	Minutos
ml	Militros
μ l	Microlitros
MEM	Medio esencial mínimo
NBT/BCIP	Cloruro de tetrazolio nitro-azul/5-bromo-4-cloro-3-indol-fosfato
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
pb	Pares de bases de nucleótidos
PBS	Buffer salino de fosfatos
PBS A	Buffer salino de fosfatos sin calcio ni magnesio
p.i.	Posterior a la infección

pH	Potencial de hidrógeno ($-\log [H^+]$)
%	Por ciento
rpm	Revoluciones por minute
seg	Segundos
SFB	Suero fetal de bovino
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
SOC	Medio enriquecido para bacterias calcio competentes
TBS	Buffer salino de Tris
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametil-etilendiamina
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
U	Concentración de unidades enzimáticas
1X	Concentración de trabajo de una solución preparada a partir de un stock 10 o 50 veces concentrado (10X, 50X)

RESUMEN

Rotavirus es el agente etiológico más importante de la gastroenteritis aguda en niños menores de 5 años. Estos virus tienen dos proteínas en la superficie, VP4 y VP7 las cuales son la base para la neutralización viral. Durante la infección, VP4 es digerida con tripsina generando dos subunidades denominadas VP8* (extremo amino) y VP5* (extremo carboxilo). Estudios de estas subunidades han revelado que VP8* contiene la región más variable y por esta razón, es utilizada para la detección de genotipos P en las cepas de rotavirus. A la fecha, 33 genotipos P han sido aislados de humanos y diferentes especies animales. De ellos, el genotipo P[8] es el más importante circulando entre la población infantil. Análisis filogenéticos del genotipo P[8] demostraron 4 linajes, los cuales presentan un 87-91% de identidad entre ellos. Sin embargo, aun no está claro si estos cambios entre cepas de rotavirus con diferente linaje, pueden afectar las características antigénicas de las cepas de rotavirus. En este estudio, fueron producidos péptidos recombinantes de varias regiones de la subunidad VP8* de la proteína VP4 de cepas con genotipo P[8] para determinar la presencia de epitopes inmunodominantes. Nosotros colectamos 18 sueros y heces de niños con gastroenteritis durante los años 2007 y 2008 en la Cd. de Chihuahua, Chih. México. Mediante RT-PCR la región del gen 4 que codifica para la subunidad VP8* de las cepas de rotavirus de campo fue amplificada y los productos de PCR (762 pb) fueron clonados en el plásmido pGEM-T y secuenciados. Análisis de comparación de secuencia de los aislados de rotavirus de campo con la cepa prototipo Wa (genotipo P[8]), mostraron un 91.2-92.4% de identidad. Además, análisis filogenéticos indicaron que las cepas de campo son agrupadas en el linaje P[8]-3 mientras que la cepa Wa pertenece al linaje P[8]-1. Para determinar epitopes inmunodominantes en la subunidad VP8*, la subunidad VP8* completa (1-762 nt) y 3 fragmentos sobrelapados denominados A (1-315 nt), B (253-549 nt) y C (454-762 nt) fueron subclonados en el plásmido de expresión pET-28a(+), expresados en cepas de *E. coli* BL21(DE3) y purificados por cromatografía de afinidad. Los sueros de los niños presentaron reactividad contra la subunidad VP8* completa y los péptidos truncados producidos de la cepa Wa (linaje P[8]-1). Además, en ensayos de Western blot los sueros mostraron mayor reactividad contra epitopes en el péptido B de linajes P[8]-1 y P[8]-3. Asimismo, anticuerpos policlonales producidos en conejo contra la cepa Wa y la subunidad VP8*-CH659-08 recombinante (linaje P[8]-3), también revelaron reactividad con el péptido B de ambos linajes. Aunque estos resultados mostraron la presencia de epitopes distribuidos en toda la subunidad VP8*, epitopes inmunodominantes fueron encontrados en la región variable representada por el péptido B. Estos epitopes inmunodominantes también mostraron ser conservados entre cepas de rotavirus con linajes P[8]-1 y P[8]-3.

ABSTRACT

Rotavirus is the most important etiologic agents of acute gastroenteritis in children under 5 years old. These viruses have two surface proteins, VP4 and VP7, which are the basis for virus neutralization. During viral infection, VP4 protein is split in two subunits, VP8* (NH₂-extreme) and VP5* (COOH-extreme). Studies of these subunits have revealed that VP8* contains the most variable region and is used to detect VP4 rotavirus genotypes. To date 33 P genotypes have been isolated from human and different animal species. Of them, P[8] genotype is the most important circulating among infant population. Phylogenetic analysis of P[8] genotype demonstrated 4 lineages which contain from 87% to 91% of identity among them. It is unclear if these changes between rotavirus strains with different lineage may affect the antigenic characteristic of rotavirus strains. In this study were produced recombinant peptides from various regions of the VP8* subunit of VP4 protein of P[8] strains to determine the presence of immunodominant epitopes. We collected 18 sera and feces of children with gastroenteritis during 2007 and 2008 in Chihuahua City, Mexico. By RT-PCR were amplified the region gene 4 that codified of VP8* subunit of rotavirus field strains. The PCR amplicons (762 bp) were cloned into pGEM-T plasmid and sequenced. Sequence comparison analysis of isolate fields with the prototype Wa strain (P[8] genotype) showed from 91.2 to 92.4% identity. Phylogenetic analysis indicated that the field strains clustered in P[8]-3 lineage while that Wa strain belong to P[8]-1 lineage. To determine immunodominant epitopes in the VP8* subunit, the VP8* subunit (nt 1-762) of gene 4 and three overlap fragments: A (nt 1-315), B (253-549 nt) and C (nt 454-762) were subcloned in pET-28a(+) plasmid, expressed in *E. coli* BL21(DE3) and then were purified by affinity chromatography. The children's sera reacted with VP8* subunit and the peptides truncated produced from both Wa strain (P[8]-1 lineage). Western blot analysis also showed that the children's sera had reactivity against peptide B epitopes of P[8]-1 and P[8]-3 lineages. Rabbit polyclonal antiserum against Wa strain and VP8*-CH659-08 recombinant reacted against peptide B sequences of both lineages. Although these results showed the presence of epitopes distributed in the entire VP8* subunit, immunodominant epitopes were found in the most variable region represented by peptide B. In addition, these immunodominant epitopes were shown to be conserved among rotavirus strains of P[8]-1 and P[8]-3 lineages.

1. INTRODUCCIÓN

Cada año durante la temporada de invierno, los rotavirus producen brotes epidémicos de gastroenteritis aguda en la población infantil. La Organización Mundial de la Salud reporta que a consecuencia de la deshidratación ocasionada por la diarrea viral, se producen de 475,000 a 527,000 muertes de niños a nivel mundial, siendo los países en vías de desarrollo con alto grado de desnutrición, los más afectados (OMS, 2009; Santos and Hoshino, 2005).

Esta enfermedad se presenta como una inflamación del tracto intestinal, produciendo diarrea acuosa y vómito como síntomas principales. Durante la fase activa, los pacientes pueden tener hasta 30 evacuaciones/día. Los síntomas inician entre las 24 y 48 horas después de la infección y dependiendo del manejo del paciente puede durar de 1 a 10 días (Staat *et al.*, 2002); por lo tanto, además de los graves problemas de salud, se requieren fuertes recursos económicos para asegurar un buen manejo hospitalario de los infantes infectados (Kapikian *et al.*, 2001).

En la actualidad una de las estrategias para controlar la diarrea por rotavirus es la aplicación de dos vacunas: Rotarix® (GSK) y RotaTeq® (Merck), siendo México uno de los primeros países en el mundo de aprobar su aplicación desde el 2004 (Cheuvart *et al.*, 2009; Gouveia *et al.*, 2009). Sin embargo, una de las principales problemáticas para asegurar la eficacia de las cepas vacunales contra rotavirus, es la alta variabilidad genómica y antigénica que presentan estos virus. Dos de los principales factores de la generación de esta diversidad de cepas virales, son la falta de fidelidad de la RNA polimerasa viral y el rearreglo génico del genoma de rotavirus durante las coinfecciones, donde uno o varios genes son intercambiados generando cepas de rotavirus con características antigénicas nuevas (Mendez *et al.*, 1992; Desselberger *et al.*, 1996; Maunula *et al.*, 2002).

Análisis antigénicos de las cepas de rotavirus utilizando anticuerpos contra las proteínas de superficie VP7 y VP4, han detectado 15 serotipos G (VP7) y 13 serotipos P (VP4) (Hoshino and Kapikian, 1996; Kapikian *et al.*, 2001). Sin embargo debido a la poca disponibilidad de anticuerpos específicos de serotipo, los estudios epidemiológicos de rotavirus en los brotes epidémicos se realiza obteniendo el genotipo G y P mediante RT-PCR a partir de los genes 9 y 4 respectivamente (Gouvea *et al.*, 1990; Gentsch *et al.*, 1992). Con esta estrategia en la actualidad se han determinado 24 genotipos G y 33 genotipos P (Abe *et al.*, 2011). Los genotipos G1 y P[8] son los más importantes desde el punto de vista epidemiológico, ya que representan el 70% y 80% respectivamente de los genotipos detectados. Siendo la combinación G1P[8], la que predomina con el 60% de los casos reportados en todo el mundo (Santos and Hoshino, 2005).

La proteína VP4 además de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes, está involucrada en los procesos de unión y penetración a la célula huésped. En presencia de tripsina, se divide en dos subunidades denominadas VP8* (extremo amino terminal) y VP5* (extremo carboxilo terminal), siendo en la región de VP8* donde se localiza la región más variable de aminoácidos (Larralde *et al.*, 1991). Estudios filogenéticos de la secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos de la subunidad VP8* han demostrado que entre las cepas virales con genotipo P[8], existen 4 linajes: P[8]-1, P[8]-2, P[8]-3 y P[8]-4, los cuales presentan un 87-91% de identidad entre ellos, lo que representa una diferencia de 22-32 cambios de aminoácidos (Maunula and von Bonsdorff, 1998; Cunliffe *et al.*, 2002; Arista *et al.*, 2005). Por tal motivo, ya que estudios antigénicos de cepas de rotavirus que escapan a la neutralización han revelado que un solo cambio de aminoácido puede cambiar las características antigénicas de la proteína VP4, aun no está claro que rol tiene la región variable de esta proteína en los cambios antigénicos de cepas con el mismo genotipo (Taniguchi *et al.*, 1988; Kobayashi *et al.*, 1990). Además, la presencia de linajes de la proteína VP4 en cepas con el genotipo predominante P[8], pueden ser estudiadas en los

niveles antigénicos para determinar si los cambios en la secuencia de aminoácidos entre cepas de rotavirus con diferente linaje, son importantes antigénicamente entre cepas de un mismo genotipo P y por consecuencia afectar la eficacia de las cepas vacunales.

El objetivo de este estudio fue producir péptidos recombinantes de la subunidad VP8* de la proteína VP4 de cepas de rotavirus humanas con genotipo P[8], para estudiar la presencia de epitopes inmunodominantes a través de la especificidad de los anticuerpos producidos en una infección natural con rotavirus.

2. HIPÓTESIS

La región variable de la proteína VP4 de rotavirus con genotipo P[8], presenta epitopes inmunodominantes que se conservan en variantes genéticas con el mismo genotipo, los cuales son reconocidos por anticuerpos producidos en una infección natural.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Determinar la presencia de epitopes secuenciales inmunodominantes en la subunidad VP8* de la proteína VP4 de cepas humanas de rotavirus con genotipo P[8], utilizando anticuerpos de niños producidos en una infección natural.

3.2 Objetivos Particulares

- 3.2.1 Obtener la secuencia de nucleótidos de la subunidad VP8* del gen que codifica para la proteína VP4 de cepas de rotavirus aislados de campo.
- 3.2.2 Establecer un sistema de expresión en *E. coli* para la producción de péptidos recombinantes de la subunidad VP8* de la proteína VP4 de rotavirus.
- 3.2.3 Determinar anticuerpos contra la subunidad VP8* recombinante de cepas humanas de rotavirus con genotipo P[8] en suero de niños con una infección natural por rotavirus.
- 3.2.4 Analizar la presencia de epitopes secuenciales inmunodominantes utilizando péptidos recombinantes de la subunidad VP8* y anticuerpos producidos en niños con gastroenteritis por rotavirus.

4. ANTECEDENTES

Rotavirus es el agente etiológico más importante de la gastroenteritis aguda en niños menores de 5 años a nivel mundial; ya que los casos de diarrea reportados por estos virus, sobrepasa en más del 50% los detectados para otros virus entéricos como Adenovirus, Astrovirus y Calicivirus, así como también de bacterias y parásitos (Kapikian *et al.*, 1993; Bernstein *et al.*, 2009). En la actualidad se reportan 125 millones/año de episodios de gastroenteritis por rotavirus en el mundo, produciendo un grave problema de salud pública (OMS, 2009). En Estados Unidos, a consecuencia de la diarrea, se presentan 25 millones de visitas al médico y 2 millones de hospitalizaciones cada año (Dennehy, 2008). Sin embargo, aunque en países en desarrollo se estima que $\frac{3}{4}$ partes de la población infantil se infecta con rotavirus, debido a la deshidratación, el número de muertes puede alcanzar hasta 527,000/año (Parashar *et al.*, 2009).

4.1 Estructura viral.

Los rotavirus pertenecen a la familia *Reoviridae*, donde sus integrantes se caracterizan por presentar una simetría de tipo icosaédrica, sin envoltura lipídica y un genoma de tipo RNA de doble cadena dividido en segmentos.

Estos virus presentan un diámetro aproximado de 70 nanómetros, su estructura posee tres capas concéntricas de proteínas; la capa más interna se organiza en un complejo ribonucleoproteico formado por el RNA genómico y las proteínas denominadas VP1 (125 KDa) y VP3 (88 KDa), rodeadas por la proteína VP2 (102 KDa) (Prasard *et al.*, 1996). El RNA de los rotavirus está dividido en 11 segmentos, los cuales a excepción del segmento 11, cada uno codifica para una proteína. La capa intermedia está formada sólo por la proteína VP6 (41 KDa), quien se encuentra

organizada en trímeros, siendo la responsable de la estructura icosaédrica de rotavirus. Por último, la capa más externa, está constituida por dos proteínas; VP7 (37 KDa), formando una capa lisa de 780 moléculas, y la proteína VP4 (84 KDa), que se proyecta al exterior en forma de espículas de 12 nm de largo, formando 60 dímeros (Shaw *et al.*, 1993).

Mediante VP4, la partícula viral es capaz de aglutinar glóbulos rojos de diferentes especies animales y de humano, por lo tanto, es considerada la hemaglutinina viral; además de que también es responsable de la adherencia al receptor celular, por lo que está involucrada en los procesos de penetración del virus a la célula hospedero (Mackow *et al.*, 1989).

4.2 Clasificación antigénica de rotavirus.

Durante una infección por rotavirus, es común la producción de dos tipos de partículas virales: DLP's (Double layer particles) formadas por 2 capas de proteínas, donde la proteína VP6 constituye la capa más externa; y TLP's (Triple layer particles) o viriones completos que presentan a las proteínas VP7 y VP4 en la superficie (Gallegos *et al.*, 1989). Por tal motivo, desde el punto de vista antigénico, las proteínas estructurales VP6, VP7 y VP4 inducen de forma independiente, la producción de anticuerpos. Estas proteínas se han utilizado para la clasificación antigénica de las cepas de rotavirus que infectan a humanos y animales en *Grupos, Subgrupos y Serotipos* (Estes, 2001).

Los grupos se definen de acuerdo a epitopes presentes en la proteína VP6 y actualmente se conocen siete denominados de la A-G. Los subgrupos también son definidos por epitopes localizados en VP6; sin embargo sólo se conocen 4 subgrupos dentro del grupo A, donde se encuentran la mayoría de las cepas de rotavirus que infectan a humanos. Por su parte, los serotipos G y P son definidos por las proteínas VP7 y VP4 respectivamente, considerándose un sistema de clasificación binominal. A la fecha, se conocen 15 serotipos G, mientras que solo se

han podido caracterizar 13 serotipos P (Kapikian *et al.*, 2001). Debido a la falta de anticuerpos específicos de serotipo para realizar estudios masivos de campo, se utilizan oligonucleótidos específicos para los genes 4 (VP4) y 9 (VP7), para determinar el *Genotipo* de las cepas de rotavirus mediante un sistema de RT-PCR (Gouvea *et al.*, 1990; Gentsch *et al.*, 1992). De esta manera, se han encontrado 24 genotipos G (VP7) y 33 genotipos P (VP4) entre cepas de rotavirus de origen animal y de humano (Abe *et al.*, 2011). Sin embargo, la asociación entre Serotipo-Genotipo sólo se ha mantenido para la proteína VP7, mientras que para la proteína VP4, no se establece esta relación por lo que es necesario extender los estudios antigénicos de la proteína VP4 para cada genotipo.

4.3 Características antigénicas de la proteína VP7.

La proteína VP7 es codificada por el gen 9, aunque en ocasiones puede ser codificada por el gen 7 u 8 dependiendo de la cepa de rotavirus. Este gen está constituido de 1,062 nucleótidos, con un marco de lectura de 978 bases que codifica una proteína de 326 aminoácidos. El marco de lectura inicia en la posición 49 y termina en la posición 1,025. Por tal motivo, existen dos regiones no traducidas que son altamente conservadas entre diferentes cepas de rotavirus, una de estas regiones se encuentra en el extremo 5', y presenta 48 nucleótidos de largo, mientras que la otra región, se localiza en el extremo 3' y presenta 36 nucleótidos (Urasawa *et al.*, 1993). Existen otras porciones del gen que son altamente conservadas entre cepas con el mismo serotipo. Estas regiones se denominan A, B y C que corresponden a los residuos de aminoácidos 87–101, 142–152 y 208–221 respectivamente, las cuales se ha establecido como regiones altamente antigénicas responsables de la definición de serotipo y de la aparición de nuevas variedades antigénicas. Las regiones A, B y C han servido de base para el diseño de distintos oligonucleótidos para la amplificación de regiones específicas, con el propósito de estudiar la

presencia de diferentes y/o nuevas cepas de rotavirus entre la población infantil (Wen *et al.*, 1997; Arista *et al.*, 1999; Steele *et al.*, 1995; Fisher *et al.*, 2000).

Los estudios iniciales de las características antigénicas de la proteína VP7 se dirigieron principalmente por ser la proteína más abundante de la superficie del virus y aparentemente la más antigénica. Actualmente, son 15 serotipos (G1–G15) los que se han aislado tanto de humano como de diversas especies animales, utilizándose diversas técnicas como la prueba de neutralización de reducción de placas (PRNT), neutralización de focos fluorescentes (FFN) y ELISA, para definir la presencia de un nuevo serotipo (Beards *et al.*, 1980; Ward *et al.*, 1996). El criterio para determinar un nuevo serotipo mediante pruebas de neutralización, es que el título de los anticuerpos neutralizantes contra la cepa con nuevo serotipo, debe presentar al menos una diferencia de 20 veces, mientras que si se utiliza la técnica de ELISA, el título de anticuerpos contra la cepa nueva, debe ser al menos ocho veces mayor, respecto a las cepas de referencia ya conocidas.

Durante la década de los 90's gracias a la producción de anticuerpos monoclonales específicos de serotipo G, se desarrollaron estudios epidemiológicos masivos en infantes con gastroenteritis, obteniéndose que los serotipos G1, G2, G3 y G4 son los que con mayor frecuencia circulan entre la población infantil. Sin embargo, la aparición de los serotipos G9 y G12, ha mostrado que este patrón de cepas circulantes en humanos puede variar durante los brotes epidémicos (Santos and Hoshino, 2005).

4.4 Características antigénicas de la proteína VP4.

La proteína VP4 es codificada por gen el 4 y según el origen de la cepa viral, varia el número de nucleótidos. Para los rotavirus aislados de animales, este gen está constituido por 2,362 nucleótidos, mientras que las cepas de origen humano, presenta tres nucleótidos menos, con un

tamaño de 2,359 nucleótidos (Huang *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1993). Esta diferencia en el número de nucleótidos del gen 4 entre cepas de rotavirus, se ve reflejada también en el número de aminoácidos de la proteína VP4 traducida, donde los rotavirus animales presentan 776 aminoácidos, mientras que los rotavirus humanos, contiene 775 aminoácidos. El aminoácido faltante en las cepas humanas, corresponde a la posición 136 en las cepas animales (Estes and Cohen, 1989).

Sin embargo, independientemente del origen de la cepa de rotavirus, el gen 4 presenta un marco de lectura que inicia en el nucleótido 10 y termina en el nucleótido 2,337. Por lo tanto, este gen presenta dos regiones no codificantes, una de 9 nucleótidos en el extremo 5' y otra de 25 nucleótidos en el extremo 3'. En los procesos de penetración del virus a la célula hospedero, esta proteína requiere pasar por un corte proteolítico con tripsina, produciéndose dos productos proteicos lo que aumenta la eficiencia de penetración. Estos productos son denominados VP8* de 247 aminoácidos y VP5* de 529 aminoácidos (Ludert *et al.*, 1996). En estudios de comparación de la secuencia de nucleótidos del gen 4 de cepas de rotavirus animales y humanas, se ha observado que el corte proteolítico de VP4, por lo general se realiza en un residuo de Arginina en la posición 247, sin embargo, se ha propuesto que en algunas cepas de rotavirus animales, el corte con tripsina puede realizarse en otros residuos de Arginina que se encuentran en la posiciones 231 ó 241 (López *et al.*, 1985). Además, con los análisis comparativos de la secuencia de aminoácidos de la proteína VP4 de cepas animales y humanas, también se ha determinado que la subunidad VP8* (extremo amino) es la que presenta mayor variabilidad en la secuencia de aminoácidos, considerándose la región 72-201 como la zona más variable de toda la proteína VP4. Por su parte, en la subunidad VP5* predominan grandes zonas conservadas entre cepas de rotavirus tanto de origen humano como de diferentes especies animales (Estes and Cohen, 1989). Por lo tanto, se ha propuesto que la variabilidad y

homogeneidad de la secuencia de aminoácidos de la proteína VP4, puede estar relacionada con las diferentes funciones que presenta esta proteína. Así, la variabilidad de la subunidad VP8* está directamente implicada con las diferencias antigénicas entre las cepas de rotavirus con distinto serotipo; mientras que la homogeneidad de VP5*, está relacionada en la penetración del virus a la célula hospedero. Este concepto se refuerza por estudios utilizando exclusivamente VP5* recombinante, donde se ha demostrado que presenta actividad lipofílica en vesículas membranosas (liposomas) (Dowling *et al.*, 2000). Además también se ha localizado una región de fusión a la membrana (aminoácidos 385-404) responsable de esta actividad, y estudios de comparación de aminoácidos de esta región, revelaron que presenta homología con el dominio de fusión de la proteína E1 de los virus envueltos Sindbis y Semiliki Forest (SFV) (Mackow *et al.*, 1988). Por lo tanto, se ha propuesto que durante la penetración de rotavirus a la célula blanco, la proteína VP4 presenta una estructura “flexible”. Cuando se digiere con tripsina, se forman las subunidades VP8* y VP5*, las cuales no se separan físicamente sino que presentan un rearrreglo adoptando una “estructura rígida”. De esta manera, queda expuesta la región de fusión a membrana en la subunidad VP5*, lo que permite la entrada de rotavirus de forma directa a través de la membrana de la célula (Dormitzer *et al.*, 2004).

Por otra parte, al igual que VP7, la proteína VP4 ha sido objeto de estudios para definir su importancia antigénica. Los primeros indicios de que esta proteína podría 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 (Greenberg *et al.*, 1983). Para establecer el sistema de los serotipos P de la proteína VP4, la primera estrategia fue producir antisuero de cobayos inmunizados con proteínas recombinantes expresadas en baculovirus. Con estos anticuerpos, se realizaron ensayos de neutralización contra cepas de rotavirus humanas con serotipo G

conocido. El criterio para considerar un serotipo distinto, era que existiera al menos una diferencia de ocho veces en el título de anticuerpos neutralizantes (Gorziglia *et al.*, 1990; Hoshino *et al.*, 1984). De esta manera, se obtuvo las relaciones antigénicas entre cepas de rotavirus humanas, determinándose que cepas con diferente serotipo G, presentan el mismo serotipo P como se indica en la tabla I (Gorziglia *et al.*, 1990).

Tabla I: Relaciones antigénicas entre cepas de rotavirus humanas determinadas mediante ensayos de neutralización.

Cepa de Rotavirus	Serotipo G (VP7)	Tipo de infección	Serotipo P (VP4)
KU	1	Sintomática	1 A
Wa	1	"	1 A
P	3	"	1 A
YO	3	"	1 A
MO	3	"	1 A
Hochi	4	"	1 A
VA70	4	"	1 A
Hosokawa	4	"	1 A
Wi61	9	"	1 A
F45	9	"	1 A
DS-1	2	"	1 B
S2	2	"	1 B
M37	1	Asintomática	2
1076	2	"	2
McN	3	"	2
ST3	4	"	2
K8	1	Sintomática	3

Referencia: Gorziglia *et al.*, 1990.

Sin embargo, desde los primeros anticuerpos que se produjeron para identificar los serotipos P, se mostró evidencia de que estos presentaban reactividad cruzada hacia cepas distintas de las que se utilizaron para su producción. Lo anterior y las observaciones sobre la protección heteróloga de estos anticuerpos cuando se administraban a ratones recién nacidos de forma pasiva, indicaron que las cepas circulantes aunque diferentes, mantenían características antigénicas similares que complicaban su identificación (Offit *et al.*, 1986). Por tal motivo, los

estudios se centraron en encontrar los sitios antigénicos en cada una de las subunidades de la proteína VP4 (VP8* y VP5*) para construir un mapa antigénico mostrando los determinantes antigénicos específicos de serotipo y de reacción cruzada.

4.4.1 Características antigénicas de la subunidad VP8* y VP5*.

La primera estrategia para mapear los sitios antigénicos en VP8* y VP5*, fue producir anticuerpos monoclonales neutralizantes. Con estos anticuerpos fue posible detectar cepas de rotavirus que escapan a la neutralización, localizando los sitios importantes en cada una de las subunidades que les da la capacidad de evitar la neutralización. Los análisis de secuencia de la proteína VP4 de las cepas virales que escapan a la neutralización, dieron evidencia de que tanto en la subunidad VP8* como VP5*, existen zonas antigénicas con epitopes de neutralización.

Los primeros estudios mostraron la presencia de epitopes de reactividad cruzada que mapearon en la subunidad VP5* de la proteína VP4 de la cepa humana KU (Taniguchi *et al.*, 1987). El análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína VP4 de estas cepas mutantes, reveló que un solo cambio de aminoácido puede afectar al epitope de reacción cruzada. Además, análisis funcionales y topográficos de estos epitopes, también mostró evidencia de que los anticuerpos pueden reconocer estructuras de forma independiente o translapadas en la subunidad VP5*. Por lo tanto, los cambios de aminoácidos producen un efecto alostérico en la región antigénica afectando la unión de los anticuerpos monoclonales; lo que demuestra la presencia de epitopes conformacionales en estas regiones (Taniguchi *et al.*, 1988; Kobayashi *et al.*, 1990).

Por otra parte, el estudio de las cepas de rotavirus mutantes que escapan a la neutralización, ha revelado muy baja especificidad de los anticuerpos monoclonales hacia la subunidad VP8* (Tabla II). Sin embargo, a diferencia de los anticuerpos que reconocen epitopes en la región de VP5*, los anticuerpos monoclonales que reaccionan con epitopes de neutralización en la subunidad de

VP8*, presentan una reacción homóloga, por lo que se consideran específicos de serotipo (Padilla-Noriega *et al.*, 1995; Kirkwood *et al.*, 1996).

La evidencia de que en la subunidad VP8* existen los epitopes de neutralización específicos de serotipo, fueron confirmados en ensayos de neutralización y coinmunoprecipitación con antisuero específico contra VP8* o VP5* producidas de forma recombinante. En donde se demostró, que los anticuerpos producidos contra VP8* sólo reconocieron a su cepa homóloga, mientras que la neutralización por el antisuero específico de VP5* hacia cepas de rotavirus humanas que representan distintos serotipos de VP4, reforzó que en esta subunidad, se ubican los principales sitios antigénicos de reactividad cruzada (Larralde *et al.*, 1991; Larralde and Gorziglia, 1992).

Otro aspecto importante en la detección de epitopes de neutralización se basa en estudios de la estructura tridimensional del “core” (aminoácidos 60-223) de la subunidad VP8*. Utilizando la cepa de rotavirus humana DS-1 (serotipo P1B) se presentó evidencia de que la mayoría de los epitopes que reconocen los anticuerpos neutralizantes dependen de una conformación estructural para su reconocimiento (Monnier *et al.*, 2006).

No obstante, aun y cuando con estos experimentos se demuestra que la región de VP8* puede ser la más importante para la reactividad específica de serotipo, a la fecha no se ha podido establecer la producción de anticuerpos específicos de cepa, que definan la real importancia de los serotipos circulantes.

Además, en virtud de que un solo cambio de aminoácido es suficiente para cambiar las características antigénicas de la proteína, se hace evidente que un anticuerpo previamente establecido para detectar un serotipo particular puede perder su reactividad.

Por ejemplo, para el serotipo denominado P1A aunque se han producido toda una batería de anticuerpos monoclonales para su detección, cuando se analizaron cepas de rotavirus durante estudios epidemiológicos con estos anticuerpos, se observó que no todos los anticuerpos

reaccionaban con las cepas virales, lo que implica que la presencia de epitopes en cepas de rotavirus con un mismo serotipo, puede variar de una cepa a otra en los aislados durante los brotes epidémicos (Padilla-Noriega *et al.*, 1993; Coulson, 1993; Contreras *et al.*, 1995; Padilla-Noriega *et al.*, 1998). Lo anterior, es un factor que limita la producción de suficientes anticuerpos monoclonales para ser utilizados en estudios masivos de cepas de rotavirus de campo.

4.5 Respuesta inmune contra la proteína VP4.

El estudio de la respuesta inmune contra las proteínas de rotavirus en suero de pacientes con gastroenteritis, fue desarrollado para conocer las proteínas responsables de inducir una respuesta de anticuerpos durante una infección por rotavirus, con el objetivo de diseñar mejores estrategias de vacunación.

Por lo tanto, aunque se ha determinado que durante una infección natural con rotavirus se pueden producir anticuerpos contra las proteínas estructurales y no estructurales, existe una mayor inmunodominancia de anticuerpos hacia las proteínas VP2 y VP6, las cuales son las más abundantes en la partícula viral (Svensson *et al.*, 1987; Richardson and Bishop, 1990).

Sin embargo, ya que las proteínas de superficie VP7 y VP4 son las responsables de la neutralización viral, la mayoría de los estudios de la respuesta inmune se han enfocado a analizar la respuesta de anticuerpos durante una infección natural, hacia estas proteínas.

Por tal motivo, la determinación de anticuerpos neutralizantes hacia las proteínas VP7 y VP4, no fue posible hasta que se desarrollaron cepas de rotavirus rearreglantes, las cuales se producen coinfectando células *in vitro*, con dos cepas de rotavirus con serotipo diferente (animal-animal ó animal-humano) y gracias a que los rotavirus presentan su genoma en segmentos, los genes virales se mezclan, dando la formación de nuevos virus quiméricos con una mezcla de proteínas

Tabla II: Estructura antigénica de la proteína VP4 en cepas de rotavirus humanas, determinada por anticuerpos monoclonales y cepas mutantes que escapan a la neutralización.

Anticuerpo Monoclonal	Región VP4	Aminoácido	Mutación	Cepa Rotavirus (Serotipo)	Especie Inmunizada	Referencia
HS6	VP8*	72	T – I	ST3 (G4, P2)	Ratón	Padilla-Noriega, <i>et al.</i> 1995
RV:5-2	“	148	Q – R	RV-5 (G2, P1B)	Ratón	Coulson, 1993, Kirkwood, <i>et al.</i> 1996
1-2H	“	170	G – D	KU (G1, P1A)	Humano	Higo-Moriguchi, <i>et al.</i> 2004
2-3H	“	203	E – K	KU	Humano	Higo-Moriguchi, <i>et al.</i> 2004
HS11	“	217	E – K	ST3	Ratón	Padilla-Noriega, <i>et al.</i> 1995
YO-2C2	VP5*	305	L – P	YO (G3, P1A)	Ratón	Taniguchi, <i>et al.</i> 1988
HS16	“	385	N- G	ST3	Ratón	Padilla-Noriega, <i>et al.</i> 1995
KU-6B11	“	392	A – T	KU	Ratón	Taniguchi, <i>et al.</i> 1988
YO-1S3	“	392	A – T	YO	Ratón	Taniguchi, <i>et al.</i> 1988
ST-1F2	“	392	A – T	ST3	Ratón	Taniguchi, <i>et al.</i> 1988
1E4	“	392	A – V	Wa (G1, P1A)	Ratón	Padilla-Noriega, <i>et al.</i> 1995
F45:4	“	392	A-V	F45 (G1, P1A)	Ratón	Coulson, 1993 Kirkwood, <i>et al.</i> 1996
KU-4D7	“	433	E – K	KU	Ratón	Taniguchi, <i>et al.</i> 1988
YO-1E6	“	439	L – S	YO	Ratón	Taniguchi, <i>et al.</i> 1988
1A10	“	458	G – R	Wa	Ratón	Padilla-Noriega, <i>et al.</i> 1995

de diferente origen.

Así, debido a la especificidad de especie de los anticuerpos, cuando se analiza suero humano con cepas de rotavirus rearreglantes, la neutralización de estos virus se debe a que los anticuerpos reconocen a la proteína viral proveniente de una cepa de rotavirus humana (Gorrell and Bishop, 1997).

De esta manera, el análisis de anticuerpos específicos hacia las proteínas VP4 y VP7 en suero de niños vacunados con la cepa de rotavirus bovino WC3 (serotipo G6,P7), demostró que la proteína VP7 era el antígeno de neutralización dominante (Ward *et al.*, 1990). Sin embargo en infecciones naturales, sobre todo en infecciones primarias, se ha observado mayor título de anticuerpos hacia la proteína VP4 (Brüssow *et al.*, 1990). Esta inmunodominancia de la proteína VP4 en la inducción de anticuerpos neutralizantes, también ha revelado que estos anticuerpos son protectores para futuras infecciones y además, ya que los anticuerpos presentan reactividad homotípica al serotipo de la cepa de rotavirus infectante, también muestran actividad neutralizante con cepas de rotavirus que presentan diferente serotipo G (Ward *et al.*, 1993; Menchaca *et al.*, 1998).

Sin embargo, aunque los estudios con cepas de rotavirus rearreglantes han apoyado el diseño de las diferentes estrategias que existen para la producción de cepas vacunales contra rotavirus, la contribución de las subunidades VP8* y VP5* de la proteína VP4 en la inducción de anticuerpos en infecciones naturales en humanos, aun no está clara. Ya que a la fecha, el análisis de la respuesta de anticuerpos contra la subunidad VP8* y VP5* sólo se ha realizado en suero de niños vacunados con la cepa de rotavirus animal RRV (rotavirus de simio rhesus). Para determinar la producción de anticuerpos específicos contra cada subunidad, mediante la tecnología del DNA recombinante, las subunidades VP8* y VP5* de la cepa de rotavirus RRV, fueron producidas en baculovirus; demostrándose títulos de anticuerpos IgG mayores contra la subunidad VP8*, que contra la subunidad VP5* (Padilla-Noriega *et al.*, 1992).

Sin embargo estudios realizados en animales, ha demostrado que anticuerpos contra la subunidad VP8* son suficientes para neutralizar al virus y proteger contra futuras infecciones en ratones recién nacidos (Matsui *et al.*, 1989). Además, la subunidad VP8* producida de forma recombinante, mantiene su estructura antigénica nativa y puede ser administrada por vía oral en

bovinos induciendo la producción de anticuerpos neutralizantes que protegen de infecciones con rotavirus (Favacho *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 1995; Gil *et al.*, 2000; Pérez-Filgueira *et al.*, 2004)

Por lo tanto, es importante establecer la antigenicidad de la subunidad VP8* en niños con infecciones naturales, para determinar regiones inmunodominantes que permitan mejorar las nuevas cepas vacunales contra rotavirus, utilizando estrategias como Genética reversa, tal como lo demostró Komoto y colaboradores, produciendo un “nuevo” rotavirus con un mosaico antigénico en la proteína VP4 (Komoto *et al.*, 2008). Además, el estudio de la especificidad de los anticuerpos producidos en infecciones naturales contribuye también a encontrar nuevos determinantes antigénicos (epitopes) para la producción de anticuerpos monoclonales específicos de serotipo, que puedan ser utilizados en los estudios epidemiológicos de rotavirus.

4.6 Genotipos P, linajes y sublinajes de la proteína VP4.

Gracias a estudios de hibridación RNA-RNA y comparación de la secuencia de nucleótidos del gen 4 de cepas de rotavirus animales y humanos, se ha demostrado que existen alelos diferentes para la proteína VP4, los cuales presentan diferentes características antigénicas (Gorziglia *et al.*, 1988). Los primeros alelos del gen 4, fueron denominados con números consecutivos según su orden de estudio: 1, 2 y 3 (rotavirus de simio SA11), 4 (rotavirus humano RV5-2, DS-1), 5 (rotavirus bovino UK), 6 (rotavirus humano M37, RV3, 1076), 7 (rotavirus porcino OSU, SB-1A), 8 (rotavirus humano Wa, KU, P, VA70) y 9 (rotavirus humano K8) (Estes and Cohen, 1989). Este conocimiento permitió desarrollar una serie de oligonucleótidos para PCR, a partir de la región del gen 4 que comprende los nucleótidos 1-600 la cual según los análisis de secuencia, presenta la más alta variabilidad entre cepas con diferente serotipo P y también existen regiones conservadas entre cepas de un mismo serotipo. Estos oligonucleótidos fueron probados para analizar su especificidad utilizando cepas de referencia y cepas de rotavirus de campo,

proponiéndose esta nueva técnica de tipificación para caracterizar las cepas de rotavirus en circulación, surgiendo el término “*Genotipo P*” (Gentsch *et al.*, 1992). Posteriormente para distinguir los diferentes genotipos P, de los serotipos P obtenidos con anticuerpos monoclonales, se acordó escribir el genotipo entre corchetes []; por ejemplo, la cepa Wa presenta el serotipo P1A[8] (Pérez-Vargas *et al.*, 2005). A la fecha, para determinar un genotipo P diferente a los ya conocidos, el criterio utilizado es que la comparación de la secuencia de aminoácidos de la proteína VP4, deberá presentar <89% de identidad; mientras que las proteínas VP4 que presenten >89% de identidad, pertenecerán a un mismo genotipo P. De esta manera, se han determinado 33 genotipos P entre cepas de rotavirus animales y humanas (Abe *et al.*, 2011).

Existen innumerables estudios epidemiológicos en todo el mundo de las características genotípicas de las cepas de rotavirus de campo considerando los genotipos de VP4 y VP7 (Das *et al.*, 1994; Steele *et al.*, 1995; Padilla-Noriega *et al.*, 1998; Griffin *et al.*, 2000; Koshimura *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2003; Banyai *et al.*, 2004). Con los resultados obtenidos de la distribución geográfica de rotavirus, se ha determinado que las cepas con genotipo G1, G2, G3 y G4 en asociación con el genotipo P[8], corresponden al 88% de los casos de gastroenteritis reportados, mientras que las cepas con genotipo G9P[8] y G9P[6] juntas presentan un 4.1%. Por otra parte, en Norteamérica, Europa y Australia, la cepa de rotavirus G1P[8] es la que se reporta en un 70% de los casos; mientras que en Sudamérica, Asia y África, esta cepa sólo representa un 23%. Asimismo, las cepas con genotipo G8P[8] y G5P[8] sólo se han reportado en África y Sudamérica respectivamente. Por lo tanto, estos resultados resaltan la importancia de continuar con la vigilancia epidemiológica de rotavirus para proveer información sobre la evolución de estos virus. En este sentido, un aspecto importante que ha resultado sobre la epidemiología de los genotipos de rotavirus mediante PCR, es la falta de tipificación de un 10-30% de las cepas estudiadas, ya que los cambios en la secuencia de nucleótidos impide el alineamiento de los oligonucleótidos.

Por lo que surge la necesidad de obtener la secuencia de nucleótidos de los genes de rotavirus, para “ajustar” la secuencia o bien, diseñar nuevos oligonucleótidos en zonas más conservadas (Iturriza-Gómara *et al.*, 2000).

Por otra parte, los análisis filogenéticos de la secuencia de nucleótidos de los genes que codifican para las proteínas VP4 y VP7 respectivamente, han demostrado que cepas virales con un mismo genotipo G ó P, pueden presentar diferencias en la secuencia de nucleótidos/aminoácidos y según el porcentaje de identidad, ha permitido la clasificación de las cepas de rotavirus en linajes y sublinajes. De esta manera, se ha demostrado que el genotipo G1, presenta 8 linajes: G1-1, G1-2, G1-3, G1-4, G1-5, G1-6, G1-7 y G1-8 con un 93 al 96% de identidad entre cada linaje (Arora *et al.*, 2009). Con respecto al genotipo P[8], las cepas de rotavirus también han sido clasificadas en 4 linajes: P[8]-1, P[8]-2, P[8]-3 y P[4] presentando un 87-91% de identidad, mientras que las cepas de un mismo linaje muestran un 94.1 a 96.8% de identidad (Maunula and von Bonsdorff, 1998; Cunliffe *et al.*, 2001).

El análisis filogenético de las secuencias obtenidas de la base de datos en el GenBank (NCBI) de cepas de rotavirus de campo aisladas en todo el mundo, se ha determinado que la mayoría de las cepas de rotavirus aisladas en Europa, Asia y Sudamérica pertenecen al linaje P[8]-3; en Estados Unidos, solo se han reportado cepas con linaje P[8]-1 y P[8]-2; mientras que cepas con linaje P[8]-4 se localizan en África y el este de la India (Iturriza-Gómara *et al.*, 2001; Cunliffe *et al.*, 2001; Espínola *et al.*, 2008; Samadjar *et al.*, 2008). Por otra parte, ya que el linaje P[8]-3 es el más predominante entre las cepas de rotavirus con genotipo P[8], los análisis filogenéticos de este linaje, también han revelado 4 sublinajes, los cuales se denominan con números romanos I, II, III y IV; sin embargo, aun no está claro el porcentaje de identidad para definir sublinajes (Samadjar *et al.*, 2008; Dey *et al.*, 2009).

En virtud de que los estudios filogenéticos ayudan a mejorar el entendimiento de la evolución de

rotavirus, se ha propuesto una nueva clasificación basada en la secuencia de nucleótidos de los 11 genes de RNA, en donde además de obtener el genotipo de cada gen, también se puede identificar rearrreglos génicos y transmisión de genes entre rotavirus animales y humanos, lo cual revela orígenes comunes inter especies. Sin embargo, con esta nueva clasificación, el porcentaje de homología para identificar un nuevo genotipo del gen 4 (VP4) y 9 (VP7), ha cambiado de 89% a 80%, como se indica en la tabla III (Matthijnsens *et al.*, 2008).

Por otra parte, continúa la problemática de saber si estos cambios en la secuencia de nucleótidos/aminoácidos de los diferentes genotipos, son importantes antigénicamente; ya que para la proteína VP4, debido a la falta de anticuerpos específicos de serotipo, de los 33 genotipos P que se conocen en la actualidad, sólo 14 han sido caracterizados antigénicamente utilizando anticuerpos (Martella *et al.*, 2007; Collins *et al.*, 2010).

Tabla III. Clasificación de rotavirus basada en los 11 genes de ARN.

Gen	Producto	Nombre Genotipo	Significado	% homología (cut-off)	Genotipos determinados
1	VP1	R	RNA polimerasa dependiente RNA	83	4
2	VP2	C	Proteína capa interna "core"	84	5
3	VP3	M	Enzima Metiltransferasa	81	6
4	VP4	P	Sensible a proteasas	80 (89 ^a)	27
5	NSP1	A	Antagonista del interferón	79	14
6	VP6	I	Proteína capa intermedia	85	11
7	NSP2	N	NTPasa	85	5
8	NSP3	T	Potenciador de la traducción	85	7
9	VP7	G	Proteína glicosilada	80 (89 ^a)	19
10	NSP4	E	Enterotoxina	85	11
11	NSP5	H	Fosfoproteína	91	6

a: Porcentaje de homología basada en la secuencia de aminoácidos de las proteínas VP7 y VP4, propuesta por Gorziglia *et al.*, 1990.

Referencia tabla: Matthijnsens *et al.*, 2008.

Además, no está claro si anticuerpos producidos contra un genotipo P pueden reaccionar contra cepas de rotavirus con diferente linaje. lo cual sería de gran valía para evaluar la eficacia de las cepas vacunales.

4.7 Vacunas contra rotavirus.

El objetivo principal del desarrollo de las vacunas contra rotavirus además de proteger contra infecciones subsecuentes, es la disminución del número de muertes de los infantes en casos de gastroenteritis aguda severa. Sin embargo, diferentes estrategias han sido desarrolladas para la producción de vacunas efectivas contra la diarrea por rotavirus.

La primera de ellas fue el empleo de cepas de rotavirus animales, las cuales siguiendo el principio Jeneriano, presentan características antigénicas similares a las cepas virulentas humanas, induciendo una respuesta inmune sin desarrollar la enfermedad. De esta manera se utilizaron las cepas de rotavirus que afectan a bovinos NCDV (vacuna RIT4237) y WC3 ambas con serotipo G6P6 y G6P7 respectivamente; la cepa de simio Rhesus RRV (vacuna MMU18006) serotipo G3P5B y la cepa de ganado ovino LLR (Lanzhou Lamb Rotavirus) con genotipo G10P[10]; sin embargo, estas cepas solo mostraron cierta protección contra cepas de rotavirus humanas, debido a que las cepas de rotavirus animales presentaron capacidad limitada para replicarse en el niño vacunado y no producen diarrea, característica importante para la inducción de una buena respuesta inmune (Delem *et al.*, 1984; Wright *et al.*, 1987; Pérez-Vargas *et al.*, 2005).

Por otra parte, la producción de cepas de rotavirus rearreglantes utilizando cepas animales y humanas dio como resultado la primera vacuna de rotavirus en ser aprobada para su aplicación en los Estados Unidos en 1998. La vacuna RotaShield fue una vacuna tetravalente formada por 4 cepas de rotavirus rearreglantes que presentaban la proteína VP7 humana con serotipo G1, G2,

G3 y G4 en combinación con la cepa de simio Rhesus (RRV) MMU18006. Sin embargo, aunque demostró hasta un 70% de eficacia, el Centro de Control y Prevención de Enfermedades en Atlanta, reportó 100 casos de invaginación en los intestinos de los infantes que recibieron la vacuna, donde 15 de ellos, fueron fatales. Por lo que en 1999 esta vacuna fue retirada del mercado (Vesikari *et al.*, 1992; Zanardi *et al.*, 2001).

El riesgo a una invaginación de los intestinos, ha sido desde entonces uno de los principales controles a evitar en las nuevas cepas de rotavirus vacunales y la Organización Mundial de la Salud, sugiere que se siga monitoreando este síntoma en los niños vacunados. De esta manera, la vacuna RotaTeq, la cual también está formada por 5 cepas de rotavirus rearreglantes que contienen las proteínas humanas VP7 con serotipo G1, G2, G3, G4 y la proteína VP4 con serotipo P1A en combinación con la cepa de bovino UK, ha demostrado ser segura, sin riesgo de producir invaginación intestinal. Esta vacuna elaborada por la compañía Merck & Co, ha sido aplicada en Estados Unidos y Finlandia principalmente, y está aprobada por la Food and Drug Administration desde 2006 (Clark *et al.*, 1996).

Finalmente otra estrategia para la producción de vacunas contra rotavirus, es el aislamiento de cepas de rotavirus de campo, las cuales son adaptadas a cultivo de células animales y son atenuadas por pases consecutivos. Así, una de las principales vacunas contra rotavirus utilizadas en la actualidad, es la vacuna monovalente Rotarix[®], la cual contiene la cepa vacunal humana RIX4414 con genotipo G1P[8]. Esta cepa de rotavirus fue obtenida en Cincinnati, Ohio durante el brote epidémico 1988-1989, y fue adaptada a cultivo celular denominándose cepa 89-12 y después de 33 pases consecutivos fue atenuada (Vesikari *et al.*, 2004; Ward *et al.*, 2006). Esta vacuna es producida por la compañía Glaxo Smith Kline (GSK) y ha sido aplicada en niños de 2-4 meses de edad, en Finlandia, África y América Latina, donde ha demostrado también ser segura y no presentar riesgo de invaginación intestinal. Además gracias a la vacuna Rotarix[®], la

hospitalización por diarrea se ha reducido hasta un 42% y también se ha demostrado la eficacia para prevenir la gastroenteritis por rotavirus contra cepas virales con genotipo G3P[8], G4P[8] y G9P[8] (Ruiz-Palacios *et al.*, 2006).

En México esta vacuna fue licenciada para su aplicación desde 2004, y a partir del 2006, forma parte del programa Nacional de Vacunación (Cheuvar *et al.*, 2009). Por lo tanto, en nuestro país, de acuerdo a los datos obtenidos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), el número de muertes asociadas a la diarrea en infantes menores de 5 años ha disminuido significativamente desde la aplicación de la vacuna Rotarix®. Se estima que durante el 2007, un 74% de niños con 11 meses de edad recibieron al menos una dosis de la vacuna. Los reportes indican que en los años 2003-2006 existió una media de muertes de 1,793 infantes relacionadas con diarrea, lo que resultó en una media anual de 18.1 muertes/100,000 niños; mientras que en los años 2008-2009, existió una media anual de 11.8 muertes/100,000 niños observándose una reducción en el número de muertes de un 35%, lo que muestra los beneficios de la vacunación contra rotavirus (Richardson *et al.*, 2010).

Al igual que en México, existen reportes en otras partes del mundo, como Australia y Panamá, sobre la disminución del número de casos de diarrea debido a la aplicación de la vacuna Rotarix® (Buttery *et al.*, 2011; Molto *et al.*, 2011); sin embargo, hay evidencias que debido a la introducción de esta vacuna, existe la emergencia de nuevas cepas de rotavirus con genotipo diferente a las cepas vacunales, como es el caso de rotavirus con genotipo G9, P[4] y P[6] (Abdel-Haq *et al.*, 2011; Kirkwood *et al.*, 2011); por lo que es importante mantener una continua vigilancia epidemiológica de las cepas de rotavirus circulantes, para evaluar no sólo la eficacia de las vacunas, si no también, para detectar el surgimiento de nuevas cepas de rotavirus o rearrreglos genéticos entre las cepas de rotavirus ya existentes (Rose *et al.*, 2010), que induzcan la producción de nuevas vacunas contra la gastroenteritis por rotavirus.

4. METODOLOGÍA

5.1 Muestras de heces y suero.

Las muestras de heces y suero utilizadas en este estudio, fueron colectadas durante dos brotes epidémicos consecutivos de rotavirus: 2006-2007 y 2007-2008 en la ciudad de Chihuahua, Chihuahua, México. El criterio para la recolección de la muestra de suero, fue obtener una muestra de sangre de infantes menores de 5 años durante su estancia en el hospital, y que presentaran gastroenteritis por rotavirus. El suero fue separado de la muestra de sangre por centrifugación y fue congelado a -20°C hasta su uso.

5.2 Cepas de rotavirus.

La cepa de rotavirus humano Wa (genotipo G1,P[8]) utilizada como cepa de referencia, fue proporcionada por el Dr. Carlos F. Arias del Instituto de Biotecnología, U.N.A.M. México.

5.3 Subcultivo de células MA-104:

El cultivo de la línea celular MA-104 (células epiteliales embrionarias de riñón de mono Rhesus) se realizó en frascos de 25 cm^2 y cuando la monocapa estaba confluyente, se realizó el subcultivo. En una campana de flujo laminar vertical previamente desinfectada, se retiró con una pipeta Pasteur el medio de cultivo, utilizando una bomba de vacío. Posteriormente se adicionó al frasco de cultivo, 2 ml de una solución de EDTA 0.68 mM para lavar la células. La solución de EDTA se retiró con una pipeta Pasteur y se adicionó 500 μl de tripsina 0.25%. Se observó las células en un microscopio invertido, hasta que estas presentaron una forma redondeada. Con ayuda de un golpe en uno de los extremos del frasco, las células fueron desprendidas del frasco y la tripsina

fue inactivada adicionando 2 ml de medio D-MEM suplementado con 3% de suero fetal de bovino (SFB). Las células fueron homogenizadas varias veces con una pipeta serológica para evitar la formación de aglomerados. Posteriormente 250 μ l de las células (aprox. 500,000 células) se pasaron a un nuevo frasco de cultivo de 25 cm² previamente etiquetado con el nombre de línea celular y el número de pase, el cual contenía 4.5 ml de medio D-MEM-SFB 3%. Con movimientos suaves se distribuyeron las células en toda la superficie del frasco y se incubaron a 37°C/5% CO₂ por 4 días.

5.4 Propagación de cepas de rotavirus en cultivo celular.

La producción de cepas de rotavirus en cultivo celular se realizó utilizando el protocolo previamente descrito por Taniguchi y colaboradores (Taniguchi *et al.*, 1988). Una alícuota de 300 μ l de la cepa de rotavirus Wa fue activada con 1 μ l de tripsina 1% (concentración final de 10 μ g/ml) incubando a 37°C por 30 min. El virus activado se adicionó a una monocapa de células MA-104 producidas en tubos de 5 cm². Las células antes de ser infectadas fueron lavadas 2 veces con 1 ml de PBS A 1X (sin Ca ni Mg). Se incubó a 37°C por 1 hora y después se adicionó 2 ml de medio esencial mínimo (MEM) sin suero fetal de bovino. Los tubos se mantuvieron en incubación a 37°C/5% CO₂, hasta observar el efecto citopático (lisis celular). Cuando existió más del 50% de la monocapa celular destruida (24-48 horas post infección) se suspendió la incubación. El tubo con las células infectadas se congeló a -20°C por 30 min y después se descongeló en agua tibia (37°C) por 10 minutos, repitiéndose este procedimiento 3 veces. El lisado celular se dispensó en alícuotas de 500 μ l y se almacenó a -20°C hasta su uso.

5.4.1 Microtitulación de unidades formadoras de focos (UFF/ml).

La cuantificación de partículas virales infecciosas (UFF/ml) en los lisados celulares, se realizó utilizando el protocolo de tinción con Inmunoperoxidasa descrito por Arias y colaboradores (Arias *et al.*, 1987). Una alícuota de 350 μ l de lisado celular con la cepa de rotavirus Wa, fue activada con 1 μ l de tripsina 1% (10 μ g/ml concentración final) incubándose 30 min a 37°C. Posteriormente en una placa de 96 pozos estéril, se preparó por duplicado 200 μ l de las diluciones: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 y 1:128 del virus activado en MEM sin suero. Se lavó dos veces una placa de 96 pozos con células MA-104, con 200 μ l de PBS A 1X y después se adicionó 50 μ l de cada dilución del virus. También se incluyó 2 pozos con 50 μ l del virus concentrado (sin diluir). Las células fueron incubadas a 37°C por una hora. Se retiró los virus y se lavó una vez con 200 μ l de PBS A 1X, después se adicionó 150 μ l de MEM sin suero. La placa se incubó a 37°C por 14 horas. Al término de esta incubación, se retiró el medio de cultivo, se lavó una vez con 200 μ l de PBS A 1X, y se fijaron las células a la placa de plástico adicionando 100 μ l de Acetona 80%-PBS A 5X, incubando 40 minutos a temperatura ambiente (condiciones sin esterilidad). Posteriormente se lavó 2 veces con 200 μ l de PBS A 1X y se adicionó 75 μ l de Anti-rotavirus (Anti-TLP's) diluido 1:3,000 en PBS A 1X. La placa se incubó a 37°C por una hora. Se retiró el anticuerpo y se lavó 2 veces con 200 μ l de PBS A 1X, para adicionar 75 μ l de Proteína A unida a Peroxidasa de rábano (Amersham) diluida 1:2,000. Se incubó a 37°C por una hora. Se lavó 2 veces con 200 μ l de PBS A 1X y se adicionó 75 μ l de Carbazol (Sigma-Aldrich). La placa se incubó a 37°C por 15 minutos en oscuridad y la reacción enzimática se detuvo lavando la placa con agua corriente 5 veces. El título de unidades formadoras de focos infecciosos se determinó en la dilución donde se contó entre 100 y 200 focos. El número de UFF/ml fue determinado con la siguiente fórmula:

$$\text{UFF/ml} = 20 \times 5.5 \times \text{Promedio de focos} \times \text{dilución}$$

Donde:

20 = Objetivo 20X del microscopio invertido

5.5 = Diámetro (mm) de un pozo de la placa 96 pozos

Promedio = Se obtiene un promedio del número de focos de los dos pozos de cada dilución

Dilución = Dilución donde se contó de 100-200 focos infecciosos

5.4.2 Neutralización de focos infecciosos.

Se activó una alícuota de la cepa Wa, considerando el título de UFF/ml del virus y el número de sueros a analizar. Por cada mililitro de lisado con virus se adicionó 1 μl de tripsina al 1%, incubándose a 37°C por 30 min. Posteriormente se realizó por duplicado diluciones del suero de los niños: 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 y 1:800 en una placa de 96 pozos estéril utilizando MEM sin suero. A 50 μl de cada dilución, se mezcló con 50 μl del virus activado y diluido a una concentración final de 100-200 UFF/ml. La mezcla virus-anticuerpo se incubó a 37°C por 1 hora. Después una placa de 96 pozos con células MA-104, fue lavada dos veces con 200 μl PBS A 1X, y después se les adicionó 50 μl de la mezcla virus-anticuerpo. También se utilizó 2 hileras de 8 pozos como control negativo, en donde sólo se adicionó 50 μl de virus activado y diluido (100-200 UFF/ml). La placa se incubó a 37°C por 1 hora. Se retiró la mezcla virus-suero, y se hizo un lavado con 200 μl de PBS A 1X, después se adicionó 150 μl de MEM sin suero. La placa se incubó a 37°C/5% CO₂ por 14 hrs. Al término de este tiempo, las células fueron teñidas con la

técnica de inmunoperoxidasa descrita en la microtitulación de focos infecciosos. El título de anticuerpos neutralizantes se determinó utilizando el siguiente criterio (Arias *et al.*, 1987):

- a) Contar el número de focos infecciosos en los pozos control negativo.
- b) Calcular el promedio de focos y obtener el número de focos infecciosos correspondientes al 60% (corte).
- c) Contar el número de focos infecciosos en los pozos con las diluciones del suero, hasta llegar a la dilución donde el número de focos sea igual al 60% de focos.
- d) El título de anticuerpos neutralizantes se reporta utilizando el recíproco de la dilución donde existió el 60% de neutralización de focos infecciosos.

5.5 Extracción de ARN viral.

La obtención del ARN de rotavirus utilizando TRI REAGENT (trizol), se realizó para detectar el virus en lisados celulares infectados y en heces fecales de niños con gastroenteritis. Para la extracción de ARN de heces, se preparó una suspensión al 20% en PBS utilizando tubos de microcentrífuga de 1.5 ml y posteriormente, se centrifugó a 12,000 rpm por 5 minutos.

Una alícuota de 300 μ l de lisado celular y/o sobrenadante de heces al 20%, se depositó en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y se adicionó 500 μ l de trizol, para romper las capas de proteínas del virus y liberar el ARN. Se agitó 10 veces en un vortex, durante un instante con intervalos entre cada agitación y después los tubos se incubaron en hielo 5 min. Posteriormente, se adicionó 100 μ l de cloroformo, y se agitó en vortex 10 veces un instante con intervalos entre cada agitación. Los tubos se incubaron en hielo 3 min y después se centrifugaron a 12,000 rpm por 15 min/4°C. La fase acuosa se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml limpio

previamente etiquetado, y luego se adicionó 400 μ l de alcohol isopropílico. Se mezcló 5 veces por inversión y los tubos se mantuvieron a -20°C toda la noche. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 12,000 rpm por 15 min/ 4°C , se retiró el alcohol isopropílico con una micropipeta de 200 μ l dejando aproximadamente los últimos 50 μ l en el tubo. Se adicionó 1 ml de alcohol etílico absoluto (frío), se mezcló por inversión 5 veces y se centrifugó a 12,000 rpm por 7 min/ 4°C . Se retiró el alcohol etílico y para eliminar sales, se adicionó 1 ml de alcohol etílico al 75% (frío), se mezcló por inversión 5 veces y se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min/ 4°C . Se retiró el alcohol etílico y para evaporar los restos de alcohol, los tubos se dejaron abiertos en una campana de flujo laminar por 20 minutos. Posteriormente el ARN viral fue resuspendido con 20 μ l de agua nanopura (libre de sales) estéril y se almacenó a -20°C hasta su uso.

5.5.1 Electroforesis de ARN.

La electroforesis del ARN purificado se realizó en gel de poliacrilamida 10%, según previos reportes (Dolan *et al.*, 1985; Rodger *et al.*, 1981). Las condiciones de electroforesis fueron a 100 Volts constantes por 4 horas y posteriormente, el gel fue sometido a una tinción con nitrato de plata para visualizar el patrón electroforético de ARN característico de rotavirus. Terminada la electroforesis, el gel de poliacrilamida fue depositado en 100 ml de una solución fijadora por 30 minutos; después se retiró esta solución y se añadió 100 ml de nitrato de plata 1X, manteniendo el gel en condiciones de obscuridad por 30 minutos. Se retiró el nitrato de plata y se realizaron 3 lavados con agua bidestilada. Posteriormente se adicionó 100 ml de una solución reveladora permaneciendo el gel en esta solución durante 10 minutos, hasta que fueron visibles las bandas del ARN viral. Se retiró la solución reveladora y se adicionó 50 ml de una solución de ácido

acético 5% por 3 minutos. Para detener la reacción del ácido acético, el gel se lavó 3 veces con agua bidestilada.

5.5.2 Obtención del cADN del gen 4 de rotavirus mediante RT-PCR.

El ARN viral de la cepa de rotavirus Wa y las muestras de rotavirus aisladas de niños con gastroenteritis, se sometieron a una transcripción inversa con la enzima transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV Reverse Transcriptase®, BIOLINE), para obtener el cADN de la región del gen 4 de rotavirus que comprende de 1-762 nucleótidos, utilizándose el oligonucleótido reverso PC2 (5'-CACGTCTGACTTCATTAACCTTGTGCTCT-3'). El protocolo de la reacción fue ajustado a un volumen final de 10 μ l. En tubos de microcentrífuga de 0.2 ml se mezcló 2.5 μ l de ARN purificado, 1.0 μ l de primer PC2 1 μ M y 0.6 μ l de agua nanopura estéril. Esta mezcla se colocó en un termociclador (TERMOHYBAID *PCRsprint*) a 94°C por 5 minutos, y después se incubó en hielo. Posteriormente se adicionó una segunda mezcla de reactivos conteniendo 2.0 μ l de Buffer RT 5X (Bioline), 0.5 μ l de MgCl₂ 50 mM, 3.2 μ l de una mezcla de dNTP's (ATP, GTP, CTP, TTP) a una concentración de 2.5 mM cada uno y 0.2 μ l de enzima RT 200 U/ μ l (Bioline). Los tubos se volvieron a colocar en el termociclador para continuar con la reacción la cual se realizó a 42°C por 30 minutos, seguido de 5 minutos a 94°C, para eliminar los residuos de la retrotranscriptasa. Al término de la reacción, los productos de RT-PCR fueron almacenados a -20°C hasta su uso.

5.5.3 Amplificación de la subunidad VP8*.

El cADN obtenido por RT-PCR de rotavirus Wa y niños con gastroenteritis, se sometió a una reacción de PCR utilizando la enzima DNA polimerasa BIOLASE Red™ (BIOLINE). Los

oligonucleótidos utilizados fueron: PA1 5'-CACGGATCCGGCTATAAAAATGGCTTCACTC-3' (en sentido) y PC2 5'-CACGTCGACTTCATTAACCTTGTGCTCT-3' (reverso), los cuales fueron modificados a la cepa Wa de los reportados previamente por Larralde y colaboradores con la cepa de rotavirus humana KU (Larralde and Gorziglia, 1992). La mezcla de reactivos para una reacción se realizó en tubos de microcentrífuga de 0.2 ml conteniendo 1.0 μ l de cADN, 1.25 μ l de Buffer NH₄ 10X (Bioline), 0.37 μ l de MgCl₂ 50mM, 0.25 μ l de cada oligonucleótido (PA1 y PC2) a una concentración de 25 μ M cada uno, 2.0 μ l de una mezcla de dNTP's a una concentración de 2.5mM cada uno, 0.5 μ l de enzima DNA polimerasa 500 U/ μ l (Bioline) y 6.88 μ l de agua nanopura estéril para completar un volumen final de 12.5 μ l.

Posteriormente la mezcla de reactivos se colocó en un termociclador (TERMOHYBAID *PCR Sprint*) para realizar la amplificación con un programa de 30 ciclos: 95°C/30 seg, 42°C/30 seg, 72°C/40 seg. Al final se añadió un tiempo de extensión de 15 minutos, para permitir que se adicionara al extremo 3'-OH de las cadenas de ADN, nucleótidos de Adenina que permitieron la clonación del producto de PCR en el plásmido pGEM-T (Promega). Para analizar la amplificación del producto de PCR, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, a 100 Volts constantes por 50 minutos. El gel de agarosa fue teñido con bromuro de etidio durante 15 minutos y revelado con luz ultravioleta.

5.6 Clonación de la subunidad VP8*.

La clonación del producto de PCR (762 pb) del gen 4 de rotavirus que codifica para la subunidad VP8* completa obtenido de la cepa Wa y niños con gastroenteritis, fue realizada en el plásmido pGEM-T, utilizando el Kit de Clonación pGEM^R-T Vector System (Promega). Para iniciar la clonación, primero se realizó una purificación del producto de PCR, el cual fue sometido a una

electroforesis en gel de agarosa LOW MEALTING 1.5% a 100 Volts constantes por 1 hora. En seguida se tiñó el gel con bromuro de etidio por 15 minutos (en oscuridad) y utilizando una lámpara de luz ultravioleta con intensidad baja, se cortó con una espátula el fragmento de gel con la banda de ADN de interés. Los fragmentos de gel fueron depositados en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y posteriormente fueron purificados utilizando el Kit Wizard^R SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) (ver protocolo en Anexo 1).

5.6.1 Ligación del producto de PCR y plásmido pGEM-T.

La reacción de ligación del plásmido pGEM-T y productos de PCR purificados, se realizó en tubos de microcentrífuga de 0.2 ml mezclando para una reacción: 5.0 μ l de Buffer T4 DNA Ligasa 2X (Promega), 0.5 μ l de plásmido pGEM^R-T (50 ng/ μ l), 3.0 μ l de producto de PCR purificado, 1.0 μ l de enzima T4 DNA ligasa 3 U/ μ l (Promega) y 0.5 μ l de agua nanopura estéril para completar un volumen final de 10.0 μ l. Los tubos de microcentrífuga se incubaron a 4^oC toda la noche.

5.6.2 Transformación de *E.coli* DH5 α competentes.

En un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml estéril se mezclaron 100 μ l de bacterias y 10 μ l de la reacción de ligación (producto de PCR y plásmido pGEM-T). Se agitó suavemente el tubo y se incubó en hielo por 30 minutos. Después el tubo se introdujo en un baño de agua previamente calentado a 42^oC por 90 segundos, e inmediatamente el tubo se volvió a incubar en hielo por 2 minutos. Posteriormente se adicionó 450 μ l de medio de cultivo SOC (previamente atemperado a 37^oC), se mezcló suavemente y todo el volumen se transfirió a un tubo de ensaye con rosca de 13x100 estéril. Las bacterias se incubaron a 37^oC con agitación de 200 rpm por 1 hora. Posteriormente, el cultivo de bacterias se regresó al tubo de microcentrífuga donde se realizó el

shock térmico y se centrifugó un instante a 10,000 rpm. Se retiró el medio de cultivo, y el pellet de bacterias se resuspendió en 50 μ l de medio de cultivo SOC (37°C). Finalmente, los 50 μ l de bacterias transformadas, se inocularon en una caja de agar LB adicionado con Ampicilina (50 μ g/ml) con un asa triangular. Las cajas se incubaron a 37°C por 12 horas.

5.6.3 Purificación de plásmidos de bacterias transformadas.

Tres colonias de bacterias (clonas) se picaron con un palillo de madera estéril y cada una se inoculó en tubos de ensaye de 13X100 con 3 ml de Caldo LB/Ampicilina (50 μ g/ml). Los tubos de ensaye se incubaron a 37°C con agitación de 200 rpm toda la noche. Posteriormente en condiciones estériles se tomó 2 ml de cultivo de bacterias y se depositaron en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml. Los tubos se centrifugaron a 8,000 rpm por 5 minutos y se retiró el medio de cultivo. La purificación de plásmidos se realizó a partir del pellet de bacterias utilizando el Kit Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) (ver protocolo en Anexo 1).

5.6.4 Análisis de plásmidos purificados.

Para asegurar la presencia del inserto (762 pb) en los plásmidos purificados, se realizó un análisis mediante PCR y/o una reacción de restricción con las enzimas *Bam*H I y *Sal* I.

En el análisis por PCR se utilizó los oligonucleótidos que se usaron para amplificar cada producto de PCR originalmente. La mezcla de reactivos para una reacción, se realizó en tubos de microcentrífuga de 0.2 ml conteniendo 1.0 μ l de plásmido purificado, 4.0 μ l de Buffer Green GoTaq[®] Flexi 5X, 1.2 μ l de MgCl₂ 25 mM, 3.2 μ l de una mezcla de dNTP's a una concentración de 2.5 mM cada uno, 0.4 μ l de los oligonucleótidos a una concentración de 25 μ M cada uno, 0.2 μ l de GoTaq[®] DNA polimerasa Hot-Start 5 U/ μ l y 9.6 μ l de agua nanopura estéril para completar

un volumen final de 20.0 μ l. La mezcla de reactivos se colocó en un termociclador (TERMOHYBAID *PCR Sprint*), utilizándose el mismo programa de amplificación de los productos de PCR (ver sección 5.5.3.). En seguida se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, a 100 Volts constantes por 50 minutos. El gel fue teñido con bromuro de etidio por 15 min y revelado con lámpara de luz ultravioleta.

Por otra parte para realizar el análisis de restricción, los plásmidos fueron mezclados con las enzimas de restricción *BamH I* y *Sal I* simultáneamente. La mezcla de reactivos para una reacción se realizó en tubos de microcentrifuga de 0.6 ml utilizando 0.5 μ l del buffer REACT 3 10X de la enzima *BamH I* (Invitrogen), 7.0 μ l de plásmido purificado, 0.5 μ l de enzima *BamH I* 10 U/ μ l (Invitrogen), 0.5 μ l de enzima *Sal I* 10 U/ μ l (Promega) y 1.5 μ l de agua nanopura estéril para completar un volumen final de 10.0 μ l. La mezcla de reactivos se incubó a 37°C por 1.5 horas y posteriormente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1.5%, a 100 Volts constantes por 50 minutos. El gel fue teñido con bromuro de etidio por 15 minutos y revelado con luz ultravioleta.

5.7 Secuenciación de la subunidad VP8*.

La secuencia de nucleótidos del gen 4 (1-762 nt) obtenida de rotavirus Wa y niños con gastroenteritis, se realizó a partir de la construcción del plásmido pGEM-T/PCR-VP8*. Las clonas de bacterias *E. coli* DH5 α con el plásmido pGEM-T/PCR-VP8* fueron inoculadas en tubos de ensayo de 13X100 con 3 ml de caldo LB/Ampicilina (50 μ g/ml) y se incubaron a 37°C con agitación a 200 rpm toda la noche. Posteriormente se purificó los plásmidos a partir de todo el cultivo de bacterias (3 ml), utilizando el Kit Wizard^R Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). Después se realizó una electroforesis de los plásmidos en gel de agarosa 1%, a 100 Volts constantes por 1 hora, para verificar la integridad y cantidad de los plásmidos purificados.

Posteriormente se preparó 1 ml de una dilución 1:200 de cada plásmido en agua nanopura (libre de sales) y se midió la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro de luz ultravioleta. Con la absorbancia obtenida se realizó los cálculos para obtener la concentración de ADN con la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración ADN (ng/}\mu\text{l)} = \text{Abs}_{260} \text{Muestra X Dilución X 50}$$

La concentración final de ADN para enviar a secuenciar fue ajustada a 750 ng/ μ l en agua nanopura estéril. La secuencia de nucleótidos fue realizada en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM, en Cuernavaca, Morelos, mediante el método basado en fluorescencia Taq FS Dye Terminador, utilizando el secuenciador ABIPRISM 310™ Genetic Analyzer.

5.7.1 Análisis de secuencia de ADN.

La secuencia de nucleótidos de la cepa de rotavirus Wa y las cepas de campo, primero fueron analizadas utilizando el software BLAST nucleotide (NCBI) para comprobar que el gen pertenecía a rotavirus. En seguida, se realizó una comparación de la secuencia de nucleótidos y la secuencia deducida de aminoácidos utilizando el programa CLUSTAL W/BioEdit Sequence Alignment Editor v7.0 (Hall, 1999). Los análisis filogenéticos de la secuencia deducida de aminoácidos de la subunidad VP8* de las cepas de rotavirus de campo, se realizó utilizando el programa MEGA v4.1 (Tamura *et al.*, 2007). Todas las secuencias de nucleótidos/aminoácidos obtenidas de niños con gastroenteritis, fueron depositadas en el Nucleotide Sequence Database (GenBank) con el número de acceso FJ665385-FJ665391 y HQ585864-HQ585866.

5.8 Producción de la subunidad VP8* y péptidos A, B, C recombinantes.

La producción de péptidos recombinantes fueron realizados utilizando el plásmido de expresión pET-28a(+) (Novagen) y las bacterias *E.coli* BL21(DE3). La producción de la subunidad VP8* y los péptidos sobrelapados A, B y C sólo fue realizada a partir de la cepa de referencia Wa, mientras que de la cepa de campo CH659-08, se produjo la subunidad VP8* y los péptidos A y B.

5.8.1 Amplificación de los fragmentos A, B y C de la subunidad VP8*.

Mediante una PCR anidada utilizando como molde el producto de PCR (762 pb) que codifica para la subunidad VP8* de la proteína VP4, se amplificaron 3 fragmentos de aproximadamente 300 pb cada uno. Para la amplificación de los fragmentos se utilizaron 3 pares de oligonucleótidos reportados por Larralde y colaboradores, modificados a la secuencia de nucleótidos de la cepa Wa de rotavirus (Tabla IV y Figura 1) (Larralde and Gorziglia, 1992).

Tabla IV: Secuencia de oligonucleótidos utilizados para producir fragmentos sobrelapados del gen 4 que codifica para la subunidad VP8* de rotavirus

Primer	Secuencia (5'-3')	Sentido	Localización (nucleótidos)
PA1	CACGGATCCGGCTATAAAATGGCTTCACTC	Forward	1-21
PA2	TACGTCGACCCAAAAGTCACTATTATT	Reverse	298-315
PB1	CACGGATCCACCATRCTTATTAATTCAAATAC	Forward	253-272
PB2	CACGTCGACTGTTTCACCATGAAATGTCC	Reverse	530-549
PC1	CACGGATCCACCAATGAATTTTATAATAGACG	Forward	454-473
PC2	CACGTCGACTTCATTAACCTTGCTCT	Reverse	745-762

GGATCC: Sitio de restricción para enzima *Bam*H I

GTCGAC: Sitio de restricción para enzima *Sal* I

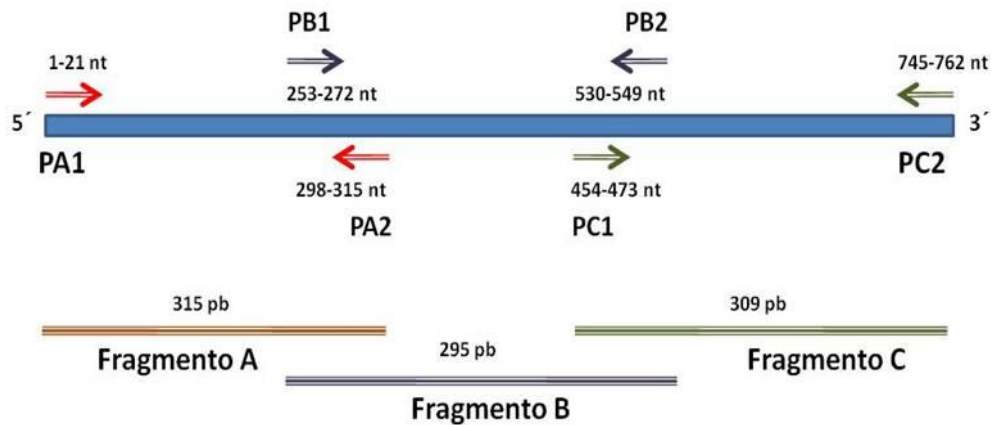


Figura 1: Representación gráfica de los sitios de unión de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de la subunidad VP8* y fragmentos sobrelapados de cepas de rotavirus.

La amplificación de los fragmentos/VP8* se realizó utilizando la enzima DNA polimerasa Hot-Start (Promega) y la mezcla de reactivos para una reacción se realizó en tubos de microcentrífuga de 0.2 ml conteniendo 0.32 μ l producto PCR (762 pb), 4.0 μ l de Buffer Green GoTaq^R Flexi 5X, 1.2 μ l de MgCl₂ 25 mM, 3.2 μ l de una mezcla de dNTP's a una concentración de 2.5 mM cada uno, 0.8 μ l de los oligonucleótidos (ver Tabla II) a una concentración de 25 μ M cada uno, 0.2 μ l de GoTaq^R DNA polimerasa Hot-Start 5 U/ μ l y 9.48 μ l de agua nanopura estéril para completar un volumen final de 20.0 μ l. La mezcla de reactivos se colocó en un termociclador (TERMOHYBAID *PCR Sprint*) para realizar la reacción de amplificación con un programa de 30 ciclos: 95°C/30 seg, 42°C/30 seg, 72°C/40 seg y un tiempo final de extensión de 15 minutos. Los productos de PCR fueron analizados mediante una electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, a 100 Volts constantes por 50 minutos. Para visualizar la amplificación de los fragmentos, el gel fue teñido con bromuro de etidio por 15 minutos y revelado con luz ultravioleta.

5.8.2 Expresión de la subunidad VP8* y péptidos A, B, C.

La expresión de la subunidad VP8* completa de 251 aminoácidos y 3 péptidos superpuestos denominados A (aa1-102), B (aa84-180) y C (aa150-251) se realizó a partir de las construcciones de cada producto de PCR en el plásmido pGEM-T (Figura 2).

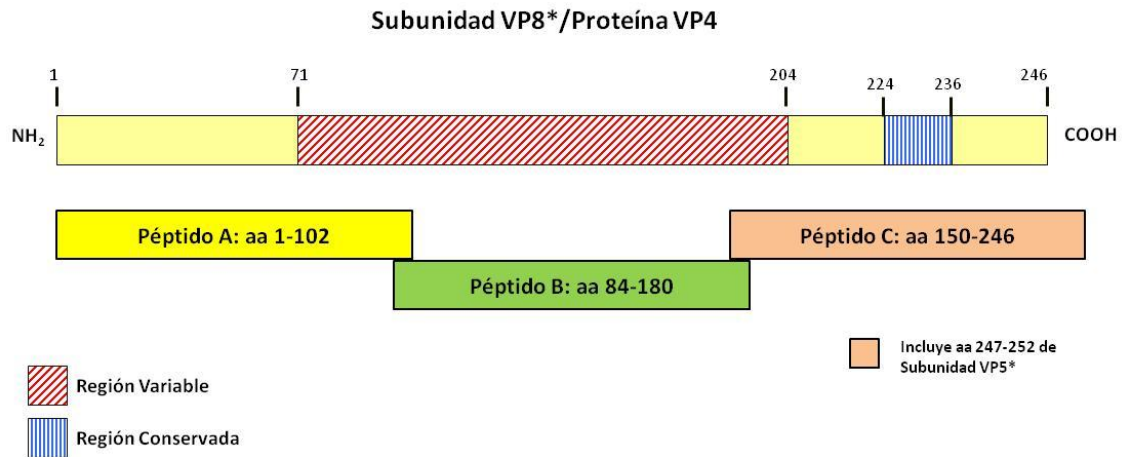


Figura 2: Esquema de la subunidad VP8* de la proteína VP4 de rotavirus, indicando la posición de aminoácidos de los péptidos superpuestos.

5.8.3 Preparación del inserto y plásmido de expresión.

Los plásmidos pGEM-T con los productos de PCR del gen 4 de rotavirus Wa y la cepa de campo CH659-08, así como en el plásmido pET-28a(+), fueron digeridos utilizando las enzimas de restricción *BamH* I y *Sal* I, para formar extremos cohesivos, que permitieran la clonación mediante una reacción de ligación. Para realizar la digestión con enzimas de restricción, los plásmidos fueron purificados de 3 ml de cultivo de bacterias *E.coli* DH5 α utilizando el Kit Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). De cada plásmido pGEM-T con inserto, se realizó 4 reacciones de restricción y del plásmido pET-28a(+), se realizó 2 reacciones de restricción. La mezcla de reactivos se realizó en tubos de microcentrifuga de 0.6 ml utilizando el mismo protocolo previamente descrito para el análisis de plásmidos purificados (ver sección

5.6.4). La mezcla de reactivos se incubó a 37°C por 1.5 horas y posteriormente se realizó una electroforesis de todo el volumen de la reacción de restricción en gel de agarosa 1.5% LOW MEALTING, a 100 Volts constantes por 1 hora. Se tiñó el gel con bromuro de etidio por 15 minutos y utilizando una lámpara de luz ultravioleta con intensidad baja, se procedió a cortar el fragmento de gel con el inserto liberado del plásmido pGEM-T. Los fragmentos de gel fueron depositados en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml limpio y después fueron purificados con el Kit Wizard^R SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) (ver protocolo en Anexo 1). El plásmido pET-28a(+) digerido, también fue sometido a una electroforesis en gel de agarosa 1.5% LOW MEALTING para realizar una purificación a partir del gel. Los insertos y plásmidos purificados fueron almacenados a 4°C hasta su uso.

5.8.4 Ligación del producto de PCR y plásmido pET-28a(+).

Para preparar una reacción de ligación, se mezcló en tubo de microcentrífuga de 0.2 ml, 1.0 µl de Buffer T4 DNA Ligasa 5X (Invitrogen), 3.0 µl de inserto-PCR, 1.0 µl de plásmido pET-28a(+) sin inserto (50 ng/µl), 1.0 µl de enzima T4 DNA ligasa 10 U/µl (Invitrogen) y 4.0 µl de agua nanopura estéril para completar un volumen final de 10.0 µl. La reacción de ligación se incubó a 4°C toda la noche.

5.8.5 Transformación de *E.coli* DH5α competentes.

Bacterias *E. coli* DH5α calcio competentes se transformaron utilizando el protocolo previamente descrito utilizando los 10 µl de reacción de ligación (sección 5.6.2); sin embargo, las bacterias transformadas se inocularon en una caja de agar LB/Kanamicina (50µg/ml) y se incubaron a

37°C por 12 horas. Posteriormente, se purificó los plásmidos de las clonas de bacterias *E. coli* DH5α transformadas utilizando el Kit Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) y mediante una reacción de restricción y/o PCR, se analizó la presencia del inserto-PCR utilizando la metodología ya descrita (sección 5.6.4).

5.8.6 Análisis para comprobar la orientación del inserto en plásmido pET-28a.

Se realizó un análisis de restricción utilizando las enzimas *Bgl* II y *Sal* I de las construcciones en el plásmido pET-28a(+), para verificar la orientación correcta del inserto (5'-3') en el plásmido de expresión. Según la secuencia de nucleótidos del sitio de clonación múltiple del plásmido pET-28a(+) (Figura 3), el sitio de corte para la enzima *Bgl* II se encuentra en el nucleótido 401 antes del sitio de clonación, y el sitio de restricción para la enzima *Sal* I se localiza en el nucleótido 107, por lo tanto, si el inserto fue clonado en la orientación correcta (5'-3'), al producto de digestión de cada inserto, se le sumará 294 nucleótidos. El ensayo de restricción se realizó mezclando las enzimas de restricción *Bgl* II y *Sal* I simultáneamente, utilizando el buffer de la enzima *Bgl* II (Invitrogen).

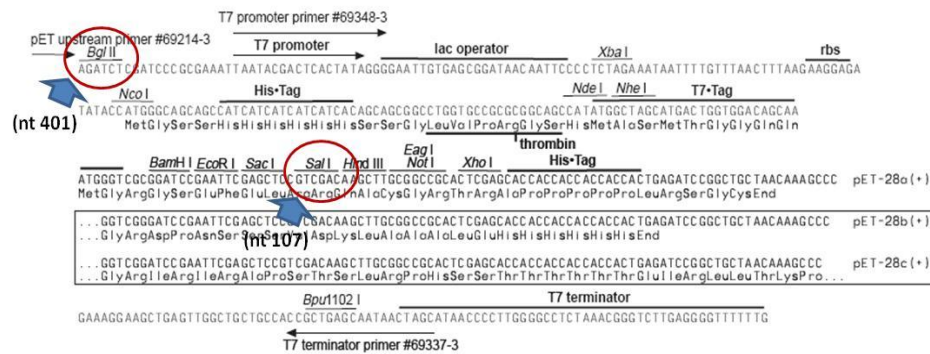


Figura 3: Esquema del sitio de clonación múltiple del plásmido de expresión pET-28a(+), indicando la posición del sitio de restricción para las enzimas *Bgl* II y *Sal* I.

La mezcla de reactivos para una reacción se realizó en tubos de microcentrífuga de 0.6 ml, adicionando 7.0 μ l de plásmido pET-28a(+)/Inserto, 0.5 μ l de Buffer REACT 3 10X (Invitrogen), 0.5 μ l de enzima *Bgl* II 10 U/ μ l (Invitrogen), 0.5 μ l de enzima *Sal* I 10 U/ μ l (Promega) y 1.5 μ l de agua nanopura estéril, para completar un volumen final de 10.0 μ l. La reacción de restricción se incubó a 37°C por 1.5 horas y posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1.5%, a 100 Volts constantes por 50 minutos. El gel fue teñido con bromuro de etidio por 15 minutos y revelado con luz ultravioleta.

5.8.7 Transformación y análisis de *E.coli* BL21(DE3) competentes.

La transformación de las bacterias *E. coli* BL21(DE3), se realizó mezclando en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml estéril, 100 μ l de bacterias y 1 μ l del plásmido pET-28a(+)/Inserto. Después se continuó con el protocolo de transformación descrito para las bacterias *E. coli* DH5 α (sección 5.6.2). Las bacterias transformadas se inocularon en agar LB/Kanamicina (50 μ g/ml) y se incubaron a 37°C por 14 horas. Posteriormente, para analizar en las bacterias BL21(DE3) transformadas la presencia del plásmido pET-28a(+) con el inserto de cada péptido a expresar, se utilizó el mismo protocolo de purificación y análisis de plásmidos utilizados para las bacterias DH5 α (sección 5.6.4.).

5.8.8 Inducción de la expresión de proteínas recombinantes.

Para inducir la expresión de las proteínas recombinantes en las bacterias *E. coli* BL21(DE3), se inoculó en tubos de ensaye 13X100 con 3 ml de caldo LB/Kanamicina (50 μ g/ml), 3 asadas del cultivo de bacterias BL21(DE3) transformadas, y se incubó a 37°C con agitación de 200 rpm toda

la noche. Posteriormente, se inoculó 120 ml de caldo LB (sin antibióticos) con 1.2 ml del cultivo de bacterias de toda la noche, realizando una dilución 1:100. Las bacterias se mantuvieron en agitación a 250 rpm/37°C por 2 horas. Al terminar este tiempo se empezó a monitorear la densidad óptica del cultivo, tomando una alícuota de 1 ml para medir la absorbancia a 590 nm. El matraz continuó en agitación constante, hasta que la densidad óptica alcanzó entre 0.4-0.6 de absorbancia. Cuando el cultivo presentó la densidad requerida, se suspendió la incubación un instante para tomar una alícuota de 10 ml de cultivo utilizándose como control de bacterias no inducidas, almacenándose a 4°C; al resto de cultivo, se le adicionó IPTG a una concentración final de 1 mM para inducir la expresión de los péptidos recombinantes. Después se continuó con la incubación a 37°C con agitación de 250 rpm por 5 horas. Las bacterias inducidas y las no inducidas, se transfirieron a tubos de falcon de 50 ml, para centrifugarse a 5,000 rpm/4°C por 10 minutos. El caldo LB fue decantado y el pellet de bacterias se pesó para resuspender las bacterias en el buffer B1. Por cada gramo de pellet de bacterias, se adicionó 10 ml de buffer. Las bacterias resuspendidas se almacenaron a -20°C hasta su uso.

5.8.9 Lisis Bacteriana.

Los péptidos recombinantes en las bacterias BL21(DE3) son producidas en el citoplasma, por lo tanto, se realizó una lisis de la bacterias en dos etapas, primero se utilizó lisozima de clara de huevo (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 0.2 mg/ml, agitándose durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente el extracto de bacterias se dispensó en alícuotas de 1 ml en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml, para realizar una lisis mecánica utilizando un sonicador durante 15 minutos. Para disolver los posibles cuerpos de inclusión que se forman a consecuencia de la alta producción de proteínas recombinantes y que impiden la solubilización

de los péptidos, se adicionó al extracto de bacterias urea a una concentración final de 8 M. Los extractos de bacterias se mantuvieron a 4°C hasta su uso.

5.8.10 SDS-PAGE.

Se realizó una electroforesis de proteínas en geles discontinuos de poliacrilamida (gel concentrador 4%; gel separador al 11%) del extracto de bacterias lisadas, tanto inducidas como no inducidas para comprobar la producción de las proteínas recombinantes. La electroforesis se realizó a 10 mA constantes por 20 minutos (gel concentrador) y a 20 mA constantes por 40 minutos (gel separador). El gel fue teñido con Azul de Coomassie toda la noche y posteriormente fue desteñido con una solución decolorante (Metanol 10%-Acido Acético 10%).

5.9 Purificación de péptidos recombinantes.

La purificación de las proteínas recombinantes de rotavirus Wa y la cepa de campo CH659-08 fue realizada mediante una cromatografía de afinidad, utilizando las columnas de purificación HisTrap FF Crude (GE Healthcare); ya que las proteínas recombinantes presentan 6 Histidinas en tándem en el extremo amino. La cromatografía de afinidad se realizó bajo condiciones desnaturalizantes por lo tanto, todos los reactivos utilizados contenían urea a una concentración final de 4M. Para realizar la cromatografía, primero se lavó una columna nueva con 20 ml de agua bidestilada para eliminar el etanol 20% (solución de almacenaje); después se adicionó 10 ml de buffer B2 para equilibrar la columna. Posteriormente se pasó todo el volumen de extracto de bacterias lisadas, previamente ajustado a un pH de 7.4. Se recolectó todo el eluente para posteriores purificaciones. En seguida, se realizó un lavado con 20 ml de buffer B3 para eliminar la unión

inespecífica de proteínas bacterianas y después se adicionó 5 ml de buffer de elución, colectándose 5 fracciones cromatográficas de 1 ml cada una en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml. Finalmente se aplicó 10 ml de buffer B2 para lavar y equilibrar la columna. Las fracciones cromatográficas y las columnas de afinidad, se almacenaron a 4°C hasta su uso.

5.9.1 SDS-PAGE de fracciones cromatográficas.

Se realizó una electroforesis de proteínas en geles discontinuos de poliacrilamida (gel concentrador 4%; gel separador al 11% ó 12%) en condiciones desnaturizantes de las fracciones cromatográficas para analizar la purificación de los péptidos recombinantes. La electroforesis se realizó a 10 mA constantes por 20 minutos y a 20 mM constantes por 40 minutos. El gel fue teñido con Azul de Coomassie toda la noche.

5.9.2 Western-blot.

Para identificar que los péptidos recombinantes mantienen sus características antigénicas, se realizó un ensayo de Western-blot utilizando un anticuerpo anti-rotavirus (Anti-TLP's) producido en conejo. Los péptidos recombinantes fueron sometidos a una electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) en geles discontinuos de poliacrilamida (gel concentrador 4%; gel separador al 12%) utilizando las mismas condiciones de electroforesis de la sección 5.9.1. Posteriormente se realizó la transferencia de proteínas a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 micras (Sigma-Aldrich) a 60 Volts constantes por 1.5 horas. Al terminar este tiempo, la membrana de nitrocelulosa fue lavada rápidamente con agua nanopura y se dejó toda la noche en una solución bloqueadora de Leche descremada 5%-PBS a temperatura ambiente. Después la

membrana se lavó 2 veces con PBS-Leche descremada 0.1% por espacio de 10 minutos cada lavado. En seguida se adicionó el anticuerpo anti-rotavirus diluido 1:3,000 y se incubó a 37°C por 1.5 hrs con agitación constante. Se retiró el anticuerpo, y se lavó 3 veces con PBS-Leche descremada 0.1%. Se adicionó Proteína A unida a Peroxidasa de rábano (Amersham) diluida 1:2,000 y se incubó a 37°C por 1.5 hrs con agitación constante. La membrana se lavó 3 veces y después se adicionó 1 ml de sustrato TMB (Sigma-Aldrich) mezclando suavemente hasta ver la aparición de las bandas positivas de color azul. La reacción se detuvo lavando la membrana con agua bidestilada.

5.10 Cuantificación de proteínas recombinantes.

5.10.1 Desalación.

Para realizar la cuantificación de la subunidad VP8* recombinante de rotavirus Wa y la cepa de campo CH659-08, primero se realizó una desalación de la proteína para eliminar la urea mediante una cromatografía de exclusión. La cromatografía se realizó en columnas HiTrap Desalting (GE Healthcare) adicionando a una columna nueva 25 ml de PBS A 1X para eliminar el Etanol 20% (solución de almacenaje) y equilibrar la columna. Después se pasó 1.5 ml de proteína recombinante purificada, previamente filtrada con filtros de membrana de 0.45 micras. Posteriormente se adicionó 2 ml de PBS A 1X para eluir la proteína recombinante desalada y después se pasó 25 ml de PBS A 1X para lavar y equilibrar nuevamente la columna. Las proteínas recombinantes desaladas se mantuvieron a 4°C hasta su uso.

5.10.2 Método de Bradford.

La cuantificación de proteínas recombinantes desaladas se realizó utilizando el reactivo de Bradford (Sigma-Aldrich), realizándose primero una curva de calibración con soluciones estándar de albúmina de huevo a una concentración conocida. La preparación de las soluciones estándar se realizó a partir de una solución stock de albúmina de 4 mg/ml diluida en PBA A 1X (sin Ca y Mg) de la siguiente manera:

Concentración de proteínas ($\mu\text{g/ml}$)	Albúmina (4 mg/ml)	Cantidad de PBS A 1X	Volumen final
0	0 μl	500 μl	500 μl
10	1.25 μl	499 μl	500 μl
20	2.5 μl	498 μl	500 μl
50	6.25 μl	494 μl	500 μl
100	12.5 μl	488 μl	500 μl
200	25 μl	475 μl	500 μl
500	62.5 μl	438 μl	500 μl
1000	125 μl	375 μl	500 μl
2000	250 μl	250 μl	500 μl

En seguida se procedió a mezclar 1 ml de reactivo de Bradford con 33 μl de cada solución estándar de proteínas; se agitó un instante en vortex y se dejó incubar por 10 minutos a temperatura ambiente. En un tiempo no mayor de 15 minutos, se leyó la absorbancia de todas las soluciones estándar a 595 nm. La curva de calibración se realizó por duplicado, y con el promedio de cada estándar se graficó los resultados. La muestra problema se diluyó 1:10 y 1:100 en PBS A 1X y al igual que los estándares de proteína, se mezcló 1 ml de reactivo de Bradford con 33 μl de cada dilución. La concentración final de la proteína recombinante fue obtenida con la fórmula de la curva de calibración realizada.

$$Y = mx + b$$

Donde:

Y = Absorbancia de la proteína problema

m = Pendiente de la ecuación lineal

x = Concentración de la proteína problema

5.11 ELISA.

Placas de 96 pozos (Costar) fueron sensibilizadas con 75 μ l de péptidos recombinantes a una concentración de 10 μ g/ml diluidos en buffer carbonato-bicarbonato pH 9.6 e incubadas a 4°C toda la noche. Posteriormente se retiró la(s) proteína(s), se realizó un lavado con 200 μ l de PBS y se adicionó 200 μ l de una solución de Leche descremada 5% en PBS-Tween 0.1%. Las placas se incubaron a 4°C toda la noche. La solución bloqueadora se retiró y se lavó 4 veces con 250 μ l de PBS-Tween 0.1%-Leche descremada 0.1%. Se realizaron diluciones del suero de los niños con gastroenteritis utilizando como diluyente el buffer de lavado: 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1,600 y 1:3,200 y se adicionó a la placa 75 μ l de cada dilución por duplicado. Además también se adicionó 75 μ l de suero fetal de bovino diluido 1:200 como control negativo. Se incubó a 37°C por 1 hora. Posteriormente se retiró los sueros y se lavó 4 veces. Se adicionó 75 μ l de Proteína A-Peroxidasa de rábano (Amersham) diluida 1: 2,500 y se incubó a 37°C por 1 hora. Se retiró la Proteína A-HRP, se lavó 4 veces y se adicionó 100 μ l de sustrato ABTS (Zymed) preparado en buffer citratos 0.1M pH 4.1. Se incubó a 37°C por 30 minutos. La reacción colorimétrica fue

medida en un lector de ELISA (Digital and Analog Systems S.R.L. modelo A2) a una absorbancia de 405 nm. El criterio para determinar el título de anticuerpos IgG contra las proteínas recombinantes fue la dilución del suero, en donde la absorbancia fue 2 veces mayor al promedio de la absorbancia del control negativo.

5.12 Western-blot utilizando sueros de niños con gastroenteritis.

Las proteínas recombinantes VP8*, péptidos A y B de la cepa Wa y la cepa de campo CH659-08 fueron sometidas a una electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y transferidas a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 micras (Sigma-Aldrich) a 60 Volts constantes por 1.5 horas. Después de la transferencia, la membrana fue lavada rápidamente con TBS pH 7.5 y se bloqueó con una solución de Tween 2% en TBS pH 7.5 durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se retiró la solución bloqueadora y se adicionó el suero de niño con gastroenteritis diluido 1:500 en TBS-Tween 0.05%, incubándose a 4°C toda la noche. Posteriormente para detectar los anticuerpos IgG específicos contra cada proteína recombinante, se utilizó el Kit ProtoBlot[®] II AP System with Stabilized Substrate (Promega). Se retiró el suero y la membrana se lavó 3 veces con TBS-Tween 0.05%. Se adicionó el conjugado anti-IgG humana-Fosfatasa alcalina diluido 1:5,000 y se incubó a 37°C por 30 minutos con agitación constante. El conjugado fue retirado y la membrana se lavó 2 veces con TBS-Tween 0.05% y una vez con TBS sin Tween. Finalmente se adicionó 5 ml de sustrato NBT/BCIP durante 3 minutos, en condiciones semi-oscurecidas para evitar la oxidación del sustrato. La reacción enzimática se detuvo, lavando la membrana varias veces con agua bidestilada.

6. RESULTADOS

En este estudio se analizó la presencia de epitopes secuenciales inmunodominantes en la subunidad VP8* de la proteína VP4 de rotavirus, utilizando péptidos recombinantes y anticuerpos anti-rotavirus, producidos en niños con gastroenteritis. Para alcanzar este objetivo, durante un estudio epidemiológico de rotavirus en la Cd. de Chihuahua, Chihuahua, se colectaron 18 sueros y heces de niños con gastroenteritis durante 2007-2008, menores de 2 años. En 17 casos el genotipo de la cepa de rotavirus infectante fue G1,P[8] (Tabla V).

Tabla V: Datos generales de niños con gastroenteritis por rotavirus

No. Suero	Clave	Sexo	Genotipo Rotavirus
1	CH528-07	M	ND
2	CH531-07	M	G1,P[8]
3	CH532-07	M	G1,P[8]
4	CH554-07	F	G1,P[8]
5	CH555-07	F	G1,P[8]
6	CH557-07	M	G1,P[8]
7	CH659-08	M	G1,P[8]
8	CH674-08	M	G1,P[8]
9	CH678-08	M	G1,P[8]
10	CH679-08	M	G1,P[8]
11	CH680-08	F	G1,P[8]
12	CH685-08	M	G1,P[8]
13	CH686-08	F	G1,P[8]
14	CH687-08	M	G1,P[8]
15	CH712-08	F	G1,P[8]
16	CH716-08	M	G1,P[8]
17	CH737-08	F	G1,P[8]
18	CH740-08	F	G1,P[8]

Edad en meses; (*) no especificado; ND: No determinado

6.1 Producción de la cepa de rotavirus humana Wa en cultivo celular.

La cepa de referencia Wa (genotipo G1P[8]) fue propagada en cultivo de células MA-104 en primer instancia, para analizar si los sueros obtenidos de niños con gastroenteritis presentaban anticuerpos neutralizantes contra cepas de rotavirus con genotipo P[8]. Asimismo, también fue utilizada para la producción de proteínas recombinantes de la subunidad VP8* de la proteína VP4. Como se indica en la figura 4, el efecto citopático de rotavirus en células MA-104 en forma de lisis celular, fue observado a las 24 hrs post infección (p.i.).

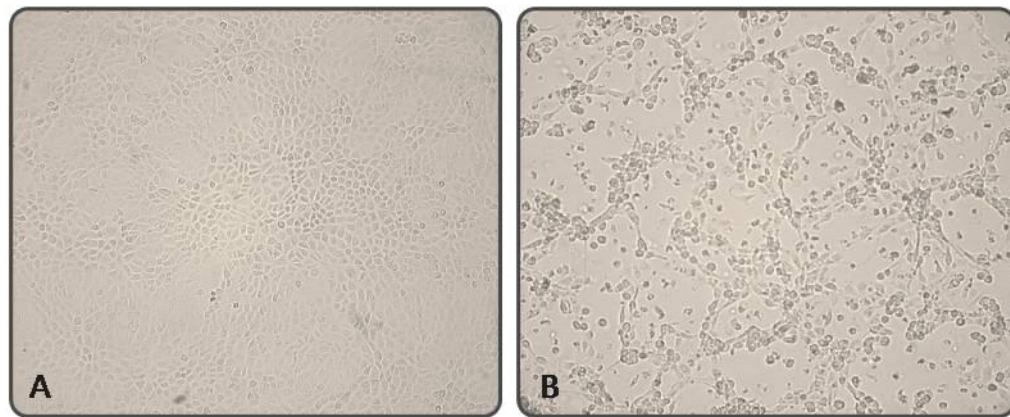


Figura 4: Efecto citopático de rotavirus Wa en células MA-104.
A) Células no infectadas; B) Células con rotavirus Wa 24 hrs p.i.

Posteriormente para confirmar la presencia de rotavirus en el lisado celular, se realizó una extracción de ARN viral y el genoma fue sometido a una electroforesis en gel de poliacrilamida 10% y teñido con nitrato de plata, en donde se observó el patrón electroforético de los 11 segmentos de ARN característico de los rotavirus pertenecientes al grupo A (4,2,3,2) (Figura 5).

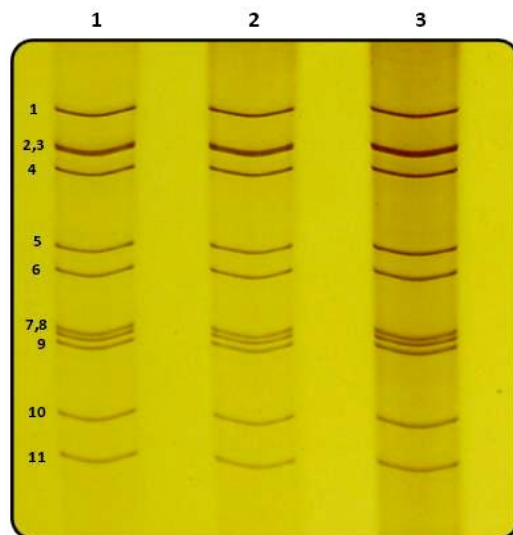


Figura 5: Electroforesis de ARN de rotavirus obtenido de lisados de células MA-104.
Carril 1-3: Rotavirus Wa

6.2 Producción de péptidos recombinantes de la proteína VP4 de la cepa de rotavirus Wa.

6.2.1 Amplificación y clonación de la subunidad VP8*.

Mediante una reacción de RT-PCR fue amplificada la región 1-762 nt del gen 4 que codifica para la subunidad VP8* de la proteína VP4, a partir del ARN obtenido del lisado de células MA-104 infectadas con rotavirus Wa (Figura 6).

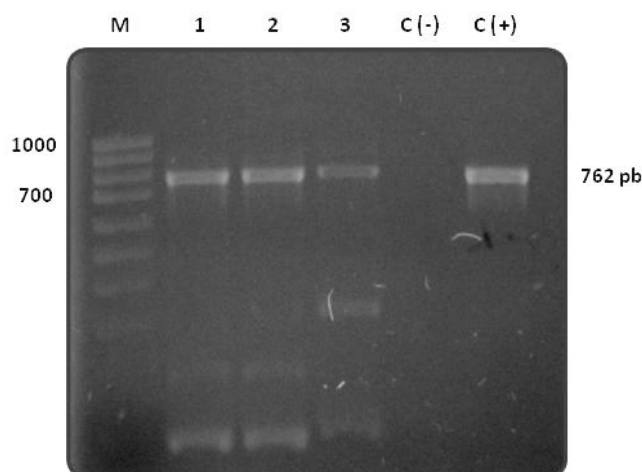


Figura 6: Electroforesis de productos de PCR-VP8* en gel de agarosa 1.5%.
M: Marcador de pares de bases (pb) HyperLadder IV (Bioline); Carril 1-2: Rotavirus Wa;
Carril 3: Cepa de campo M43; C(+): Control Positivo/plásmido pGEX-4T-2-VP4 Wa

Posteriormente el producto de PCR/VP8*Wa fue clonado en el vector pGEM-T (Promega) y el análisis de las clonas de bacterias *E. coli* DH5 α se realizó mediante una reacción de restricción utilizando las enzimas de *Bam*HI y *Sal*I (Figura 7).

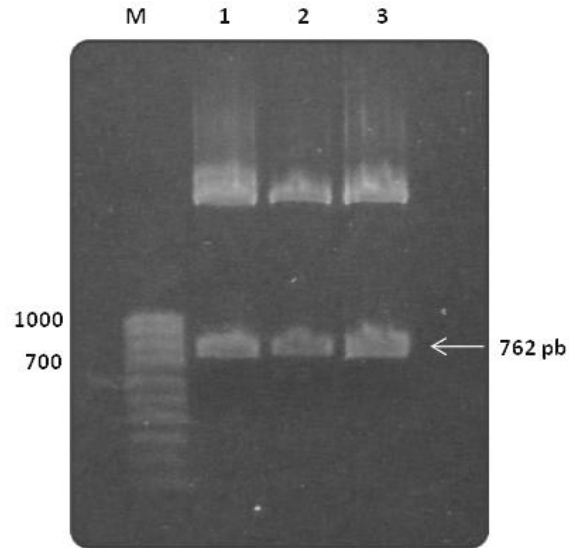


Figura 7: Electroforesis de productos de reacción de restricción de plásmidos pGEM-T/VP8*-Wa.
M: Marcador de pares de bases HyperLadder IV; Carril 1-3: pGEM-T/VP8*-Wa
(*Bam*HI, *Sal*I) de clonas *E. coli* DH5 α positivas.

6.2.2 Análisis de la secuencia de nucleótidos/ aminoácidos de la subunidad VP8*.

La secuencia de nucleótidos del producto de PCR (762 pb) fue obtenida a partir de la construcción pGEM-T/VP8*Wa (Figura 8). Posteriormente se obtuvo la secuencia deducida de aminoácidos, y utilizando el programa BLAST protein (NCBI), se encontró que la cepa Wa propagada en cultivo celular, presentó un 99 y 100% de homología con la proteína VP4 de rotavirus Wa con número de acceso L34161 y M96825 respectivamente, las cuales fueron reportadas por diferentes autores (Figura 9). La cepa Wa (L34161) presenta un cambio de aminoácido en la posición 64 (M/I) con respecto a la cepa Wa (M96825) y la obtenida en cultivo de células (Figura 10).

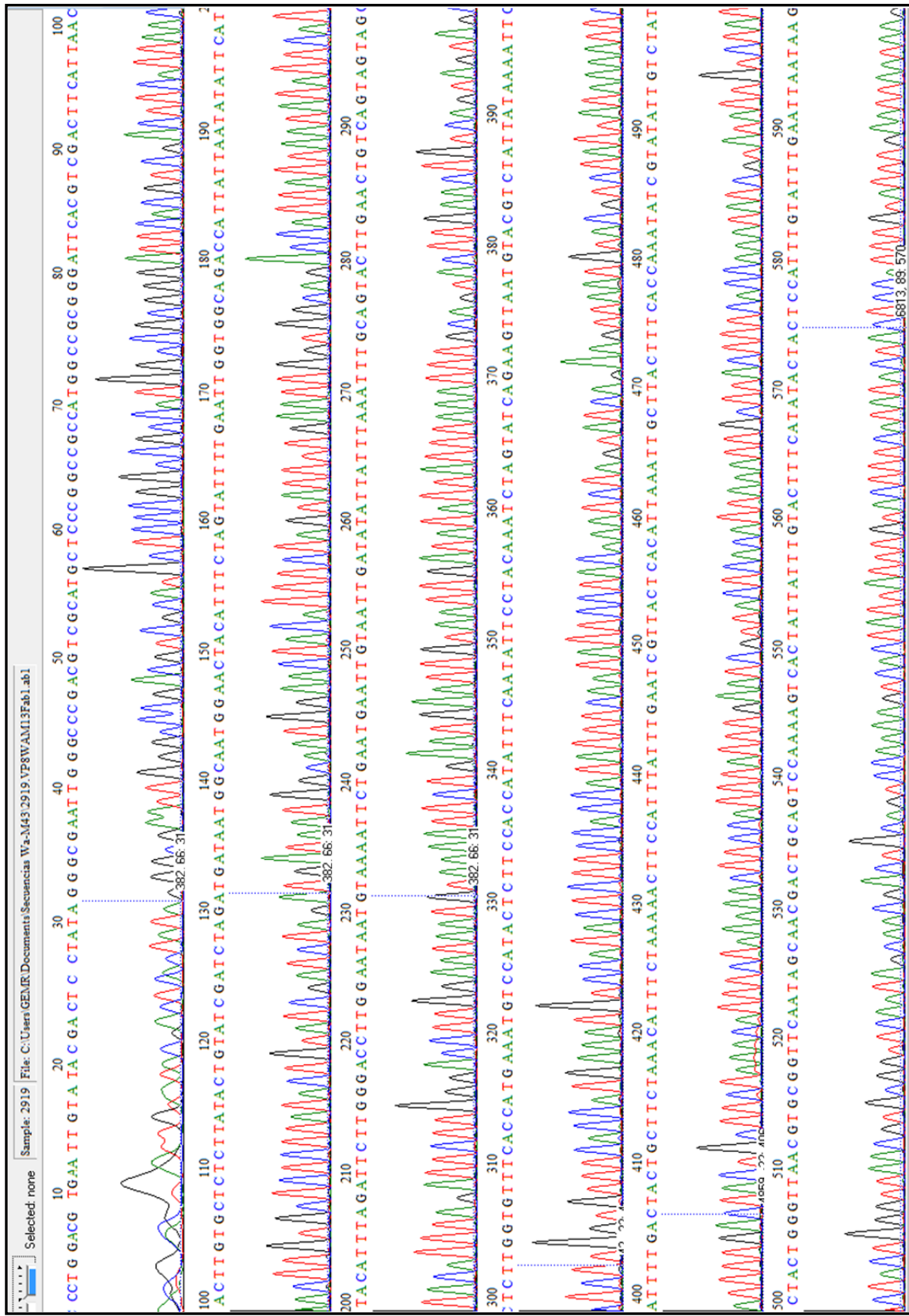


Figura 8: Cromatograma de la secuencia de nucleótidos del plásmido pGEM-TVP8*-Wa obtenido en el secuenciador ABIPRISM 310™ Genetic Analyzer.

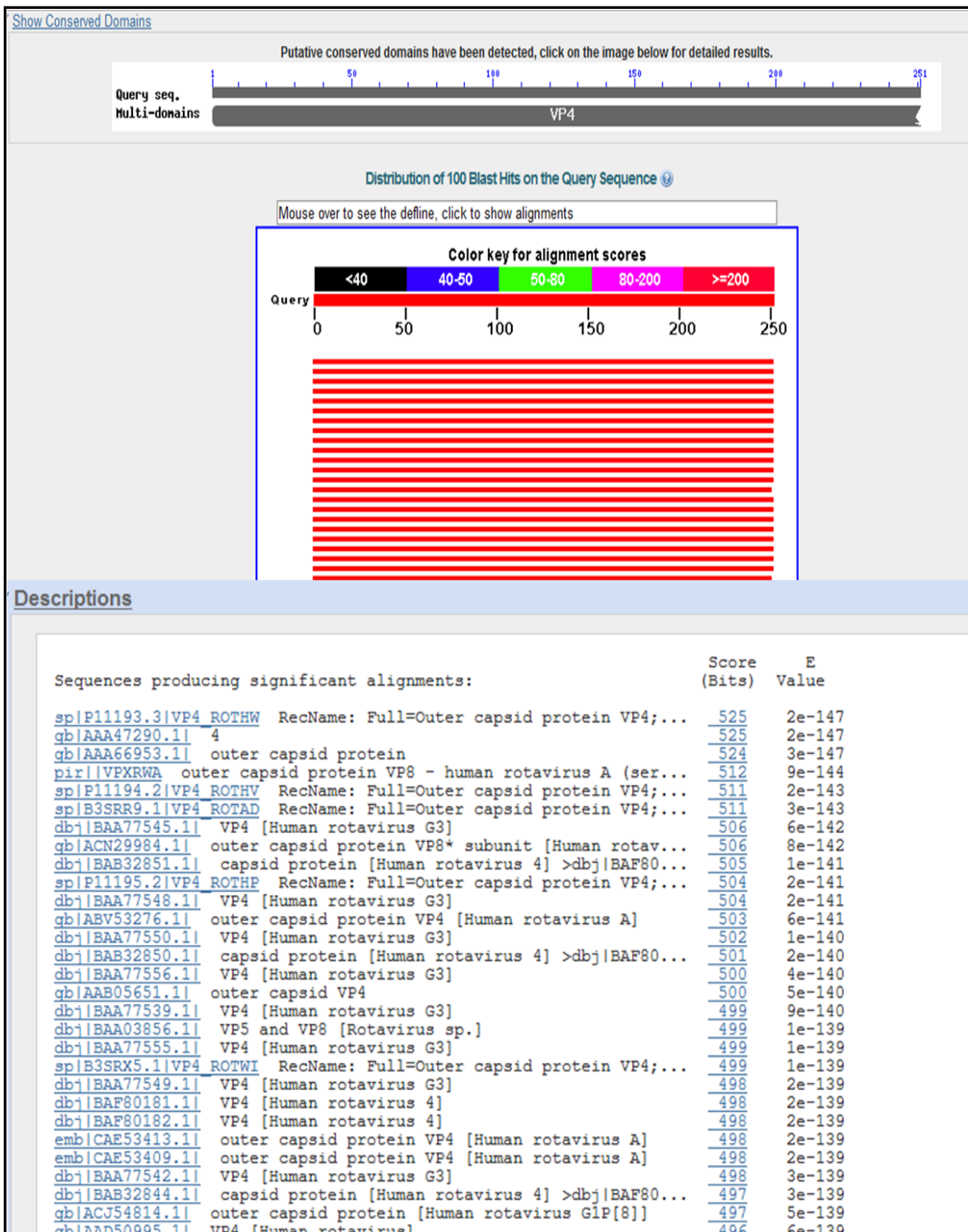


Figura 9: Análisis de identidad de la secuencia de aminoácidos deducida de la subunidad VP8* de rotavirus Wa utilizando el programa BLAST protein (NCBI).

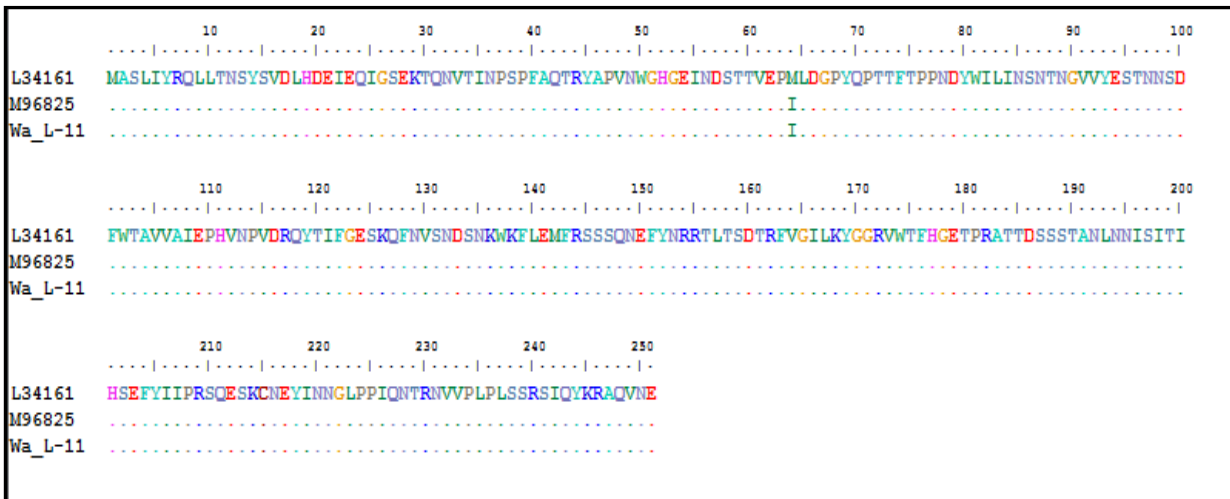


Figura 10: Comparación de la secuencia de aminoácidos de la subunidad VP8* de cepas de rotavirus Wa. L34161 y M96825: Secuencias de aminoácidos de la cepa Wa reportadas en el GenBank (CLUSTAL W/BioEdit Sequence Alignment Editor v7.0).



Figura 11: Comparación de la secuencia de nucleótidos de la región génica que codifica para la subunidad VP8* de cepas de rotavirus Wa. L34161 y M96825: Secuencias de nucleótidos de cepas Wa reportadas en el GenBank; Wa_L-11: Cepa Wa producida en cultivo celular (CLUSTAL W/BioEdit Sequence Alignment Editor v7.0).

Asimismo, el análisis de la comparación de la secuencia de nucleótidos también reveló un cambio de nucleótidos en la posición 201: T/G; entre la cepa Wa (L34161) y las cepas Wa (M96825) y la producida en cultivo de células (Figura 11). Los resultados del análisis de la secuencia de nucleótidos de la cepa Wa, fueron importantes para diseñar los oligonucleótidos que amplificarían fragmentos sobreleapados de la subunidad VP8*.

6.2.3 Expresión y purificación de la subunidad VP8*.

Antes de la expresión de la subunidad VP8* recombinante de rotavirus Wa utilizando el plásmido de expresión pET-28a(+), se realizó un ensayo de restricción de la construcción pET-28a(+)/VP8*-Wa utilizando las enzimas *Bgl* I y *Sal* I para corroborar la orientación del inserto (5'-3') en el plásmido de expresión. La liberación de un fragmento génico de aproximadamente 1,056 pb nos indicó que la orientación del inserto fue correcta (Figura 12).

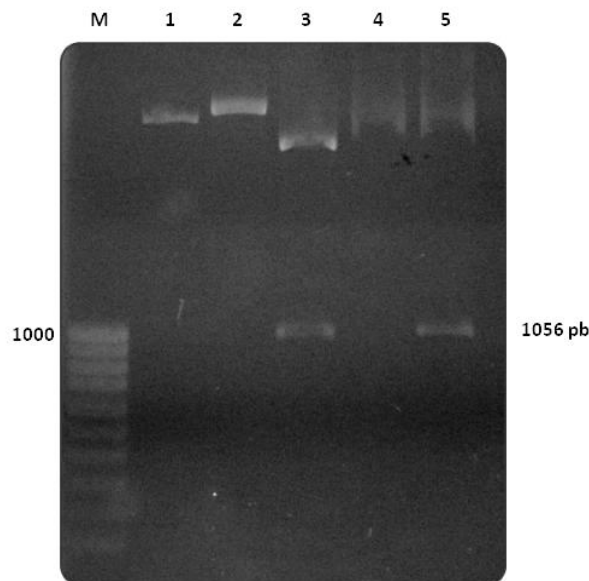


Figura 12: Electroforesis de productos de reacción de restricción.

M: Marcador de pares de bases; Carril 1: pET28a/VP8*Wa sin inserto de *E. coli* DH5 α ; Carril 2: pET28a/VP8*Wa sin digerir obtenido de *E. coli* DH5 α ; Carril 3: pET28a/VP8*Wa (*Bgl* I, *Sal* I) obtenido de *E. coli* DH5 α ; Carril 4: pET28a/VP8*Wa sin digerir obtenido de *E. coli* BL21(DE3); Carril 5: pET28a/VP8*Wa (*Bgl* I, *Sal* I) obtenido de *E. coli* BL21(DE3).

Posteriormente las bacterias *E.coli* BL21(DE3) transformadas fueron inducidas con IPTG y se analizó la producción de la proteína recombinante tomando una alícuota de cultivo de bacterias a las 1, 3 y 5 hrs post-inducción. Mediante una electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), se determinó que a las 5 hrs de post-inducción, es el tiempo en que se produce mayor cantidad de VP8* recombinante, la cual presentó un peso molecular de aproximadamente 35 KDa. Sin embargo, debido a que la cantidad de proteína purificada fue poca, se procedió a tratar el extracto de bacterias lisadas con urea a una concentración final de 8M, para deshacer los cuerpos de inclusión formados por las proteínas recombinantes. Los resultados fueron que en presencia de urea, se obtuvo mayor cantidad de proteína recombinante (Figura 13).

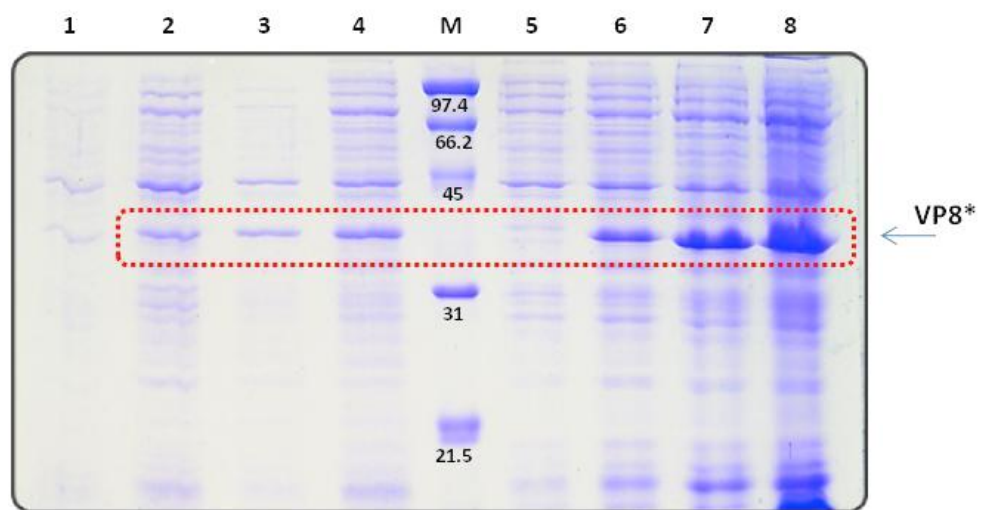


Figura 13: SDS-PAGE de proteínas de *E.coli* BL21(DE3) inducidas en gel de poliacrilamida 11%.
M: Marcador de Peso Molecular; Carril 1: Bacterias BL21 no inducidas; Carril 2-4: Bacterias BL21 inducidas (1, 3 y 5 hrs); Carril 5: Bacterias BL21 no inducidas/Urea 8M; Carril 6-7: Bacterias BL21 inducidas (1, 3 y 5 hrs)/Urea 8M.

Para mantener la solubilidad de la proteína VP8*-Wa recombinante, esta fue purificada mediante una cromatografía de afinidad bajo condiciones desnaturalizantes, utilizando urea a una concentración final de 4M (Figura 14); La identidad de las proteínas recombinantes purificadas fue confirmada mediante Western-blot, donde todas las muestras de proteínas analizadas fueron reconocidas por el anticuerpo anti-rotavirus rhesus (Figura 15).

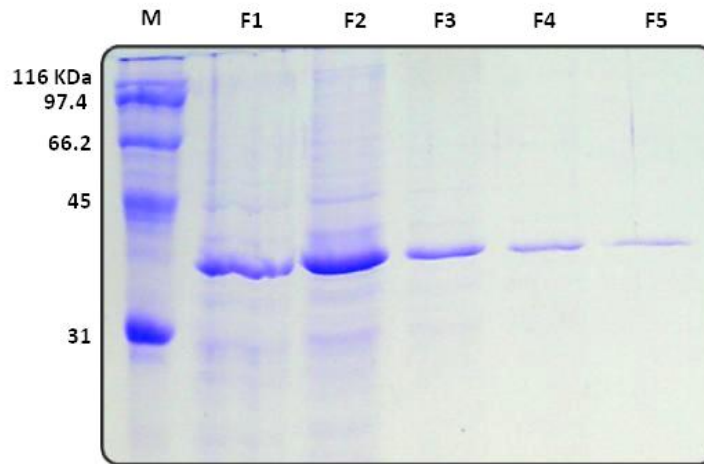


Figura 14: SDS-PAGE de fracciones cromatográficas obtenidas de la purificación de VP8*-Wa recombinante en gel de poliacrilamida 11%.
M: Marcador de Peso Molecular (SIGMA); F1-F5: Fracciones

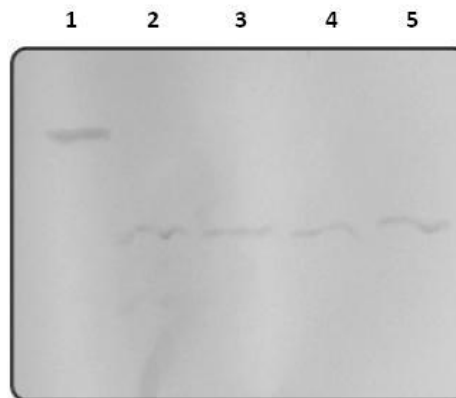


Figura 15: Western-blot de proteínas VP8*-Wa recombinante.
Carril 1: VP4-Wa/Control positivo; Carril 2-4: Proteína VP8*-Wa purificadas.

6.2.4 Amplificación, clonación y expresión de péptidos A, B y C de la subunidad VP8*.

Mediante una reacción de PCR anidada utilizando el producto de PCR/VP8*-Wa de 762 pb como templado, se amplificó 3 productos de PCR denominados A, B y C, los cuales dividen a la región que codifica para la subunidad VP8* en 3 fragmentos (Figura 16).

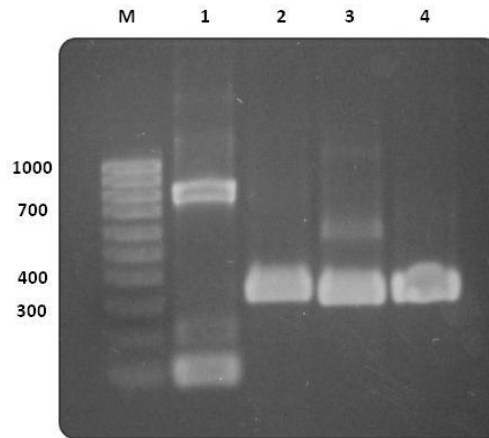


Figura 16: Electroforesis de productos de PCR de fragmentos de la subunidad VP8* de rotavirus Wa.
Carril 1: Marcador de pares de bases HyperLadder IV; Carril 2: PCR-VP8* (762 pb); Carril 3: Fragmento A (315 pb); Carril 4: Fragmento B (296 pb); Carril 5: Fragmento C (309 pb).

Al igual que la subunidad VP8* completa, cada producto de PCR fue clonado en el plásmido pGEM-T (Promega) y subclonado en el plásmido de expresión pET-28a(+) para inducir la expresión de los péptidos recombinantes. Posteriormente bacterias *E.coli* BL21(DE3) fueron transformadas e inducidas con IPTG por 5 hrs para la expresión de los péptidos A, B y C. Todos los péptidos fueron purificados por cromatografía de afinidad bajo condiciones desnaturizantes con urea 4M (Figura 17).

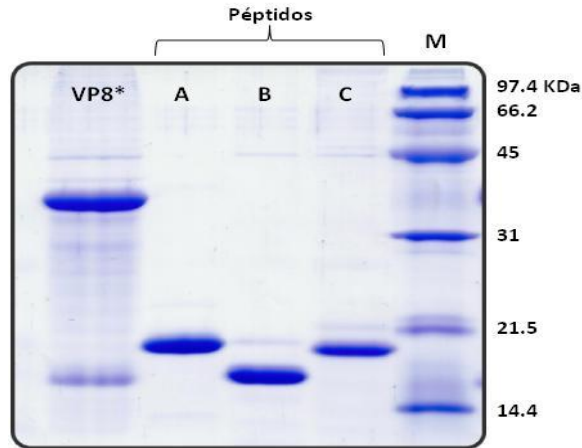


Figura 17: SDS-PAGE de péptidos A, B y C recombinantes purificados por cromatografía de afinidad en gel de poliacrilamida 12%.
M: Marcador de Peso Molecular (BIO-RAD); VP8*: subunidad completa (251 aa); A: Péptido A (102 aa);
B: Péptido B (96 aa); C: Péptido C (101 aa)

Al igual que la subunidad VP8*-Wa recombinante, los péptidos A, B y C fueron identificados mediante Western-blot utilizando el anticuerpo anti-rotavirus rhesus; sin embargo, sólo el péptido A presentó reactividad con el anticuerpo (Figura 18). La falta de reactividad del anti-rotavirus rhesus con los fragmentos B y C fue explicada debido a que rotavirus rhesus (RRV) es una cepa que infecta animales, y comparte algunos epitopes con las cepas de rotavirus humanas. El análisis de comparación de la secuencia de aminoácidos de la subunidad VP8* de la cepa Wa y la cepa Rhesus, demuestra una identidad del 77% solo en la región del péptido A (aa1-102) (Figura 19).

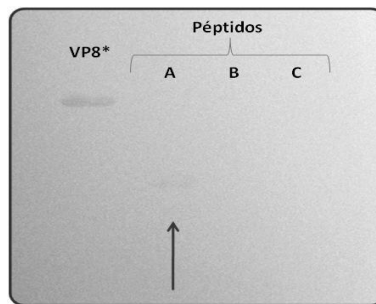


Figura 18: Western-blot de péptidos A, B y C recombinantes de rotavirus Wa, identificados con anti-rotavirus rhesus.

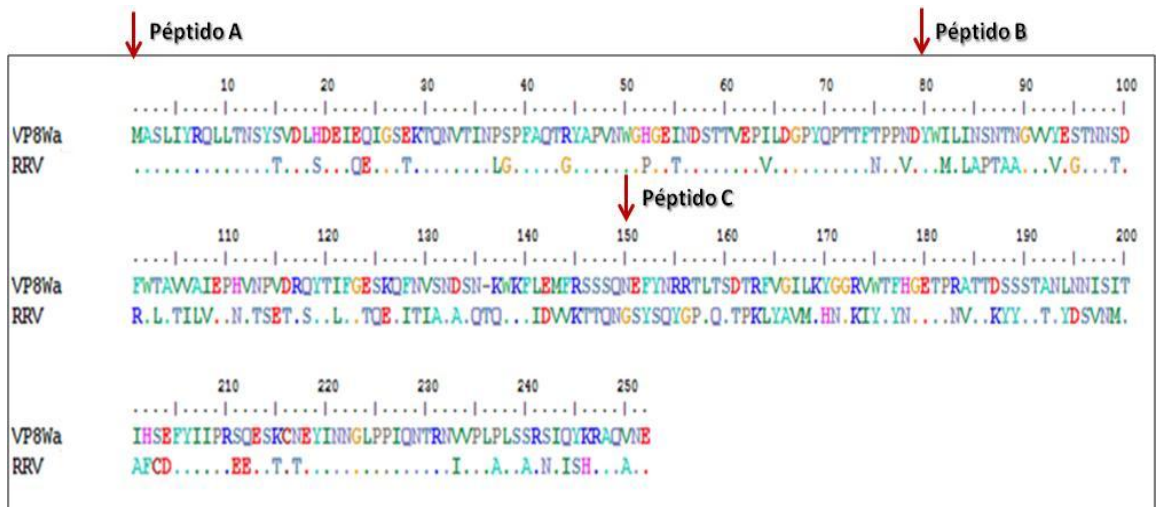


Figura 19: Comparación de la secuencia de aminoácidos de la subunidad VP8* de la cepa animal RRV y la cepa humana Wa (CLUSTAL W/BioEdit Sequence Alignment Editor v7.0).

6.3 Determinación de anticuerpos contra la subunidad VP8* recombinante en suero de niños con una infección natural por rotavirus.

6.3.1 Anticuerpos Neutralizantes contra la cepa de rotavirus Wa.

Para analizar la presencia de anticuerpos específicos de la subunidad VP8* de la proteína VP4 de cepas de rotavirus con genotipo P[8], los 18 sueros de niños con gastroenteritis fueron primero analizados mediante ensayos de neutralización de focos infecciosos para determinar el título de anticuerpos contra la cepa de referencia Wa (Figura 20). De esta manera, en 15 sueros encontramos anticuerpos neutralizantes (AcN) en títulos de 25 hasta 400 y en un suero recolectado durante el 2008 se determinó un título de AcN mayor de 3,200. Además, en 2 sueros no encontramos niveles detectables de AcN (Tabla VI).

6.3.2 Anticuerpos IgG contra la subunidad VP8*-Wa recombinante.

Mediante un sistema de ELISA utilizando la subunidad VP8* de la cepa de rotavirus Wa como

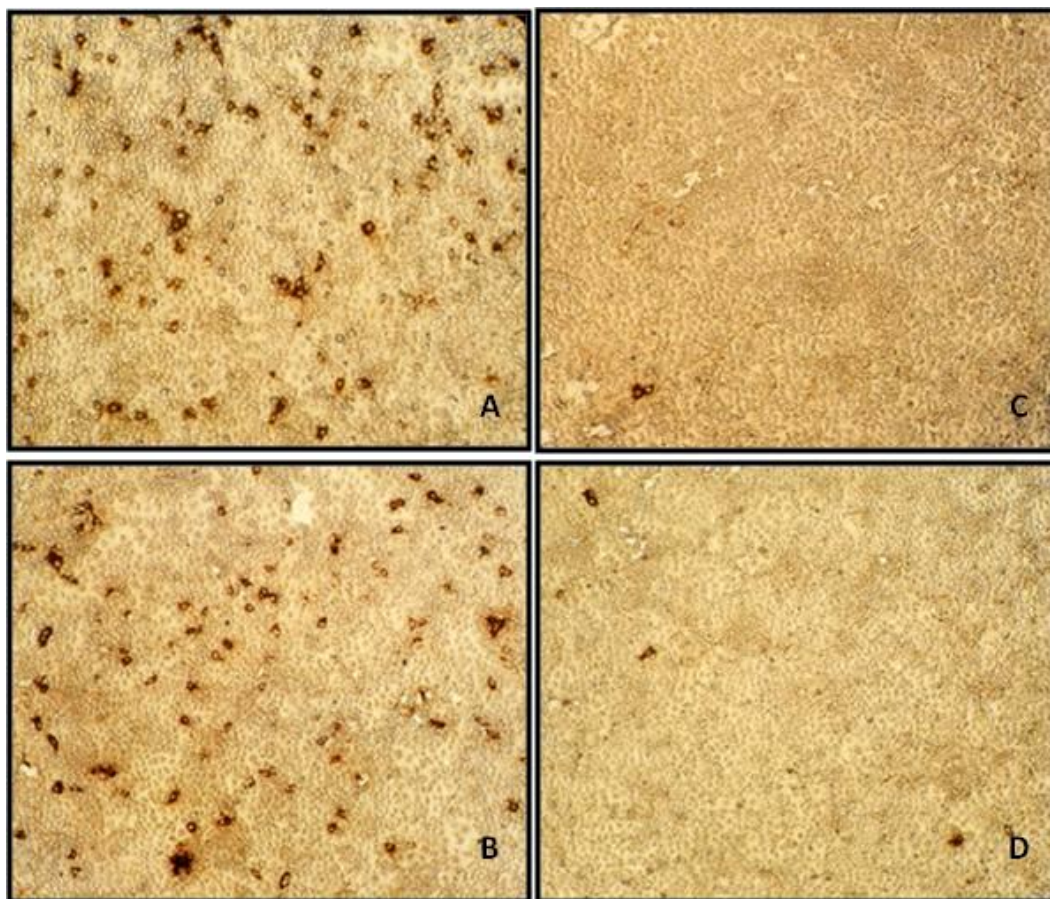


Figura 20: Determinación de anticuerpos neutralizantes contra rotavirus Wa en suero de niños con gastroenteritis. A y B: Controles sin suero (rotavirus Wa a 200 uff/ml); C y D: Rotavirus Wa y suero de niños (neutralización positiva).

antígeno de captura, en los 18 sueros de niños con gastroenteritis encontramos anticuerpos IgG en títulos de 200 hasta 3,200. El suero que presentó un título de anticuerpos neutralizantes mayor de 3,200 contra la cepa Wa, también mostró un título de anti-IgG-VP8* mayor de 3,200 (Tabla VI).

Tabla VI: Análisis de la especificidad de anticuerpos contra la subunidad VP8* recombinante de rotavirus Wa en suero niños con gastroenteritis

Sueros	Título AcN ^a Cepa Wa	Título de IgG-ELISA ^b			
		Subunidad VP8*	Péptido A (1-102 aa)	Péptido B (84-180 aa)	Péptido C (150-251 aa)
CH528-07	200	800	ND	ND	ND
CH531-07	200	400	800	400	400
CH532-07	50	200	200	400	400
CH554-07	50	400	100	200	200
CH555-07	50	400	800	200	800
CH557-07	50	200	400	400	800
CH659-08	200	200	400	200	100
CH674-08	100	400	1,600	>3,200	800
CH678-08	25	800	800	1,600	800
CH679-08	<25	400	800	1,600	800
CH680-08	>3,200	>3,200	>3,200	800	1,600
CH685-08	50	400	200	800	400
CH686-08	400	3,200	>3,200	>3,200	>3,200
CH687-08	50	1,600	>3,200	>3,200	>3,200
CH712-08	25	200	400	200	100
CH716-08	25	200	200	400	200
CH737-08	25	800	800	1,600	800
CH740-08	<25	800	400	1,600	800

a: Recíproco de la dilución del suero donde existió 60% de reducción de focos infecciosos respecto a los controles.

b: Recíproco de la dilución del suero donde existió el doble de absorbancia que los controles negativos (OD= 0.095 +/- 0.005).

6.3.3 Anticuerpos IgG contra los péptidos A, B y C recombinantes-VP8*-Wa.

Al igual que la determinación de anticuerpos IgG contra la subunidad VP8*-Wa recombinante mediante ensayos de ELISA, se analizó la presencia de anticuerpos IgG contra los péptidos Sobrelapados A, B y C recombinantes de la subunidad VP8*-Wa en el suero de los niños con gastroenteritis. En 17 sueros analizados, encontramos anticuerpos contra los 3 péptidos sobrelapados de la subunidad VP8*-Wa. Sin embargo para los péptidos A y C, los títulos de anti-IgG fueron de 100 hasta >3,200, mientras que para el péptido B, los títulos determinados estuvieron de 200 hasta >3,200. Además cuando se comparó el título de anti-IgG contra los 3 péptidos, 4 sueros presentaron mayor reactividad hacia el péptido A, 6 sueros hacia el péptido B y un suero hacia el péptido C (Tabla VI).

6.4 Análisis de la secuencia de aminoácidos de la subunidad VP8* de cepas de rotavirus de campo.

6.4.1 Amplificación y clonación de la subunidad VP8*.

La secuencia de aminoácidos de la subunidad VP8* fue obtenida de 10 cepas de rotavirus (5 muestras colectadas durante 2007 y 5 muestras durante 2008) presentes en heces fecales de niños con gastroenteritis. El ARN de rotavirus fue purificado y después se utilizó en una reacción de RT-PCR para amplificar la región del gen 4 (nucleótidos 1-762) de rotavirus que codifica para la subunidad VP8* (Figura 21). El producto de PCR de 762 pb fue clonado en el plásmido pGEM-T (Promega) para obtener la secuencia de nucleótidos (Figura 22).

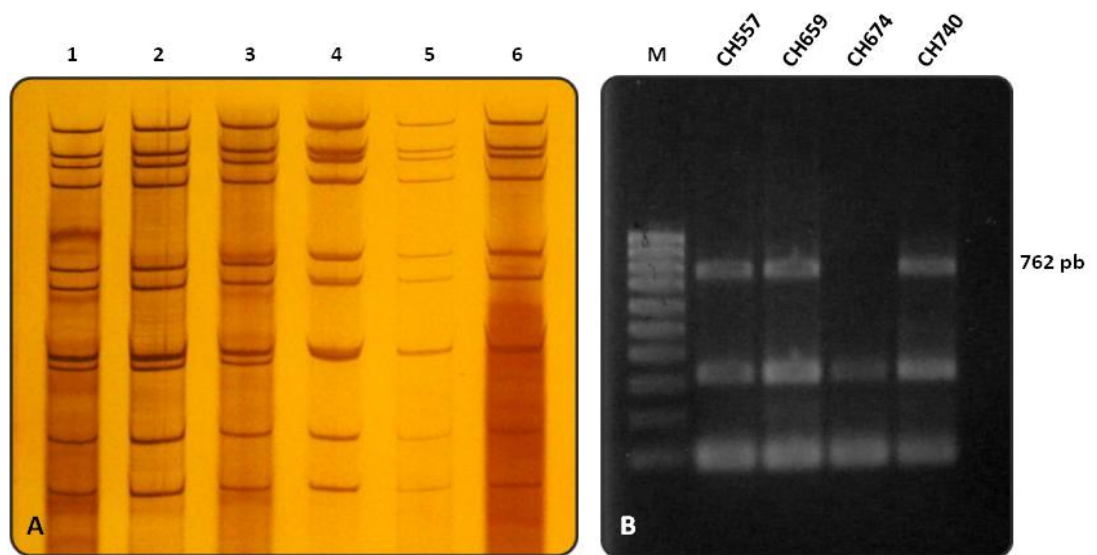


Figura 21: Electroforesis de ARN y productos de PCR de cepas de rotavirus de campo.
 A) PAGE de ARN: Carril 1-3: Cepas 2007; Carril 4-6: Cepas 2008. B) Electroforesis de productos de PCR de la subunidad VP8* en gel de agarosa 1.5%: M: Marcador de pares de bases HyperLadder IV; Cepas de rotavirus.

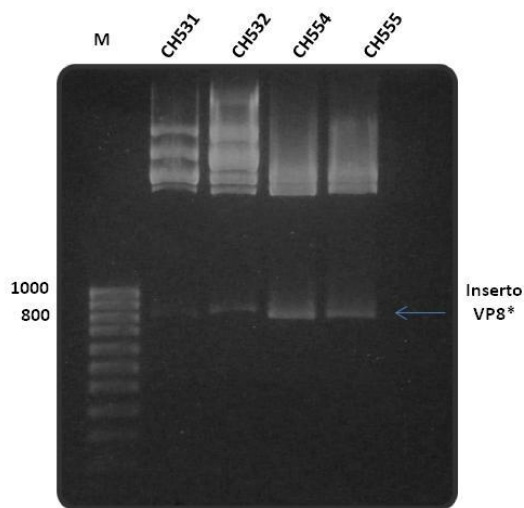


Figura 22: Electroforesis de reacción de restricción con las enzimas *Bam*HI y *Sal*I de plásmidos pGEM-T purificados de bacterias DH5 α en gel agarosa 1.5%.
 M: Marcador de pares de bases HyperLadder IV; Cepas de rotavirus

6.4.2 Análisis de la secuencia de aminoácidos de la subunidad VP8*.

Aunque el genotipo P (VP4) de las cepas de rotavirus de campo fue P[8] al igual que la cepa de referencia Wa, los análisis de comparación de la secuencia de aminoácidos entre las cepas de campo y la cepa Wa demostraron un 91.3-92.4% de identidad, lo cual representa entre 19-22 aminoácidos diferente. Catorce cambios fueron encontrados en las posiciones: 106 (V/I), 108 (I/V), 113 (N/D), 120 (T/N), 121 (I/V), 125 (S/N), 131 (S/R), 135 (N/D), 145 (S/G), 150 (E/D), 163 (F/L), 173 (V/I), 189 (S/N) y 195 (N/G); mismas que se localizan dentro de la región variable de la proteína VP4. Además, las cepas de campo mostraron entre ellas mismas 4 cambios de aminoácidos en las posiciones 35 (I/V), 78 (T/S), 116 (N/D) y 245 (T/K); separando en dos grupos las cepas. En el grupo 1, 4 cepas de campo fueron recolectadas durante el 2007; mientras que en el grupo 2, 4 cepas fueron obtenidas en el 2008 (Figura 23).

Por otra parte, los análisis filogenéticos de la secuencia de aminoácidos de las cepas de campo y secuencias de la proteína VP4 reportadas en el GenBank, demostraron que las cepas de rotavirus obtenidas en Chihuahua, Chihuahua pertenecen al linaje P[8]-3 (Hun-9 like), mientras que la cepa de referencia Wa corresponde al linaje P[8]-1. Asimismo, los cambios de aminoácidos que dividieron en dos grupos a las cepas de campo, se clasificaron como dos sublinajes distintos dentro del linaje P[8]-3 (Figura 24).

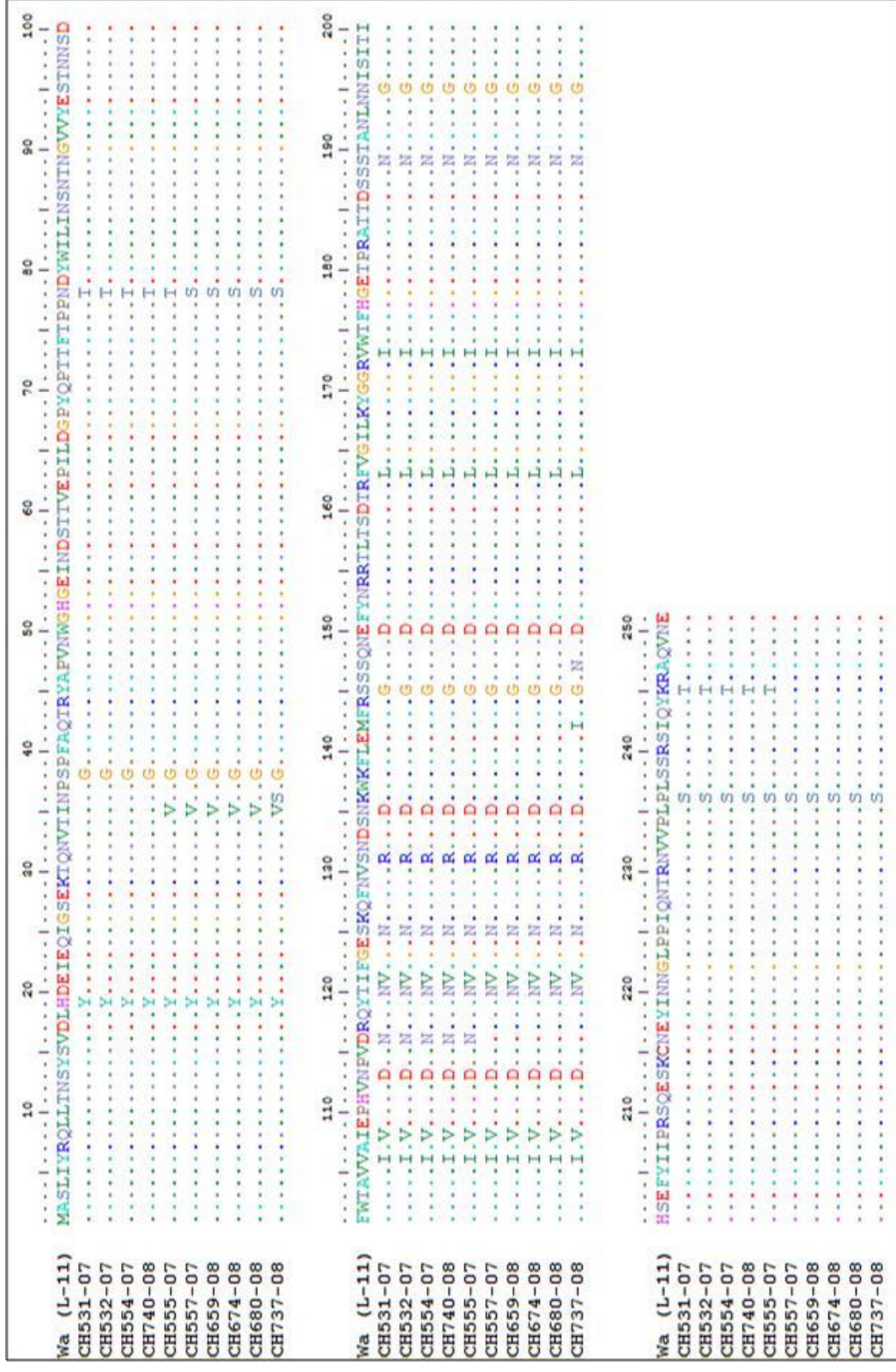


Figura 23: Alineamiento de la secuencia deducida de aminoácidos de la subunidad VP8*, de la cepa de rotavirus humana Wa y cepas de rotavirus aisladas en Chihuahua, México (CLUSTAL W/BioEdit Sequence Alignment Editor v7.0).

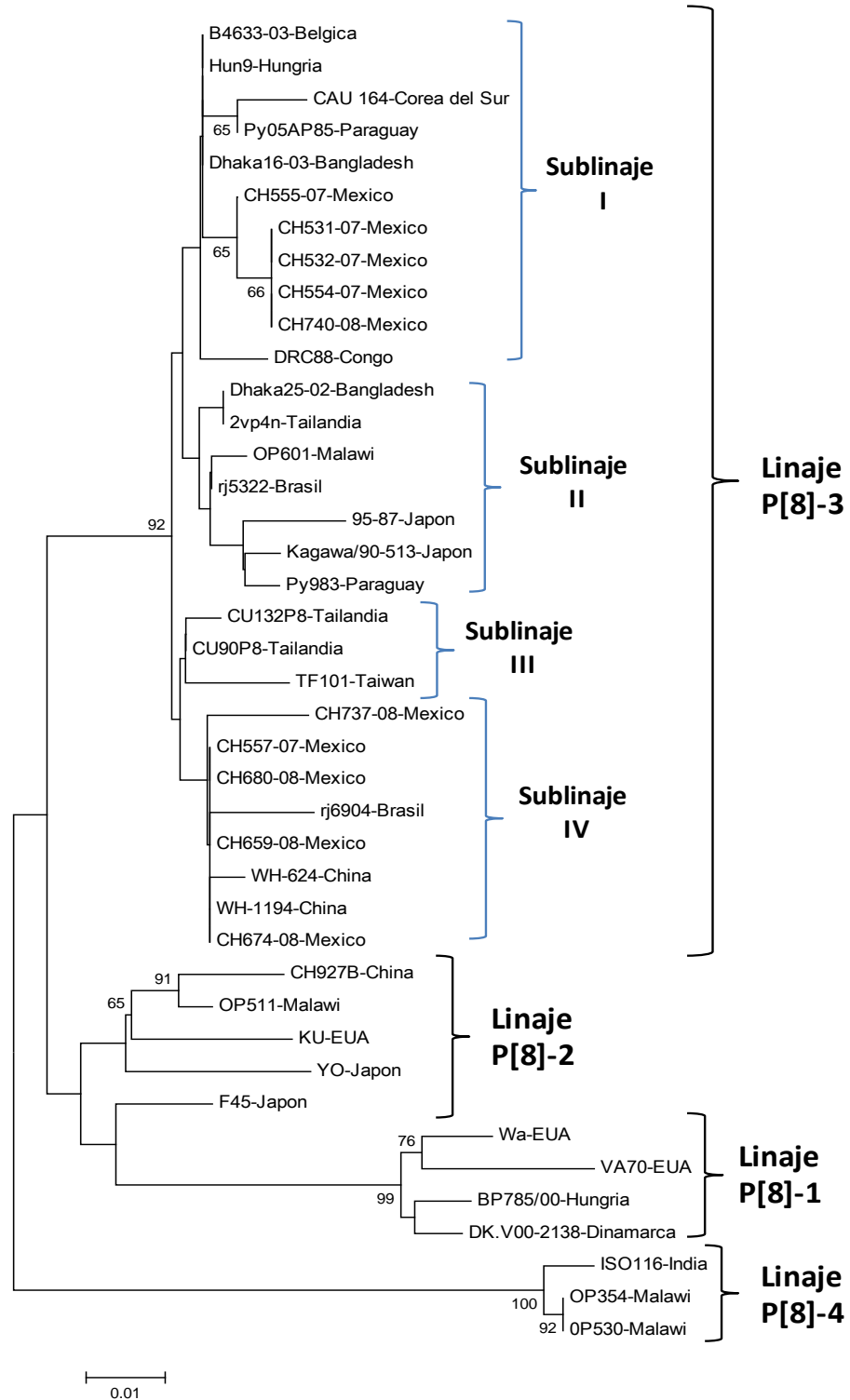


Figura 24: Árbol filogenético de la secuencia de aminoácidos deducida de la subunidad VP8* de cepas de rotavirus aisladas en Chihuahua, México y secuencias reportadas en el GenBank (Programa MEGA v4.1).

6.5 Producción de la subunidad VP8* y péptidos sobrelapados de la cepa de rotavirus de campo CH659-08.

6.5.1 Clonación, expresión y purificación de VP8*, Péptidos A y B.

El protocolo para la producción de la subunidad VP8* y péptidos A y B de la cepa de campo CH659-08 fue el mismo utilizado para las proteínas recombinantes de rotavirus Wa. Primero se amplificó mediante PCR, las regiones del gen 4 de la cepa CH659-08 que codifican para la subunidad VP8* completa y los fragmentos A y B (Figura 25). En seguida, cada producto de PCR fue clonado en el plásmido pGEM-T (Promega) y subclonado en el plásmido de expresión pET-28a(+) para expresar los 3 péptidos recombinantes en bacterias *E. coli* BL21(DE3). En esta etapa también se incluyó un Mock (bacterias BL21 transformadas con plásmido pET-28a SIN inserto) para verificar la no producción de proteínas recombinantes.

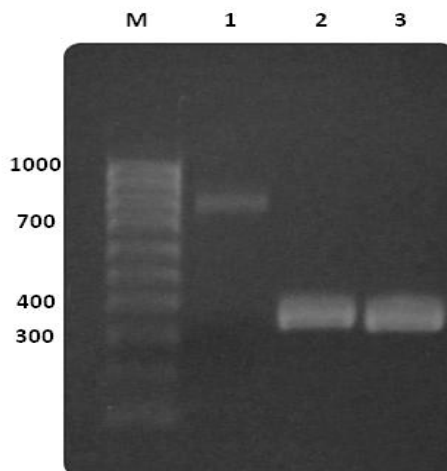


Figura 25: Electroforesis de productos de PCR de la subunidad VP8* y fragmentos VP8* de la cepa de campo CH659-08 en gel de agarosa 1.5%.

M: Marcador de pares de bases HyperLadder IV; VP8*: subunidad VP8* (762 pb);
A: Fragmento A (315 pb); B: Fragmento B (296 pb)

La purificación de los péptidos y el Mock, se realizó mediante una cromatografía de afinidad bajo condiciones desnaturalizantes y mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE), se comparó el peso molecular de los péptidos CH659-08 y los péptidos de la cepa Wa, corroborándose que los péptidos producidos de la cepa CH659-08 presentan el mismo peso molecular que los péptidos de la cepa Wa (Figura 26).

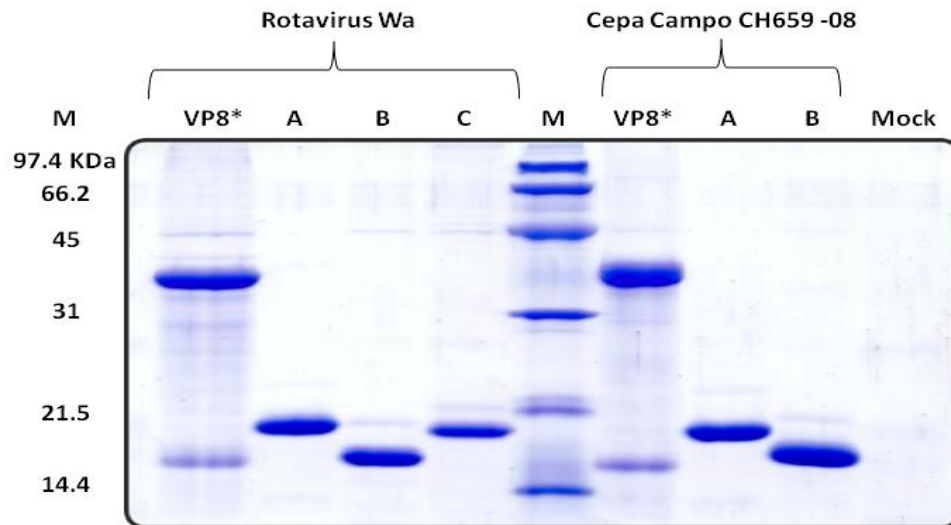


Figura 26: SDS-PAGE de proteínas recombinantes purificadas de las cepas de rotavirus Wa y CH659-08 en gel de poliacrilamida 12%.
M: Marcador de peso molecular (BIO-RAD)

6.6 Análisis de la especificidad de anticuerpos contra la subunidad VP8*-linaje P[8]-1 y P[8]-3 en suero de niños con una infección natural por rotavirus.

6.6.1 Anticuerpos IgG contra la subunidad VP8*-linaje P[8]-1 y P[8]-3 recombinante.

El análisis de la especificidad de los anticuerpos producidos en niños con gastroenteritis por rotavirus hacia la subunidad VP8* recombinante de la cepa Wa (linaje P[8]-1) y la cepa de campo CH659-08 (linaje P[8]-3), se realizó en 10 sueros de los cuales se determinó la secuencia de nucleótidos/aminoácidos de la subunidad VP8* de la cepa de rotavirus infectante. De esta

manera, utilizando las subunidades VP8*-P[8]-1 y P[8]-3 a la misma concentración, mediante un ensayo de ELISA se determinó anticuerpos IgG en los 10 sueros con títulos de 100 hasta >1,600 para las dos proteínas. Sin embargo, 5 sueros presentaron títulos 2 y 4 veces mayor para la subunidad VP8* de la cepa CH659-08 (linaje P[8]-3), mientras que el resto de los sueros, el título de anticuerpos fue igual para ambas proteínas recombinantes (Tabla VII).

Tabla VII: Anticuerpos contra la subunidad VP8* recombinante de cepas de rotavirus linaje P[8]-1 y P[8]-3 en suero de niños con gastroenteritis

Sueros	Título de IgG ^a	
	VP8*-Wa	VP8*-CH659-08
	Linaje P[8]-1	Linaje P[8]-3
CH531-07	200	400^b
CH532-07	100	100
CH544-07	200	400
CH555-07	200	400
CH557-07	200	800
CH659-08	200	200
CH674-08	>1,600	>1,600
CH680-08	>1,600	>1,600
CH737-08	>1,600	>1,600
CH740-08	400	800

a: El título de IgG se reporta como el recíproco de la dilución del suero.

b: El título de anticuerpos escrito en “**Negrita**” indica mayor reactividad hacia una de las proteínas recombinantes.

6.6.2 Anticuerpos IgG contra epitopes inmodomiantes en los péptidos A y B recombinantes linaje P[8]-1 y P[8]-3.

Para analizar si los cambios de aminoácidos entre cepas de rotavirus con linaje P[8]-1 y P[8]-3 son importantes en la reactividad de los anticuerpos anti-VP8* producidos en infecciones naturales, los 10 sueros de niños con fueron analizados mediante ensayos de Western blot

utilizando los péptidos A y B de la cepa Wa y CH659-08. Los resultados indicaron que existen anticuerpos IgG que reconocen epítopes tanto en el péptido A como en el péptido B de ambos linajes. Sin embargo, encontramos mayor reactividad hacia el péptido B (aminoácidos 84-180) que hacia el péptido A de los linajes P[8]-1 y P[8]-3 (Figura 27).

6.7 Análisis antigénico de la subunidad VP8* de cepas de rotavirus con linaje P[8]-1 y P[8]-3.

Utilizando dos anticuerpos policlonales producidos en conejo contra la cepa de rotavirus Wa (virus completo) y contra la subunidad VP8* recombinante de la cepa de rotavirus de campo CH659-08, se analizó la presencia de epítopes comunes en la subunidad VP8* y los péptidos A y B recombinantes con linaje P[8]-1 y P[8]-3 mediante Western blot. De esta manera los 2 anticuerpos mostraron reactividad hacia la subunidad VP8* completa y el péptido B (región variable de VP8*) de ambos linajes; sin embargo, aunque también se observó reactividad hacia el péptido A de ambos linajes, la reactividad del anti-rotavirus Wa fue menor que la observada con el Anti-VP8*-659 (Figura 28).

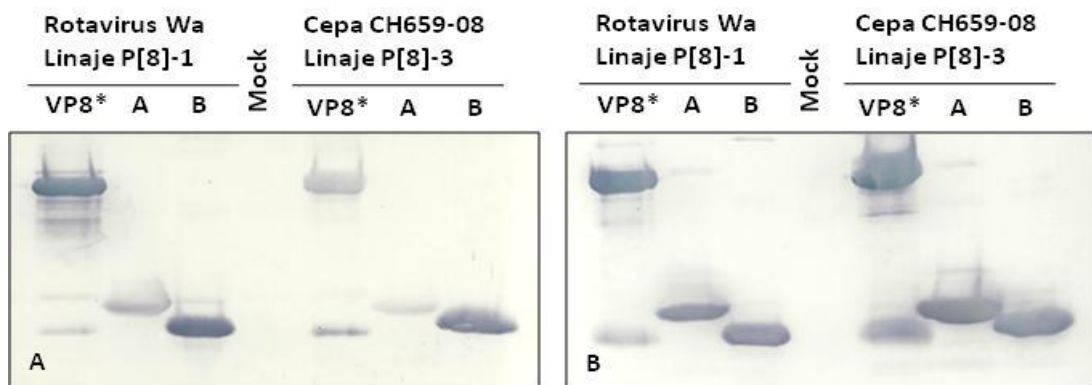


Figura 28: Análisis de Western blot de anticuerpos policlonales producidos en conejo y péptidos recombinantes de cepas de rotavirus con linaje P[8]-1 y P[8]-3.
A: Anti-rotavirus Wa; B: Anti-VP8*-CH659.

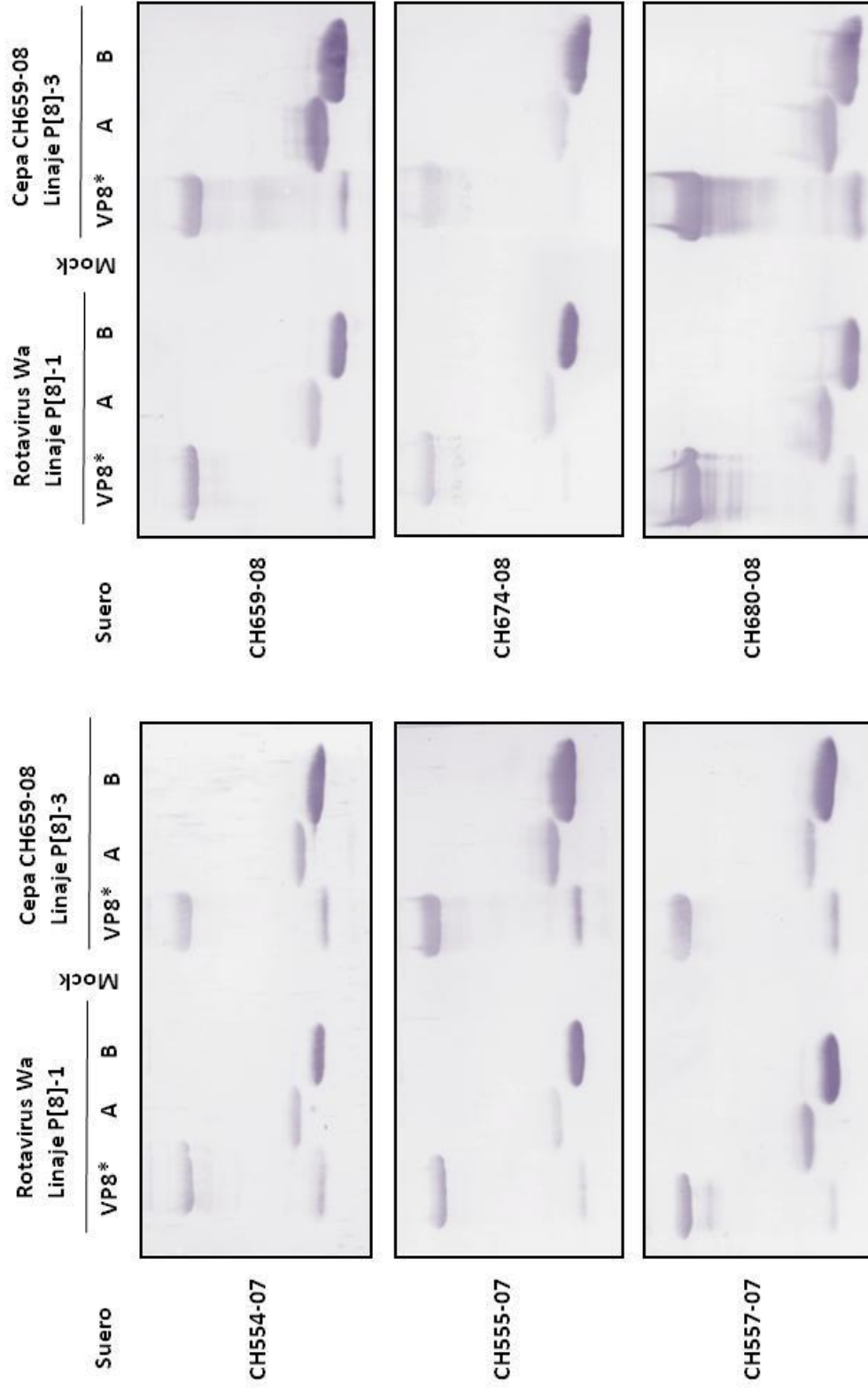


Figura 27: Análisis de Western blot de sueros de niños con gastroenteritis y péptidos recombinantes de cepas de rotavirus con linaje P[8]-1 y P[8]-3.

7. DISCUSION

En el presente trabajo se analizó la presencia de epitopes secuenciales inmunodominantes en la subunidad VP8* de la proteína VP4 de cepas humanas de rotavirus con genotipo P[8], los cuales son reconocidos por anticuerpos inducidos en una infección natural por rotavirus.

Para este estudio, se colectaron 18 muestras de suero y heces de niños con gastroenteritis durante la fase aguda de la infección; estas muestras formaron parte de un estudio epidemiológico de rotavirus realizado en la Cd. de Chihuahua, Chihuahua, México. Los niños con muestra de suero, fueron menores de 2 años de edad y en previos análisis, se determinó que en 17 casos, el genotipo de rotavirus fue G1P[8], mientras que en un caso, el genotipo fue G3P[8].

Por lo tanto, la cepa de rotavirus humana Wa con genotipo G1P[8] fue utilizada como cepa de referencia para producir péptidos recombinantes de la subunidad VP8* de la proteína VP4, ya que según datos de la Organización Mundial de la Salud reporta que cepas de rotavirus con genotipo P[8], son responsables de producir hasta en un 88% de los casos de diarrea en el mundo (Santos and Hoshino, 2005). Asimismo, las vacunas (Rotarix® y RotaTeq®) que se utilizan en la actualidad para el control de rotavirus presentan el genotipo P[8] (Cheuvar *et al.*, 2009; Gouveia *et al.*, 2009).

Para analizar la respuesta de anticuerpos hacia la subunidad VP8* de la cepa Wa, primero se determinó en el suero de los niños la presencia de anticuerpos neutralizantes contra el virus completo para verificar que los anticuerpos reconocieran cepas de rotavirus con genotipo P[8]. De esta manera, solo en 16 sueros encontramos niveles detectables de anticuerpos neutralizantes, con títulos de anticuerpos semejantes a los reportados por Menchaca y colaboradores, en estudios de la respuesta inmune en suero de fase aguda y convaleciente de

niños con infecciones naturales por rotavirus, aunque también encontramos un suero hiperinmune con un título alto de anticuerpos neutralizantes (Menchaca *et al.*, 1998).

Por otra parte, la estrategia para analizar la respuesta inmune contra la subunidad VP8* de rotavirus, fue producir de forma recombinante la subunidad VP8* de la cepa Wa en bacterias *E. coli* BL21(DE3); ya que estudios previos han confirmado que la producción de VP8* recombinante, no altera las características antigénicas de la proteína y puede ser utilizada como antígeno para la producción de anticuerpos neutralizantes (Lee *et al.*, 1995; Pérez-Filgueira *et al.*, 2004; Favacho *et al.*, 2006). En este estudio, nosotros encontramos mediante ensayos de ELISA anticuerpos IgG hacia la subunidad VP8*-Wa en los 18 sueros colectados, demostrando que esta región de la proteína VP4 es inmunogénica durante una infección natural por rotavirus. Estos resultados coinciden con los reportados por Padilla y colaboradores, en donde utilizando también proteínas recombinantes de la subunidad VP8* y VP5* de la proteína VP4 obtenidas de la cepa animal de rotavirus rhesus (RRV), se determinó mayor producción de anticuerpos IgG contra la subunidad VP8* que contra la subunidad VP5*, en el suero de niños vacunados con RRV (Padilla-Noriega *et al.*, 1992).

En seguida, utilizando los péptidos recombinantes sobrelapados A (aa 1-102), B (aa 84-180) y C (aa 150-251) de la subunidad VP8*-Wa en un sistema de ELISA, analizamos la especificidad de los anti-VP8* en el suero de los niños infectados; en donde encontramos anticuerpos IgG hacia epitopes presentes en los 3 péptidos, indicando que estos péptidos recombinantes mantienen epitopes funcionales, es decir, no son truncados al dividir en fragmentos la subunidad VP8*. Además, cuando se comparó para cada muestra de suero el título de anticuerpos contra los 3 péptidos, encontramos que en 11 sueros fue posible determinar mayor reactividad hacia uno de los 3 péptidos, sugiriendo la presencia de epitopes inmunodominantes principalmente en la región A y B de la subunidad VP8*-Wa, lo cual coincide con los reportes de la estructura tridimensional

de la proteína VP4, donde el “core” de la subunidad VP8* (aa 60-223) es la zona más expuesta al exterior y por lo tanto la más inmunogénica (Monnier *et al.*, 2006).

Por lo tanto, ya que no existen antecedentes de estudios realizados en infecciones naturales por rotavirus sobre la especificidad de anticuerpos hacia la subunidad VP8*, fue importante obtener la secuencia deducida de aminoácidos de la subunidad VP8* de las cepas de rotavirus causantes de la gastroenteritis, para analizar si este patrón de reactividad de los anticuerpos anti-VP8*, se debía a las características de las cepas de campo. Cuando se comparó la secuencia de aminoácidos de la subunidad VP8* de la cepa Wa y las cepas de rotavirus aisladas de los niños, encontramos 19-22 cambios de aminoácidos lo que representa del 91.3 al 92.4% de identidad de las cepas de campo con respecto a la cepa Wa. Además, 13 de estos cambios se localizaron en las posiciones 106-173, localizadas en el péptido B (aa 84-180), que representa la región variable de la proteína VP4. Los análisis filogenéticos revelaron también que todas las cepas de rotavirus de campo se agrupan en el linaje P[8]-3, mientras que la cepa humana Wa pertenece al linaje P[8]-1 (Cunliffe *et al.*, 2001).

Un aspecto importante de la presencia de linajes entre cepas de rotavirus con genotipo P[8], es que en la actualidad no está claro, si los cambios de aminoácidos que existen entre estos linajes puede afectar los epitopes presentes en la subunidad VP8* e influir en las características antigénicas de las cepas de rotavirus con genotipo P[8]. Por lo que esta investigación, ofreció la oportunidad de analizar si esta diferencia en la secuencia de aminoácidos de la subunidad VP8* entre la cepa Wa (linaje P[8]-1) y las cepas de rotavirus de campo (linaje P[8]-3), era importante para la reactividad de los anti-VP8* presentes en el suero de los niños con gastroenteritis.

Por tal motivo, utilizando el mismo sistema de expresión para las proteínas recombinantes de la cepa Wa, se produjeron la subunidad VP8* y los péptidos A (aa 1-102) y B (aa 84-180) recombinantes de la cepa de campo CH659-08 (linaje P[8]-3). Mediante ensayos de ELISA,

primero se analizó la reactividad del suero de los niños, contra la subunidad VP8* de la cepa Wa (linaje P[8]-1) y la cepa de campo CH659-08 (linaje P[8]-3), en donde los resultados indicaron títulos de anticuerpos IgG similares hacia las dos proteínas recombinantes, proponiéndose que los linajes P[8]-1 y P[8]-3 pueden compartir determinantes antigénicos. Por otra parte, mediante ensayos de Western blot, aunque también encontramos reactividad de los anti-VP8* hacia los péptidos A y B de ambos linajes, los sueros presentaron mayor reactividad hacia el péptido B-P[8]-1 y P[8]-3, revelando que durante una infección natural por rotavirus, se producen anticuerpos IgG contra epitopes secuenciales inmunodominantes en la región variable de la subunidad VP8* de la proteína VP4.

Por consiguiente, para comprobar si la reactividad de los anticuerpos en el suero de los niños hacia el péptido B de los linajes P[8]-1 y P[8]-3 es debida a la presencia de epitopes comunes, se analizó la reactividad de 2 anticuerpos policlonales producidos en conejos dirigidos hacia la cepa de rotavirus Wa (virus completo) y contra la subunidad VP8* recombinante de la cepa de campo CH659-08. Los resultados de Western blot indicaron que los dos anticuerpos presentan reactividad hacia el péptido B-P[8]-1 y P[8]-3; de esta manera, aunque el análisis de comparación de la secuencia de aminoácidos del péptido B entre la cepa Wa y la cepa de campo CH659-08 muestra 13 cambios de aminoácidos; en las posiciones 106 (V/I), 108 (I/V), 120 (T/N), 121 (I/V), 150 (E/D) y 173 (V/I), las sustituciones de aminoácidos presentan características bioquímicas semejantes, y pueden no ser relevantes para cambiar las características antigénicas en estos puntos. Por lo que es posible que existan epitopes comunes entre estas cepas de rotavirus con linaje P[8] diferente que se conservan a pesar de los cambios encontrados, considerando que un epitope secuencial está formado por 8-15 aminoácidos (Dottavio, 1996). Además, utilizando ensayos de neutralización de focos infecciosos, el anti-VP8*-CH659 fue capaz de neutralizar a la cepa de rotavirus Wa (virus completo), confirmando también la presencia de epitopes de

neutralización comunes en la subunidad VP8* entre cepas de rotavirus con linaje P[8]-1 y P[8]-3 (datos no mostrados).

Por lo tanto, la importancia de los resultados de esta investigación sobre la presencia de epitopes inmunodominantes conservados en la región variable de la subunidad VP8* de cepas de rotavirus con linaje P[8] diferente, repercute en la evaluación de la eficacia de la vacuna monovalente Rotarix®(GSK), aplicada a la población infantil en México desde el 2006; ya que esta vacuna presenta un 99.3% de identidad con la cepa de rotavirus Wa (Ward *et al.*, 2006). Además, el estudio de la respuesta inmune en niños con infecciones naturales utilizando péptidos recombinantes, puede ser una buena estrategia para evaluar la evolución de las cepas de rotavirus y a su vez, determinar el impacto de mutaciones en los epitopes inmunodominantes y en la memoria inmunológica producida por estos epitopes.

8. CONCLUSIONES

- En una infección natural por rotavirus, existe la producción de anticuerpos IgG contra la subunidad VP8* de la proteína VP4.
- Los anticuerpos anti-VP8* reconocen epitopes distribuidos en diferentes regiones de la subunidad VP8* de la proteína VP4 de cepas humanas de rotavirus.
- La región variable de la subunidad VP8* de cepas humanas de rotavirus presentan epitopes secuenciales con mayor inmunodominancia.
- Cepas de rotavirus humanas con linaje P[8]-1 y P[8]-3, presentan epitopes secuenciales conservados en la región variable de la subunidad VP8* de la proteína VP4.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Abdel-Haq N, Amjad M, McGrath E, Chearskul P, Amer A, Salimnia H, Asmar BI. 2011. Emergence of human rotavirus genotype G9 in Metropolitan Detroit between 2007 and 2009. *J. Med. Microbiol.* DOI: 10.1099/jmm.0.026807-0.
2. Abe M, Ito N, Masatani T, Nakagawa K, Yamaoka S, Kanamaru Y, Suzuki H, Shibano K, Arashi Y, Sugiyama M. 2011. Whole genome characterization of new bovine rotavirus G21P[29] and G24P[33] strains provides evidence for interspecies transmission. *J. Gen. Virol.* 92(Pt 4):952-60.
3. Arias CF, Lizano M, López S. 1987. Synthesis in *Escherichia coli* and immunological characterization of a polypeptide containing the cleavage sites associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. *J. Gen. Virol.* 68:633-642.
4. Arista S, Giammanco GM, De Grazia S, Colomba C, Martella V. 2005. Genetic variability among serotype G4 Italian human rotaviruses. *J. Clin. Microbiol.* 43:1420-1425.
5. Arista S, Vizzi E, Alaimo C, Palermo D, Cascio A. 1999. Identification of human rotavirus strain with the P [14] genotype by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 37:2706-2708.
6. Arora R, Chhabra P, Chitambar SD. 2009. Genetic diversity of genotype G1 rotaviruses co-circulating in Western India. *Virus Res.* 146(1-2):36-40.
7. Bányai K, Martella V, Jakab F, Melegh B, Szücs G. 2004. Sequencing and phylogenetic analysis of human genotype P[6] rotavirus strains detected in Hungary provides evidence for genetic heterogeneity within the P[6] VP4 gene. *J. Clin. Microbiol.* 42:4338-4343.
8. Beards G, Pilford JN, Thouless ME, Flewett TH. 1980. Rotavirus serotype by serum neutralization. *J. Med. Virol.* 74:65-70.
9. Bernstein DI. 2009. Rotavirus overview. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 28:S50–S53.

10. Brüssow H, Offit PA, Gerna G, Bruttin A, Sidoti J. 1990. Polypeptide specificity of antiviral serum antibodies in children naturally infected with human rotavirus. *J. Virol.* 64:4130-4136.
11. Buttery JP, Lambert SB, Grimwood K, Nissen MD, Field EJ, Macartney KK, Akikusa JD, Kelly JJ, Kirkwood CD. 2011. Reduction in rotavirus-associated acute gastroenteritis following introduction of rotavirus vaccine into Australia's National Childhood vaccine schedule. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 30(1 Suppl):S25-9.
12. Chevart B, Friedland LR, Abu-Elyazeed R, Han HH, Guerra Y, Verstraeten T. 2009. The human rotavirus vaccine RIX4414 in infants a review of safety and tolerability. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 28:225-232.
13. Clark HF, Offit PA, Ellis RW, Eiden JJ, Krah D, Shaw AR, Pichichero M, Treanor JJ, Borian FE, Bell LM, and Plotkin SA. 1996. The development of multivalent bovine rotavirus (strain WC3) reassortant vaccine for infants. *J. Infect. Dis.* 174(Suppl 1): S73-S80.
14. Contreras JF, Menchaca GE, Padilla-Noriega L, Tamez RS, Greenberg HB, López S, Arias CF. 1995. Heterogeneity of VP4 neutralization epitopes among serotype P1A human rotavirus strains. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2:506-508.
15. Coulson BS. 1993. Typing of human rotavirus VP4 by an enzyme immunoassay using monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 31:1-8.
16. Cunliffe NA, Gondwe JS, Graham SM, Thindwa BD, Dove W, Broadhead RL, Molyneux ME, Hart CA. 2001. Rotavirus strain diversity in Blantyre, Malawi, from 1997 to 1999. *J. Clin. Microbiol.* 39:836-843.
17. Das BK, Gentsch JR, Cicirello HG, Woods PA, Gupta A, Ramachandran M, Kumar R, Bhan MK, Glass RI. 1994. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. *J. Clin. Microbiol.* 32:1820-1822.

18. Delem A, Lobmann M, Zygraich N. 1984. A bovine rotavirus developed as a candidate vaccine for use in humans. *J. Biol. Stand.* 12: 443-445.
19. Dennehy PH. 2008. Rotavirus vaccines: an overview. *Clin. Microbiol. Rev.* 21:198–208.
20. Desselberger U. 1996. Genome rearrangements of rotaviruses. *Adv. Virus Res.* 46:69–95.
21. Dey SK, Hayakawa Y, Rahman M, Islam R, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H. 2009. G2 strain of rotavirus among infants and children, Bangladesh. *Emerg. Infect. Diseases.* 15:91-93.
22. Dolan KT, Twist EM, Horton-Slight P, Forrer C, Bell LM, Plotkin SA, Clark HF. 1985. Epidemiology of rotavirus electropherotypes determined by a simplified diagnostic technique with RNA analysis. *J. Clin. Microbiol.* 21:753-758.
23. Dormitzer PR, Nason EB, Venkataram-Prasad BV, Harrison SC. 2004. Structural rearrangements in the membrane penetration protein of a non-enveloped virus. *Nature.* 439(7003):1053-1058.
24. Dottavio D. 1996. Epitope mapping using phage-displayed peptide libraries. In *Methods in Molecular Biology*, vol. 66: Epitope Mapping Protocols, G.E. Morris (ed), Humana Press Inc.: Totowa, NJ. pp. 181-193.
25. Dowling W, Denisova E, LaMonica R, Mackow ER. 2005. Selective membrane permeabilization by the rotavirus VP5* protein is abrogated by mutations in an internal hydrophobic domain. *J. Virol.* 74:6368-6376.
26. Espínola EE, Amarilla A, Arbiza J, Parra GI. 2008. Sequence and phylogenetic analysis of the VP4 gene of human rotaviruses isolated in Paraguay. *Arch. Virol.* 153:1067–1073.
27. Estes MK. 2001. Rotaviruses and their replication. In *Fields Virology*, B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley (eds), Lippincott-Williams & Wilkins: Philadelphia, PA. pp. 1747-1785.

28. Estes MK, Cohen J. 1989. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 53:410-449.
29. Favacho AR, Kurtenbach E, Sardi SI, Gouvea VS. 2006. Cloning, expression, and purification of recombinant bovine rotavirus hemagglutinin, VP8*, in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 46:196-203.
30. Fischer TK, Steinsland H, Mølbak K, Ca R, Gentsch JR, Valentiner-Branth P, Aaby P, Sommerfelt H. 2000. Genotype profiles of rotavirus strains from children in a suburban community in Guinea-Bissau, Western Africa. *J. Clin. Microbiol.* 38:264-267.
31. Gallegos CO, Patton JT. 1989. Characterization of rotavirus replication intermediates: A model for the assembly of single-shelled particles. *Virology.* 172:616-627.
32. Gentsch JR, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, Das VK, Bhan MK. 1992. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30:1365-1373.
33. Gil MT, De Souza CO, Asensi M, Buesa J. 2000. Homotypic protection against rotavirus-induced diarrhea in infant mice breast-fed by dams immunized with the recombinant VP8* subunit of the VP4 capsid protein. *Viral Immunol.* 13:187-200.
34. Gorrell RJ, Bishop RF. 1997. Production of reassortant viruses containing human rotavirus VP4 and SA11 VP7 for measuring neutralizing antibody following natural infection. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 4: 509-514.
35. Gorziglia M, Green K, Nishikawa K, Taniguchi K, Jones R, Kapikian AZ, Chanock RM. 1988. Sequence of the fourth gene of human rotaviruses recovered from asymptomatic or symptomatic infections. *J. Virol.* 62:2978-2984.

36. Gorziglia M, Larralde G, Kapikian AZ, Chanock RM. 1990. Antigenic relationships among human rotaviruses as determined by outer capsid protein VP4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:7155-7159.
37. Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, Clark HF, Forrester B, Fang ZY. 1990. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 28:276–282.
38. Gouveia MG, DiNubile MJ, Dallas MJ, Heaton PM, Kuter BJ. 2009. Efficacy of pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine based on breastfeeding frequency. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 27:656-658.
39. Greenberg HB, Valdesuso J, van Wyke K, Midthun K, Walsh H, McAuliffe V, Wyatt RG, Kalica AR, Flores J, Hoshino Y. 1983. Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies directed at two surface proteins of rhesus rotavirus. *J. Virol.* 47:267–275.
40. Griffin DD, Kirkwood CD, Parashar UD, Woods PA, Bresee JS, Glass RI, Gentsch JR, the National Rotavirus Strain Surveillance System Collaborating Laboratories. 2000. Surveillance of rotavirus strains in the United States: identification of unusual strains. *J. Clin. Microbiol.* 38:2784–2787.
41. Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95–98.
42. Hoshino Y, Kapikian AZ. 1996. Classification of rotavirus VP4 and VP7 serotypes. *Arch. Virol. Suppl.* 12:99-111.
43. Hoshino Y, Sereno MM, Midthun K, Flores J, Kapikian AZ, Chanock RM. 1985. Independent segregation of two antigenic specificities (VP3 and VP7) involved in neutralization of rotavirus infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:8701–8704.

44. Hoshino Y, Wyatt RG, Greenberg HG, Flores J, Kapikian AZ. 1984. Serotypic similarity and diversity of rotavirus of mammalian and avian origin as studied by plaque-reduction neutralization. *J. Infect. Dis.* 149:694-702.
45. Huang JA, Nagesha HS, Holmes IH. 1993. Comparative sequence analysis of VP4s from five Australian porcine rotaviruses: implication of an apparent new type. *Virology.* 196:319-327.
46. Iturriza-Gómara M, Green J, Brown DWG, Desselberger U, Gray JJ. 2000. Diversity within the VP4 of rotavirus P[8] strains: implications for reverse transcription-PCR genotyping. *J. Clin. Microbiol.* 38:898-901.
47. Iturriza-Gómara M, Isherwood B, Desselberger U, Gray J. 2001. Reassortment in vivo: driving force for diversity of human rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999. *J. Virol.* 75:3696-3705.
48. Li B, Clark HF, Gouvea V. 1993. Nucleotide sequence of the VP4-encoding gene of an unusual human rotavirus (HCR3). *Virology.* 196:825-830.
49. Lopez S, Arias CF, Bell JR, Strauss JH, Espejo RT. 1985. Primary structure of the cleavage site associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. *Virology.* 144:11-19.
50. Kapikian AZ. 1993. Viral gastroenteritis. *J. Amer. Medical Association.* 269:627– 629.
51. Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM. 2001. Rotaviruses. *In* Fields Virology, B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley (eds), Lippincott-Williams & Wilkins: Philadelphia, PA. pp. 1787-1833.
52. Kirkwood CD, Bishop RF, Coulson BS. 1996. Human rotavirus VP4 contains strain-specific, serotype-specific and cross-reactive neutralization sites. *Arch. Virol.* 141:587-600.

53. Kirkwood CD, Boniface K, Barnes GL, Bishop RF. 2011. Distribution of rotavirus genotypes after introduction of rotavirus vaccines, Rotarix® and RotaTeq®, into the National Immunization Program of Australia. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 30(1 Suppl):S48-53.
54. Kobayashi N, Taniguchi K, Urasawa S. 1990. Identification of operationally overlapping and independent cross-reactive neutralization regions on human rotavirus VP4. *J. Gen. Virol.* 71:2615-2623.
55. Komoto S, Kugita M, Sasaki J, Taniguchi K. 2008. Generation of recombinant rotavirus with an antigenic mosaic of cross-reactive neutralization epitopes on VP4. *J. Virol.* 82: 6753–6757.
56. Koshimura Y, Nakagomi T, Nakagomi O. 2000. The relative frequencies of G serotypes of rotavirus recovered from hospitalized children with diarrhea: a 10-year survey (1987–1996) in Japan with a review of globally collected data. *Microbiol. Immunol.* 44:499–510.
57. Larralde G, Li BG, Kapikian AZ, Gorziglia M. 1991. Serotype-specific epitope(s) present on the VP8 subunit of rotavirus VP4 protein. *J. Virol.* 65:3213-3218.
58. Larralde G, Gorziglia M. 1992. Distribution of conserved and specific epitopes on the VP8 subunit of rotavirus VP4. *J. Virol.* 66:7438-7443.
59. Lee J, Babiuk LA, Harland R, Gibbons E, Elazhary Y, Yoo D. 1995. Immunological response to recombinant VP8* subunit protein of bovine rotavirus in pregnant cattle. *J. Gen. Virol.* 76:2477-2483.
60. Ludert JE, Krishnaney AA, Burns JW, Vo PT, Greenberg HB. 1996. Cleavage of rotavirus VP4 in vivo. *J. Gen. Virol.* 77:391-395.
61. Mackow ER, Barnett JW, Chan H, Greenberg HB. 1989. The rhesus rotavirus outer capsid protein VP4 functions as a hemagglutinin and is antigenically conserved when expressed by a baculovirus recombinant. *J. Virol.* 63:1661-1668.

62. Mackow ER, Shaw RD, Matsui SM, Vo PT, Dang MN, Greenberg HB. 1988. The rhesus rotavirus gene encoding protein VP3: Location of amino acids involved in homologous and heterologous rotavirus neutralization and identification of a putative fusion region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:645-649.
63. Martella V, Ciarlet M, Bányai K, Lorusso E, Arista S, Lavazza A, Pezzotti G, Decaro N, Cavalli A, Lucente MS, Corrente M, Elia G, Camero M, Tempesta M, Buonavoglia CD. 2007. Identification of group A porcine rotavirus strains bearing a novel VP4 (P) genotype in Italian swine herds. *J. Clin. Microbiol.* 45:577-580.
64. Matsui SM, Offit PA, Vo PT, Mackow ER, Benfield DA, Shaw RD, Padilla-Noriega L, Greenberg HB. 1989. Passive protection against rotavirus-induced diarrhea by monoclonal antibodies to the heterotypic neutralization domain of VP7 and the VP8 fragment of VP4. *J. Clin. Microbiol.* 27:780-782.
65. Matthijnssens J, Ciarlet M, Heiman E, Arijis I, Delbeke T, McDonald SM, Palombo EA, Iturriza-Gómara M, Maes P, Patton JT, Rahman M, Van Ranst M. 2008. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *J. Virol.* 82:3204–3219.
66. Maunula L, von Bonsdorff CH. 1998. Short sequences define genetic lineages: phylogenetic analysis of group A rotaviruses based on partial sequences of genome segments 4 and 9. *J. Gen. Virol.* 79:321–332.
67. Maunula L, von Bonsdorff CH. 2002. Frequent reassortments may explain the genetic heterogeneity of rotaviruses: analysis of Finnish rotavirus strains. *J. Virol.* 76:11793-11800.
68. Menchaca G, Padilla-Noriega L, Méndez-Toss M, Contreras JF, Puerto FI, Guiscafré H, Mota F, Herrera I, Cedillo R, Muñoz O, Ward R, Hoshino Y, López S, Arias C.F. 1998. Serotype specificity of neutralizing-antibody response induced by individual surface proteins of rotavirus in natural infections of young children. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5:328-334.

69. Mendez E, Arias CF, Lopez S. 1992. Genomic rearrangements in human rotavirus strain Wa analysis of rearranged RNA segment 7. *Arch. Virol.* 125:331–338.
70. Molto Y, Cortes JE, De Oliveira LH, Mike A, Solis I, Suman O, Coronado L, Patel MM, Parashar UD, Cortese MM. 2011. Reduction of diarrhea-associated hospitalizations among children aged < 5 Years in Panama following the introduction of rotavirus vaccine. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 30(1 Suppl):S16-20.
71. Monnier N, Higo-Moriguchi K, Sun Z-YJ, Venkataram-Prasad BV, Taniguchi K, Dormitzer PR. 2006. High-resolution molecular and antigen structure of the VP8* core of a sialic acid-independent human rotavirus strain. *J. Virol.* 80:1513-1523.
72. Nagashima S, Kobayashi N, Paul SK, Alam MM, Chawla-Sarkar M, Krisham T. 2009. Characterization of full-length VP4 genes of OP354-like P[8] human rotavirus strains detected in Bangladesh representing a novel P[8] subtype. *Arch. Virol.* 154(8):1223-31.
73. Nakagomi O, Isegawa Y, Ward RL, Knowlton DR, Kaga E, Nakagomi T, Ueda S. 1994. Naturally occurring dual infection with human and bovine rotaviruses as suggested by the recovery of G1P8 and G1P5 rotaviruses from a single patient. *Arch. Virol.* 137:381-388.
74. Offit PA, Clark HF, Blavat G, Greenberg HB. 1986. Reassortant rotaviruses containing structural proteins VP3 and VP7 from different parents induce antibodies protective against each parental serotype. *J. Virol.* 60:6325-6328.
75. Padilla-Noriega L, Dunn SJ, Lopez S, Greenberg HB, Arias CF. 1995. Identification of two independent neutralization domains on the VP4 trypsin cleavage products VP5* and VP8* of human rotavirus ST3. *Virology.* 206: 148-154.
76. Padilla-Noriega L, Fiore L, Rennels MB, Losonsky GA, Mackow ER, Greenberg HB. 1992. Humoral immune responses to VP4 and its cleavage products VP5* and VP8* in infants vaccinated with rhesus rotavirus. *J. Clin. Microbiol.* 30:1392-1397.

77. Padilla-Noriega L, Méndez-Toss M, Menchaca G, Contreras JF, Romero-Guido P, Puerto FI, Guiscafré H, Mota F, Herrera I, Cedillo R, Muñoz O, Calva J, Guerrero ML, Coulson BS, Greenberg HB, López S, Arias CF. 1998. Antigenic and genomic diversity of human rotavirus VP4 in two consecutive epidemic seasons in Mexico. *J. Clin. Microbiol.* 36:1688-1692.
78. Padilla-Noriega L, Werner-Eckert R, Mackow ER, Gorziglia M, Larralde G, Taniguchi K, Greenberg HB. 1993. Serologic analysis of human rotavirus serotypes P1A and P2 by using monoclonal antibodies. *Journal of Clinical Microbiology.* 31:622-628.
79. Parashar UD, Glass RI. 2009. Rotavirus vaccines-early success, remaining questions. *N. Engl. J. Med.* 360:1063-1065.
80. Pérez-Filgueira D, Mozgovej M, Wigdorovitz A, Dus Santos MJ, Parreño V, Trono K, Fernandez FM, Carrillo C, Babiuk LA, Morris TJ, Borca MV. 2004. Passive protection to bovine rotavirus (BRV) infection induced by a BRV VP8* produced in plants using a TMV-based vector. *Arch. Virol.* 149: 2337-2348.
81. Pérez-Vargas J, Isa P, López S, Arias CF. 2005. Rotavirus vaccine: early introduction in Latin America-risks and benefits. *Arch. Med. Res.* 37: 1-10.
82. Prasad BVV, Rothngel R, Zeng CQY, Jakana J, Lawton JA, Chiu W, Estes MK. 1996. Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional complexes in rotavirus. *Nature.* 382:471-473.
83. Richardson SC, Bishop RF. 1990. Homotypic serum antibody responses to rotavirus proteins following primary infection of young children with serotype 1 rotavirus. *J. Clin. Microbiol.* 28:1891-1897.

84. Richardson V, Hernandez-Pichardo J, Quintanar-Solares M, Esparza-Aguilar M, Johnson B, Gomez-Altamirano CM, Parashar U, Patel M. 2010. Effect of rotavirus vaccination on death from childhood diarrhea in Mexico. *N. Engl. J. Med.* 362:299-305.
85. Rodger SM, Bishop RF, Birch C, McLean B, Holmes HI. 1981. Molecular epidemiology of human rotaviruses in Melbourne, Australia, from 1973 to 1979, as determined by electrophoresis of genome ribonucleic acid. *J. Clin. Microbiol.* 13:272-278.
86. Rose TL, Miagostovich MP, Leite JP. 2010. Rotavirus A genotype G1P[8]: a novel method to distinguish wild-type strains from the Rotarix vaccine strain. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 105(8):1068-72.
87. Ruiz-Palacios GM, Pérez-Schae I, Velázquez FR, Abate H, Breuer T, Costa Clemens S, Chevart B, Espinoza F, Gillard P, Innis BL, Cervantes Y, Linhares AC, López P, Macías-Parra M, Ortega-Barría E, Richardson V, Rivera-Medina DM, Rivera L, Salinas B, Pavía-Ruz N, Salmerón J, Rüttimann R, Tinoco JC, Rubio P, Nuñez E, Guerrero ML, Yarzabal JP, Damaso S, Tornieporth N, Sáez-Llorens X, Vergara RF, Vesikari T, Bouckennooghe A, Clemens R, De Vos B, and O’Ryan M for the Human Rotavirus Vaccine Study Group*. 2006. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N. Engl. J. Med.* 354:11-22.
88. Samajdar S, Ghosh S, Dutta D, Chawla-Sarkar M, Kobayashi N, Naik TN. 2008. Human group A rotavirus P[8] Hun9-like and rare OP354-like strains are circulating among diarrhoeic children in Eastern India. *Arch. Virol.* 153:1933–1936.
89. Santos N, Hoshino Y. 2005. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev. Med. Virol.* 15:29–56.

90. Santos N, Soares CS, Volotão EM, Albuquerque MCM, Hoshino Y. 2003. Surveillance of rotavirus strains in Rio de Janeiro, Brazil, from 1997 to 1999. *J. Clin. Microbiol.* 41:3399–3402.
91. Shaw AL, Rothnagel R, Chen D, Ramig RF, Chiu W, Venkataram Prasad BV. 1993. Three-dimensional visualization of the rotavirus hemagglutinin structure. *Cell.* 74:693-701.
92. Staat MA, Azimi PH, Berke T, Roberts N, Bernstein DI, Ward RI, Pickering LK, Matson DO. 2002. Clinical presentations of rotavirus infection among hospitalized children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 21:221-227.
93. Steele AD, Van Niekerk MC, Mphahlele MJ. 1995. Geographic distribution of human rotavirus VP4 genotypes and VP7 serotypes in five South African regions. *J. Clin. Microbiol.* 33:1516-1519.
94. Svensson L, Sheshberadaran H, Vene S, Norrby E, Grandien M, Wadell G. 1987. Serum antibody responses to individual viral polypeptides in human rotavirus infections. *J. Gen. Virol.* 68:643-651.
95. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA 4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software versión 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24:1596-1599.
96. Taniguchi K, Morita Y, Urasawa T, Urasawa S. 1987. Cross-reactive epitopes on VP3 of human rotavirus: analysis with monoclonal antibodies and antigenic variants. *J. Virol.* 61:1726-1730.
97. Taniguchi K, Maloy WL, Nishikawa K, Green KY, Hoshino H, Urasawa S, Kapikian AZ, Chanock RM, Gorziglia M. 1988. Identification of cross-reactive and serotype 2-specific neutralization epitopes on VP3 of human rotavirus. *J. Virol.* 62:2421-2426.

98. Urasawa T, Taniguchi K, Kobayashi N, Mise K, Hasegawa A, Yamazi Y, Urasawa S. 1993. Nucleotide sequence of VP4 and VP7 genes of a unique human rotavirus strain Mc35 with subgroup I and serotype 10 specificity. *Virology*. 195:766-771.
99. Vesikari T, Karvonen A, Korhonen T, Espo M, Lebacqz E, Forster J, Zepp F, Delem A, and De Vos B. 2004. Safety and immunogenicity of RIX4414 live attenuated human rotavirus vaccine in adults, toddlers and previously uninfected infants. *Vaccine*. 22: 2836-2842.
100. Vesikari T, Ruuska T, Green KY, Flores J, and Kapikian AZ. 1992. Protective efficacy against serotype 1 rotavirus diarrhea by live oral rhesus-human reassortant rotavirus vaccines with human rotavirus VP7 serotype 1 or 2 specificity. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 11: 535-542.
101. Ward RL, Kirkwood CD, Sander DS, Smith, VE, Shao M, Bean JA, Sack DA Bernstein DI. 2006. Reductions in cross-neutralizing antibody responses in infants after attenuation of the human rotavirus vaccine candidate 89-12. *J. Infect. Dis.* 194:1729-1736.
102. Ward RL, Kapikian AZ, Goldberg KM, Knowlton DR, Watson MW, Rappaport R. 1996. Serum rotavirus neutralizing-antibody titers compared by plaque reduction and enzyme-linked immunosorbent assay-based neutralization assays. *J. Clin. Microbiol.* 34:983-985.
103. Ward RL, Knowlton DR, Greenberg HB, Schiff GM, Bernstein DI. 1990. Serum-neutralizing antibody to VP4 and VP7 proteins in infants following vaccination with WC3 bovine rotavirus. *J. Virol.* 64: 2687-2691.
104. Ward RL, McNeal MM, Sander DS, Greenberg HB, Bernstein, DI. 1993. Immunodominance of the VP4 neutralization protein of rotavirus in protective natural infections of young children. *J. Virol.* 67:464-468.
105. Wen L, Nakayama M, Yamanishi Y, Nishio O, Fang ZY, Nakagomi O, Araki K, Nishimura S, Hasegawa A, Müller WE, Ushijima H. 1997. Genetic variation in the VP7 Gene of Human Rotavirus Serotype 3 (G3 Type) Isolated in China and Japan. *Arch. Virol.* 142:1481-1489.

106. Wright PF, Tajima T, Thompson J, Kokubum K, Kapikian A, Karzon DT. 1987. Candidate rotavirus vaccine (rhesus rotavirus strain) in children: an evaluation. *Pediatrics*. 80: 473-480.
107. www.who.int/entity/mediacentre/news/releases/2009/rotavirus_vaccines. Global use of rotavirus vaccines recommended. 2009. WHO Weekly Epidemiological Record.
108. Zanardi LR, Haber P, Mootrey GT, Niu MT, Wharton M. 2001. Intussusception among recipients of rotavirus vaccine: reports to the vaccine adverse event reporting system. *Pediatrics*. 107: E97.

APENDICE I.

PROTOCOLOS Y SOLUCIONES

I. Preparación de soluciones para técnicas de cultivo celular.

- **Medio D-MEM:**

El medio de cultivo D-MEM (GIBCO Cat. 12491015) se compra en forma líquida y estéril. Este medio está listo para ser utilizado en el cultivo, sólo deberá de adicionarse por cada 100 ml de D-MEM, 1 ml de L-Glutamina 200mM (GIBCO Cat. 25030-081) y 3 ml de suero fetal de bovino (GIBCO Cat. 16000-036). El medio de cultivo se almacena a 4°C.

- **Medio MEM:**

El medio de cultivo MEM (GIBCO Cat. 11090081) se compra en forma líquida y estéril. Este medio requiere antes de utilizarse, de adicionarle por cada 100 ml de MEM: 1 ml de L-Glutamina 200mM y 1 ml de HEPES 1M (GIBCO Cat. 15630-080).

- **Solución Amortiguadora de Fosfatos A 10X (PBS A):**

NaCl	8 gr
KCl	0.2 gr
KH ₂ PO ₄	0.2 gr
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	1.44 gr (ó 1.15 gr si es anhidro)

Aforar a 100 ml con agua bidestilada. La solución de trabajo es PBA A 1X.

- **EDTA 0.68 mM:**

Pesar 0.2 gr de EDTA (sal disódica) y disolverlos en 900 ml de agua bidestilada. Adicionar 100 ml de PBS A 10X. Se esteriliza en autoclave y se almacena a 4°C.

- **Tripsina 1%:**

La enzima tripsina para activar la cepas de rotavirus, se prepara a partir de una tripsina 2.5% (GIBCO Cat. 15090-046), diluyendo el reactivo con PBS A 1X. Dispensar en alícuotas de 20 µl, para evitar la congelación-descongelación. Las alícuotas se almacenan a -20°C.

- **Sustrato carbazol para tinción con inmunoperoxidasa:**

Preparar el sustrato para la enzima peroxidasa de rábano, mezclando en el siguiente orden los reactivos: 4.0 ml de buffer de acetatos 0.05M pH 5, 10 µl de peróxido de hidrógeno 30% y 1.5 ml de carbazol (4 mg/ml). Filtrar la mezcla con filtros de 0.45 micras, de preferencia utilizando guantes, ya que el Carbazol es tóxico.

- **Carbazole 4 mg/ml:**

Preparar 20 ml de esta solución, pesando 80 mg de Carbazol (Sigma-Aldrich Cat. A5754-10G) y disolver en 20 ml de N,N-Dimetilformamida (Sigma-Aldrich Cat. D4551-250ML). Proteger el frasco de la luz y almacenar la solución a 4°C. Realizar la preparación del reactivo con guantes.

II. Gel de poliacrilamida 10% y reactivos para tinción con Nitrato de plata.

- **Gel de poliacrilamida 10%:**

Acrilamida-Bisacrilamida 30% (relación 29:1)	2.0 ml
Tris-HCl 2M pH 8.8	1.02 ml
Agua bidestilada	2.98 ml
Agitar suavemente	
Persulfato de Amonio 10%	120 μ l
TEMED	10 μ l

El volumen final es de aproximadamente 5 ml, suficiente para preparar un gel de 8X10 cm.

- **Solución Fijadora:**

Alcohol etílico absoluto	10 ml
Acido acético	0.5 ml

Aforar con agua bidestilada a 100 ml.

- **Solución de Nitrato de plata 100X:**

Nitrato de plata	5.5 g
------------------	-------

Disolver en 20 ml de agua bidestilada y aforar a un volumen final de 30 ml. Proteger la solución de la luz y almacenar a 4°C. La solución de trabajo 1X, se prepara disolviendo 1 ml de la solución 100X en 99 ml de agua bidestilada.

- **Solución Reveladora:**

Hidróxido de sodio 10M	7.5 ml
Formaldehído	1.5 ml

Aforar con agua bidestilada a 100 ml.

III. Purificación de producto PCR/Kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System.

1. Añadir 10 μ l de solución Membrane Binding por cada 10 mg de peso del fragmento de gel.
2. Agitar un instante en vortex.
3. Introducir el tubo eppendorf en un baño de agua con una temperatura entre 55-60°C durante 10 min para disolver la agarosa y liberar el fragmento de DNA.
4. Cada 2 minutos, retirar el tubo del baño de agua, agitar un instante en vortex y regresarlo nuevamente al baño de agua.
5. En seguida añadir todo el volumen licuado a una columna de purificación SV.
6. Incubar 1 minuto a temperatura ambiente.
7. Centrifugar la columna SV a 14,000 rpm por un minuto.
8. Retirar la columna SV del tubo colector para desechar el sobrenadante, y volver a colocar la columna en el tubo colector.
9. Añadir 700 μ l de Solución Wash (solución de lavado).
10. Centrifugar a 14,000 rpm por un minuto.
11. Retirar la columna SV del tubo colector para desechar el sobrenadante, y volver a colocar la columna en el tubo colector.
12. Añadir 500 μ l de Solución Wash.
13. Centrifugar a 14,000 rpm por 8 minutos.
14. Transferir la columna SV a un tubo eppendorf de 1.5 ml limpio y añadir 25 μ l de agua nanopura para eluir el DNA purificado.
15. Incubar 1 minuto a temperatura ambiente.
16. Centrifugar a 14,000 rpm por un minuto.
17. Retirar la columna SV y almacenar el producto de PCR a -20°C hasta su uso.

IV. Purificación de plásmidos/Kit Wizard[®] plus SV Minipreps DNA Purification System.

1. Tomar en condiciones estériles 2 ml de cultivo de bacterias y dispensar en alícuotas de 1 ml en tubos de microcentrifuga de 1.5 ml.
2. Centrifugar los tubos a 8,000 rpm por 5 minutos.
3. Decantar el medio de cultivo y resuspender el pellet de bacterias con 250 μ l de solución para resuspender células (Cell resuspension solution). Utilizar el mismo volumen de buffer para resuspender el pellet de bacterias del tubo No. 2.
4. Añadir 250 μ l de solución de lisis (Cell Lysis solution).
5. Mezclar por inversión suavemente 4 veces.
6. Añadir 10 μ l de enzima Proteasa alcalina (Alkaline Protease Solution).
7. Mezclar por inversión suavemente 4 veces.
8. Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.
9. Añadir 350 μ l de solución neutralizante (Neutralization solution).
10. Mezclar por inversión suavemente 4 veces.
11. Centrifugar los tubos a 14,000 rpm por 10 minutos.
12. Insertar una columna de purificación SV en un tubo colector, transferir el sobrenadante del tubo de microcentrifuga, a la columna.
13. Centrifugar la columna SV+tubo colector a 14,000 rpm por 1 minuto.
14. Quitar la columna SV del tubo colector para desechar el sobrenadante, volver a insertar la columna SV y añadir 750 μ l de solución de lavado (Wash solution). Repetir esta operación cada vez que se adicione una solución a la columna.
15. Centrifugar la columna SV+tubo colector a 14,000 rpm por 1 minuto.
16. Desechar el sobrenadante y añadir 250 μ l de solución de lavado.
17. Centrifugar la columna SV+tubo colector a 14,000 rpm por 2 minutos (se recomienda que se realice la centrifugación sin la tapa de la microcentrifuga, para permitir que se evapore bien el alcohol de la solución de lavado, y la matriz de la columna SV quede bien seca).
18. Retirar la columna SV del tubo colector e introducirla en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml limpio previamente etiquetado.
19. Añadir 50 μ l de agua libre de nucleasas (Nuclease-Free water). La gota de agua debe caer en el centro de la matriz, para asegurar una buena recuperación de plásmido eluído.
20. Centrifugar la columna SV+tubo de microcentrifuga a 14,000 rpm por 1 minuto.
21. Retirar la columna SV y almacenar el plásmido purificado a -20°C hasta su uso.

V. Protocolo para preparar bacterias calcio competentes.

1. Picar una colonia de bacterias o bien tomar 15 μ l de un cultivo de bacterias (*E. coli* DH5 α y/o BL21(DE3)) y sembrarla en 3 ml de caldo LB sin antibióticos.
2. Incubar toda la noche a 37°C con agitación de 200 rpm.
3. Preparar 50 ml de caldo LB y esterilizar a 121°C/15 lb por 15 minutos.
4. Adicionar al caldo LB, MgSO₄ a una concentración final de 20 mM (Mezclar 45 ml de caldo LB estéril con 5 ml de MgSO₄ 200mM) y atemperar a 37°C antes de usarlo.
5. Inocular el matraz con caldo LB-MgSO₄ con 500 μ l de cultivo de bacterias para realizar una dilución 1:100.
6. Incubar a 37°C con agitación de 250 rpm hasta obtener un crecimiento bacteriano con una densidad óptica entre 0.4-0.6 de absorbancia.
7. El monitoreo de la absorbancia del cultivo, se realiza tomando una alícuota de 1 ml del cultivo de bacterias cada 30 minutos, a 590 nm.
8. Cuando el cultivo llega a la densidad esperada, suspender la incubación y transferir las bacterias a un tubo de centrifuga de 50 ml.
9. Centrifugar a 5,000 rpm/4°C por 5 minutos.
10. Introducir el tubo centrifugado en hielo y mantenerlo en este, el resto del procedimiento.
11. Retirar el sobrenadante y resuspender el pellet de bacterias muy suavemente con 10 ml de buffer de transformación (TFB I) frío.
12. Incubar las bacterias en hielo por 5 minutos.
13. Centrifugar a 5,000 rpm/4°C por 5 minutos.
14. Retirar el sobrenadante y resuspender las bacterias en 2 ml de buffer de transformación (TFB II) frío.
15. Incubar 30 minutos en hielo.
16. Preparar alícuotas de 250 μ l en tubos de microcentrifuga de 1.5 ml estériles (previamente atemperados en hielo).
17. Almacenar las bacterias calcio competentes a -70°C.

Recomendaciones:

- Los reactivos (TFB I y TFB II) y el material (tubos de microcentrifuga y puntillas) deben atemperarse en frío antes de utilizarse.
- Esterilizar el MgSO₄ por filtración, ya que precipita con el calor. Almacenar a 4°C.

Preparación de reactivos:

- **Buffer de transformación I:**

Acetato de potasio (KOac)	1.47 gr (30 mM)
CaCl ₂	0.55 gr (10 mM)
MnCl ₂	4.04 gr (50 mM)
KCl	3.73 gr (100 mM)
Glicerol	75 ml (15%)

Ajustar el pH con ácido acético a 5.8 y aforar a 500 ml. Esterilizar con filtros de 0.45 micras y almacenar a 4°C.

- **Buffer de transformación II:**

MOPS	1.04 gr (10 mM)
CaCl ₂	4.16 gr (75 mM)
KCl	0.37 gr (10 mM)
Glicerol	75 ml (15%)

Disolver en 500 ml de agua bidestilada. Esterilizar con filtros de 0.45 micras y almacenar a 4°C.

VI. Gel de poliacrilamida y reactivos para electroforesis de proteínas.

- **Gel de poliacrilamida 4% (gel concentrador):**

Acrilamida-Bis acrilamida 30% (Relación 29:1)	0.5 ml
Tris-HCl 1 M pH 6.8	0.37 ml
SDS 10%	30 μ l
Agua bidestilada	2.02 ml
Agitar suavemente	
Persulfato de Amonio 10%	50 μ l
TEMED	5 μ l
Volumen final	3 ml

- **Gel de poliacrilamida 11% (gel separador):**

Acrilamida-Bis acrilamida 30% (Relación 29:1)	1.83 ml
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	1.25 ml
SDS 10%	50 μ l
Agua bidestilada	1.82 ml
Agitar suavemente	
Persulfato de Amonio 10%	100 μ l
TEMED	10 μ l
Volumen final	5 ml

- **Buffer de corrimiento SDS-PAGE 10X:**

Tris base	6 gr	(25 mM)
Glicina	28.8 gr	(192 mM)
SDS	2 gr	(0.1%)

Diluir los reactivos en 200 ml de agua bidestilada y almacenar a temperatura ambiente. La solución de trabajo será de 1X.

- **Buffer carga:**

Tris-HCl 1 M pH 6.8	0.6 ml
Glicerol 50%	5 ml
SDS 10%	2 ml
2-Mercaptoetanol	0.5 ml
Azul de Bromofenol 1%	1.0 ml
Agua bidestilada	0.9 ml
Volumen final	10 ml

Almacenar esta solución a 4°C. Mezclar las proteínas con el buffer carga en una relación 3:1 respectivamente.

- **Azul de Coomassie:**

Pesar 1 gr azul de Coomassie y disolver en 450 ml de metanol absoluto mezclando 1 hora, en seguida adicionar 450 ml agua bidestilada y seguir mezclando otra hora. Finalmente adicionar 100 ml de ácido acético. Almacenar la solución a temperatura ambiente.

VII. Reactivos para purificación de proteínas.

Todos los reactivos utilizados en la purificación de proteínas, serán ajustados a un pH de 7.4 con ácido clorhídrico y serán filtrados con filtros de 0.45 micras.

- **Buffer B1:**

Na ₂ HPO ₄	0.28 gr (20 mM)
NaCl	2.92 gr (500 mM)
Imidazol	0.13 gr (20 mM)

Aforar a 100 ml

- **Buffer B2:**

Na ₂ HPO ₄	0.28 gr (20 mM)
NaCl	2.92 gr (500 mM)
Imidazol	0.13 gr (20 mM)
Urea	24 gr (4M)

Aforar a 100 ml

- **Buffer B3:**

Na ₂ HPO ₄	0.28 gr (20 mM)
NaCl	2.92 gr (500 mM)
Imidazol	0.40 gr (60 mM)
Urea	24 gr (4M)

Aforar a 100 ml

- **Buffer de elución:**

Na ₂ HPO ₄	0.28 gr (20 mM)
NaCl	2.92 gr (500 mM)
Imidazol	2.04 gr (300 mM)
Urea	24 gr (4M)

Aforar a 100 ml

VIII. Reactivos para ensayos de ELISA y Western blot.

- **Buffer de transferencia:**

Tris base 3 gr

Glicina 14.4 gr

Disolver en 800 ml de agua bidestilada, y después adicionar 200 ml de metanol absoluto.

- **Solución amortiguadora de fosfatos (PBS):**

Preparar las siguientes 3 soluciones por separado:

PBS A 10X

NaCl 8 gr

KCl 0.2 gr

KH₂PO₄ 0.2 gr

Na₂HPO₄·2H₂O 1.44 gr (ó 1.15 gr si es anhidro)

Aforar a 100 ml con agua bidestilada.

PBS B 10X

CaCl₂ 0.1 gr

Aforar a 100 ml con agua bidestilada.

PBS C 10X

MgCl₂ 0.1 gr (ó 1.88 gr si tiene 6H₂O)

Aforar a 100 ml con agua bidestilada.

Mezclar en 70 ml de agua bidestilada, 10 ml de las soluciones A, B y C, en este orden. Si el orden no se respeta, precipitan los fosfatos y la solución queda turbia.

- **Buffer carbonato-bicarbonato pH 9.6:**

Na₂CO₃ 0.52 gr (50 mM)

NaHCO₃ 0.42 gr (50 mM)

Ajustar el pH a 9.6 con ácido clorhídrico y aforar a 100 ml con agua bidestilada.

- **Buffer TBS-Tween 0.05%:**

Tris-base 1.21 gr (20 mM)

NaCl 4.38 gr (150 mM)

Ajustar el pH a 7.5 con ácido clorhídrico y aforar a 500 ml con agua bidestilada. En seguida adicionar el Tween 20.

APENDICE II.

**SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS/AMINOÁCIDOS DE LA
SUBUNIDAD VP8* DE LA PROTEÍNA VP4 DE CEPAS DE
ROTAVIRUS AISLADAS DE NIÑOS CON GASTROENTERITIS**

LOCUS FJ665385 762 bp RNA linear VRL 28-FEB-2009
 DEFINITION Human rotavirus A isolate MX07-531 outer capsid protein VP8* subunit (VP4) gene, partial cds.
 ACCESSION FJ665385
 SOURCE Human rotavirus A
 ORGANISM Human rotavirus A
 Viruses; dsRNA viruses; Reoviridae; Sedoreovirinae; Rotavirus; Rotavirus A.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 762)
 AUTHORS Contreras,J.F., Infante-Ramirez,R., Menchaca,G.E., Arriaga,J.P., Gonzalez,G., Rodriguez,C., Erosa-de la Vega,G. and Tamez,R.S.
 TITLE P[8] genotype analysis of rotavirus strains isolated from children in two cities of North of Mexico
 JOURNAL Unpublished
 AUTHORS Contreras,J.F., Infante-Ramirez,R., Menchaca,G.E., Arriaga,J.P., Gonzalez,G., Rodriguez,C., Erosa-de la Vega,G. and Tamez,R.S.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (26-JAN-2009) Facultad de Ciencias Biologicas, Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Pedro de Alba S/N, San Nicolas de los Garza, Nuevo Leon 66451, Mexico
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..762
 /organism="Human rotavirus A"
 /mol_type="genomic RNA"
 /isolate="MX07-531"
 /host="Homo sapiens"
 /db_xref="taxon:10941"
 /country="Mexico"
 /collection_date="22-Jan-2007"
 /note="genotype: P[8]G1"
 gene 10..>762
 /gene="VP4"
 CDS 10..>762
 /gene="VP4"
 /codon_start=1
 /product="outer capsid protein VP8* subunit"
 /protein_id="ACN29989.1"
 /db_xref="GI:223953521"
 /translation="MASLIYRQLLTNSYSVDLYDEIEQIGSEKTQNVNTINPGPFAQTR YAPVNWGHGEINDSTTVEPILDGPYQPTTFTPTDYWILINSNTNGVVYESTNNSDFW TAVIAVEPHVDPVNRQYNVFGENKQFNVRNDSKWKFLMFRGSSQNDFYNRRTLSD TRLVGILKYGGRIWTFHGGETPRATTDSSNTANLNGISITIHSEFYIIPRSQESKNEY INNGLPPIQNTRNVVPLSLSSRSIQYTRAQVNE"

ORIGIN
 1 ggctataaaa tggcttcact catttataga cagcttctca ctaattcata ttcagtagat
 61 ttatatgatg aaatagagca aattggatca gaaaaaactc aaaatgtaac tataaatcca
 121 ggtccatttg ctcaaacaag atatgctcca gtcaattggg gtcattggaga aataaatgat
 181 tcaaccacag tggaaaccaat ttagatgggt ccttatcaac caactacatt tacaccacct
 241 actgattact ggatacttat taattcaaat acaaatggag tagtatacga gagtacaat
 301 aatagtgact tttggactgc agtcattgct gttgaaccgc acgctgatcc agtaaataga
 361 caatataatg tatttgggta aaataaacia tttaatgtaa gaaatgattc agataaatgg
 421 aagtttttag aaatgttttag aggcagtagt caaaatgact tttataatag acgtacacta
 481 acttctgata ctagactcgt aggaatatta aaatatgggt gaagaatag gacatttcat
 541 ggtgaaacac cgagggtac taccgatagc tcaaacactg caaatttgaa cggtatatca
 601 attacaattc attcagaatt ttatattatt ccaaggtccc aagagtctaa gtgtaaatgaa
 661 tatattaaca acggtctacc accaattcaa aatactagaa atgtagtacc attatcatta
 721 tcacttagat ctatacagta tacgagagca caagttaatg aa

LOCUS FJ665386 762 bp RNA linear VRL 28-FEB-2009
 DEFINITION Human rotavirus A isolate MX07-532 outer capsid protein VP8* subunit gene, partial cds.
 ACCESSION FJ665386
 VERSION FJ665386.1 GI:223953522
 KEYWORDS .
 SOURCE Human rotavirus A
 ORGANISM Human rotavirus A
 Viruses; dsRNA viruses; Reoviridae; Sedoreovirinae; Rotavirus; Rotavirus A.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 762)
 AUTHORS Contreras,J.F., Infante-Ramirez,R., Menchaca,G.E., Arriaga,J.P., Gonzalez,G., Rodriguez,C., Erosa-de la Vega,G. and Tamez,R.S.
 TITLE P[8] genotype analysis of rotavirus strains isolated from children in two cities of North of Mexico
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 762)
 AUTHORS Contreras,J.F., Infante-Ramirez,R., Menchaca,G.E., Arriaga,J.P., Gonzalez,G., Rodriguez,C., Erosa-de la Vega,G. and Tamez,R.S.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (27-JAN-2009) Facultad de Ciencias Biologicas, Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Pedro de Alba S/N, San Nicolas de los Garza, Nuevo Leon 66451, Mexico
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..762
 /organism="Human rotavirus A"
 /mol_type="genomic RNA"
 /isolate="MX07-532"
 /host="Homo sapiens"
 /db_xref="taxon:10941"
 /country="Mexico"
 /collection_date="07-Jan-2007"
 /note="genotype: P[8]G1"
 CDS 10..>762
 /codon_start=1
 /product="outer capsid protein VP8* subunit"
 /protein_id="ACN29990.1"
 /db_xref="GI:223953523"
 /translation="MASLIYRQLLTNSYSVDLYDEIEQIGSEKTQNVTTINPFPFAQTR YAPVNWGHGEINDSTTVEPILDGPYQPTTFTPTDYWILINSNTNGVVYESTNNSDFW TAVIAVEPHVDPVNRQYNVFGENKQFNVRNDSKWKFLMFRGSSQNDFYNRRTLSTL TRLVGILKYGGRIWTFHGETPRATTDSSNTANLNGISITIHSEFYIIPRSQESKNEY INNGLPPIQNTRNVVPLSLSSRSIQYTRAQVNE"
 ORIGIN
 1 ggctataaaa tggcttcact catttataga cagcttctca ctaattcata ttcagtagat
 61 ttatatgatg aaatagagca aattggatca gaaaaaactc aaaatgtaac tataaatcca
 121 ggtccatttg ctcaaacaag atatgctcca gtcaattggg gtcattggaga aataaatgat
 181 tcaaccacag tggaaaccaat ttagatgggt ccttatcaac caactacatt tacaccacct
 241 actgattact ggatacttat taattcaaat acaaatggag tagtatacga gagtacaat
 301 aatagtgact tttggactgc agtcattgct gttgaaccgc acgctgatcc agtaaataga
 361 caatataatg tatttgggta aaataaacia tttaatgtaa gaaatgattc agataaatgg
 421 aagtttttag aaatgttttag aggcagtagt caaaatgact tttataatag acgtacacta
 481 acttctgata ctagactcgt aggaatatta aaatatgggt gaagaatag gacatttcat
 541 ggtgaaacac cgagggctac taccgatagc tcaaacactg caaatttgaa cggtatatca
 601 attacaattc attcagaatt ttatattatt ccaaggtccc aagagtctaa gtgtaaatgaa
 661 tatattaaca acggtctacc accaattcaa aatactagaa atgtagtacc attatcatta
 721 tcacttagat ctatacagta tacgagagca caagttaatg aa

LOCUS FJ665387 762 bp RNA linear VRL 28-FEB-2009
 DEFINITION Human rotavirus A isolate MX07-554 outer capsid protein VP8*
 subunit gene, partial cds.
 ACCESSION FJ665387
 VERSION FJ665387.1 GI:223953524
 KEYWORDS .
 SOURCE Human rotavirus A
 ORGANISM Human rotavirus A
 Viruses; dsRNA viruses; Reoviridae; Sedoreovirinae; Rotavirus;
 Rotavirus A.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 762)
 AUTHORS Contreras,J.F., Infante-Ramirez,R., Menchaca,G.E., Arriaga,J.P.,
 Gonzalez,G., Rodriguez,C., Erosa-de la Vega,G. and Tamez,R.S.
 TITLE P[8] genotype analysis of rotavirus strains isolated from children
 in two cities of North of Mexico
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 762)
 AUTHORS Contreras,J.F., Infante-Ramirez,R., Menchaca,G.E., Arriaga,J.P.,
 Gonzalez,G., Rodriguez,C., Erosa-de la Vega,G. and Tamez,R.S.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (27-JAN-2009) Facultad de Ciencias Biologicas,
 Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Pedro de Alba S/N, San Nicolas
 de los Garza, Nuevo Leon 66451, Mexico
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..762
 /organism="Human rotavirus A"
 /mol_type="genomic RNA"
 /isolate="MX07-554"
 /host="Homo sapiens"
 /db_xref="taxon:10941"
 /country="Mexico"
 /collection_date="13-Feb-2007"
 /note="genotype: P[8]G1"
 CDS 10..>762
 /codon_start=1
 /product="outer capsid protein VP8* subunit"
 /protein_id="ACN29991.1"
 /db_xref="GI:223953525"
 /translation="MASLIYRQLLTNSYSVDLYDEIEQIGSEKTQNVTTINPGPFAQTR
 YAPVNWGHGEINDSTTVEPILDGPYQPTTFTPTDYWILINSNTNGVVYESTNNSDFW
 TAVIAVEPHVDPVNRQYNVFGENKQFNVRNDSKWKFLMFRGSSQNDFYNRRTLSTSD
 TRLVGILKYGGRIWTFHGETPRATTDSSNTANLNGISITIHSEFYIIPRSQESKNEY
 INNGLPPIQNTRNVVPLSLSSRSIQYTRAQVNE"
 ORIGIN
 1 ggctataaaa tggcttcact catttataga cagcttctca ctaattcata ttcagtagat
 61 ttatatgatg aaatagagca aattggatca gaaaaaactc aaaatgtaac tataaatcca
 121 ggtccatttg ctcaaacaag atatgctcca gtcaattggg gtcattggaga aataaatgat
 181 tcaaccacag tggaaaccaat ttagatgggt ccttatcaac caactacatt tacaccacct
 241 actgattact ggatacttat taattcaaat acaaatggag tagtatacga gagtacaat
 301 aatagtgact tttggactgc agtcattgct gttgaaccgc acgctgatcc agtaaataga
 361 caatataatg tatttgggta aaataaacia tttaatgtaa gaaatgattc agataaatgg
 421 aagtttttag aatgttttag aggcagtagt caaaatgact tttataatag acgtacacta
 481 acttctgata ctagactcgt aggaatatta aaatatgggt gaagaatag gacatttcat
 541 ggtgaaacac cgagggtac taccgatagc tcaaacactg caaatttgaa cggtatatca
 601 attacaattc attcagaatt ttatattatt ccaaggtccc aagagtctaa gtgtaaatgaa
 661 tatattaaca acggtctacc accaattcaa aatactagaa atgtagtacc attatcatta
 721 tcacttagat ctatacagta tacgagagca caagttaatg aa

LOCUS FJ665388 762 bp RNA linear VRL 28-FEB-2009
 DEFINITION Human rotavirus A isolate MX07-555 outer capsid protein VP8* subunit gene, partial cds.
 ACCESSION FJ665388
 VERSION FJ665388.1 GI:223953526
 KEYWORDS .
 SOURCE Human rotavirus A
 ORGANISM Human rotavirus A
 Viruses; dsRNA viruses; Reoviridae; Sedoreovirinae; Rotavirus; Rotavirus A.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 762)
 AUTHORS Contreras,J.F., Infante-Ramirez,R., Menchaca,G.E., Arriaga,J.P., Gonzalez,G., Rodriguez,C., Erosa-de la Vega,G. and Tamez,R.S.
 TITLE P[8] genotype analysis of rotavirus strains isolated from children in two cities of North of Mexico
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 762)
 AUTHORS Contreras,J.F., Infante-Ramirez,R., Menchaca,G.E., Arriaga,J.P., Gonzalez,G., Rodriguez,C., Erosa-de la Vega,G. and Tamez,R.S.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (27-JAN-2009) Facultad de Ciencias Biologicas, Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Pedro de Alba S/N, San Nicolas de los Garza, Nuevo Leon 66451, Mexico
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..762
 /organism="Human rotavirus A"
 /mol_type="genomic RNA"
 /isolate="MX07-555"
 /host="Homo sapiens"
 /db_xref="taxon:10941"
 /country="Mexico"
 /collection_date="13-Feb-2007"
 /note="genotype: P[8]G1"
 CDS 10..>762
 /codon_start=1
 /product="outer capsid protein VP8* subunit"
 /protein_id="ACN29992.1"
 /db_xref="GI:223953527"
 /translation="MASLIYRQLLTNSYSVDLYDEIEQIGSEKTQNVTVNPGPFAQTR YAPVNWGHGEINDSTTVEPILDGPYQPTTFTPTDYWILINSNTNGVVYESTNNSDFW TAVIAVEPHVDPVNRQYNVFGENKQFNVRNDSKWKFLEMFRGSSQNDFYNRRTLSD TRLVGILKYGGRIWTFHGETPRATTDSSNTANLNGISITIHSEFYIIPRSQESKNEY INNGLPPIQNTRNVVPLSLSSRSIQYTRAQVNE"
 ORIGIN
 1 ggctataaaa tggcttcact catttataga cagcttctca ctaattcata ttcagtagat
 61 ttatatgatg aaatagagca aattggatca gaaaaaactc aaaatgtaac tgtaaatacca
 121 ggtccatttg ctcaaacaag atatgctcca gtcaattggg gtcattggaga aataaatgat
 181 tcaaccacag tggaaaccaat ttagatgggt ccttatcaac caactacatt tacaccacct
 241 actgattact ggatacttat taattcaaat acaaatggag tagtatacga gagtacaat
 301 aatagtgact tttggactgc agtcattgct gttgaaccgc acgctgatcc agtaaataga
 361 caatataatg tatttgggta aaataaacia tttaatgtaa gaaatgattc agataaatgg
 421 aagtttttag aaatgttttag aggtagtagt caaaatgact tttataatag acgtacacta
 481 acttctgata ctagactcgt aggaatatta aaatatgggtg gaagaatag gacatttcat
 541 ggtgaaacac cgagggtac taccgatagc tcaaacactg caaatttgaa cggtatatca
 601 attacaattc attcagaatt ttatattatt ccaaggtccc aagagtctaa gtgtaaatgaa
 661 tatattaaca acggtctacc accaattcaa aatactagaa atgtagtacc attatcatta
 721 tcacttagat ctatacagta tacgagagca caagttaatg aa

LOCUS FJ665389 762 bp RNA linear VRL 28-FEB-2009
 DEFINITION Human rotavirus A isolate MX07-557 outer capsid protein VP8* subunit gene, partial cds.
 ACCESSION FJ665389
 VERSION FJ665389.1 GI:223953528
 KEYWORDS .
 SOURCE Human rotavirus A
 ORGANISM Human rotavirus A
 Viruses; dsRNA viruses; Reoviridae; Sedoreovirinae; Rotavirus; Rotavirus A.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 762)
 AUTHORS Contreras,J.F., Infante-Ramirez,R., Menchaca,G.E., Arriaga,J.P., Gonzalez,G., Rodriguez,C., Erosa-de la Vega,G. and Tamez,R.S.
 TITLE P[8] genotype analysis of rotavirus strains isolated from children in two cities of North of Mexico
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 762)
 AUTHORS Contreras,J.F., Infante-Ramirez,R., Menchaca,G.E., Arriaga,J.P., Gonzalez,G., Rodriguez,C., Erosa-de la Vega,G. and Tamez,R.S.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (27-JAN-2009) Facultad de Ciencias Biologicas, Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Pedro de Alba S/N, San Nicolas de los Garza, Nuevo Leon 66451, Mexico
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..762
 /organism="Human rotavirus A"
 /mol_type="genomic RNA"
 /isolate="MX07-557"
 /host="Homo sapiens"
 /db_xref="taxon:10941"
 /country="Mexico"
 /collection_date="14-Feb-2007"
 /note="genotype: P[8]G1"
 CDS 10..>762
 /codon_start=1
 /product="outer capsid protein VP8* subunit"
 /protein_id="ACN29993.1"
 /db_xref="GI:223953529"
 /translation="MASLIYRQLLTNSYSVDLYDEIEQIGSEKTQNVTVNPGPFAQTR YAPVNWGHGEINDSTTVEPILDGPYQPTTFTPPSDYWILINSNTNGVVYESTNNSDFW TAVIAVEPHVDPVDRQYNVFGENKQFNVRNDSKWKFLMFRGSSQNDFYNRRTLSTL TRLVGILKYGGRIWTFHGETPRATTDSSNTANLNGISITIHSEFYIIPRSQESKNEY INNGLPPIQNTRNVVPLSLSSRSIQYKRAQVNE"
 ORIGIN
 1 ggctataaaa tggcttcact catttataga cagcttctca ctaattcata ttcagtagat
 61 ttatatgatg aaatagagca aattggatca gaaaaaactc aaaatgtaac cgtaaatacca
 121 ggtccatttg ctcaaacaag atatgctcca gtcaattggg gtcattggaga gataaatgat
 181 tcaaccacag tggaaaccaat ctagatgggt ccctatcaac ctactacatt tacaccacct
 241 tctgattact ggatacttat taactcaaat acaaatggag tagtatacga gagtacaat
 301 aatagtgact tttggactgc agttattgct gttgaaccgc acgtcgatcc agtagataga
 361 caatataatg tatttgggta aaataaacia tttaatgtaa gaaatgattc agataaatgg
 421 aagtttttag aaatgttttag aggcagtagt caaaatgact tttataatag acgtacacta
 481 acttctgata ctagactcgt gggaatatta aaatatgggt gaagaatag gacatttcat
 541 ggtgaaacac cgagggctac tactgatagc tcaaacactg caaatthtaa cggtatatca
 601 attacaattc attcagaatt ttatattatt ccaaggtctc aagagtctaa gtgcaatgaa
 661 tatattaaca atggctctacc accaattcaa aataactagaa atgtagtacc attatcatta
 721 tcgtctagat ctatacagta taagagagca caagttaatg aa

LOCUS FJ665390 762 bp RNA linear VRL 28-FEB-2009
 DEFINITION Human rotavirus A isolate MX08-659 outer capsid protein VP8*
 subunit (VP4) gene, partial cds.
 ACCESSION FJ665390
 SOURCE Human rotavirus A
 ORGANISM Human rotavirus A
 Viruses; dsRNA viruses; Reoviridae; Sedoreovirinae; Rotavirus;
 Rotavirus A.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 762)
 AUTHORS Contreras,J.F., Infante-Ramirez,R., Menchaca,G.E., Arriaga,J.P.,
 Gonzalez,G., Rodriguez,C., Erosa-de la Vega,G. and Tamez,R.S.
 TITLE P[8] genotype analysis of rotavirus strains isolated from children
 in two cities of North of Mexico
 JOURNAL Unpublished
 AUTHORS Contreras,J.F., Infante-Ramirez,R., Menchaca,G.E., Arriaga,J.P.,
 Gonzalez,G., Rodriguez,C., Erosa-de la Vega,G. and Tamez,R.S.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (28-JAN-2009) Facultad de Ciencias Biologicas,
 Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Pedro de Alba S/N, San Nicolas
 de los Garza, Nuevo Leon 66451, Mexico
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..762
 /organism="Human rotavirus A"
 /mol_type="genomic RNA"
 /isolate="MX08-659"
 /host="Homo sapiens"
 /db_xref="taxon:10941"
 /country="Mexico"
 /collection_date="19-Mar-2008"
 /note="genotype: P[8]G1"
 gene 10..>762
 /gene="VP4"
 CDS 10..>762
 /gene="VP4"
 /codon_start=1
 /product="outer capsid protein VP8* subunit"
 /protein_id="ACN29994.1"
 /db_xref="GI:223953531"
 /translation="MASLIYRQLLTNSYSVDLYDEIEQIGSEKTQNVTVNPGPFAQTR
 YAPVNWGHGEINDSTTVEPILDGPYQPTTFTPPSDYWILINSNTNGVVYESTNNSDFW
 TAVIAVEPHVDPVDRQYNVFGENKQFNVRNDSKWKFLMFRGSSQNDFYNRRTLSD
 TRLVGILKYGGRIWTFHGETPRATTDSSNTANLNGISITIHSEFYIIPRSQESKNEY
 INNGLPPIQNTRNVVPLSLSSRSIQYKRAQVNE"
 ORIGIN
 1 ggctataaaa tggcttcact catttataga cagcttctca ctaattcata ttcagtagat
 61 ttatatgatg aaatagagca aattggatca gaaaaaactc aaaatgtaac cgtaaatacca
 121 ggtccatttg ctcaaacaag atatgctcca gtcaattggg gtcattggaga gataaatgat
 181 tcaaccacag tggaaaccaat ctagatgggt ccctatcaac ctactacatt tacaccacct
 241 tctgattact ggatacttat taactcaaat acaaatggag tagtatacga gagtacaat
 301 aatagtgact tttggactgc agttattgct gttgaaccgc acgctgatcc agtagataga
 361 caatataatg tatttgggtga aaataaaciaa tttaatgtaa gaaatgattc agataaatgg
 421 aagtttttag aaatgttttag aggcagtagt caaaatgact tttataatag acgtacacta
 481 acttctgata ctagactcgt gggaatatta aaatatgggtg gaagaatatg gacatttcat
 541 ggtgaaacac cgagggctac tactgatagc tcaaacactg caaatttaaa cggtatatca
 601 attacaattc attcagaatt ttatattatt ccaaggtctc aagagtctaa gtgcaatgaa
 661 tatattaaca atggctctacc accaattcaa aataactagaa atgtagtacc attatcatta
 721 tcgtctagat ctatacagta taagagagca caagttaatg aa

LOCUS FJ665391 762 bp RNA linear VRL 28-FEB-2009
 DEFINITION Human rotavirus A isolate MX08-740 outer capsid protein VP8*
 subunit (VP4) gene, partial cds.
 ACCESSION FJ665391
 SOURCE Human rotavirus A
 ORGANISM Human rotavirus A
 Viruses; dsRNA viruses; Reoviridae; Sedoreovirinae; Rotavirus;
 Rotavirus A.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 762)
 AUTHORS Contreras,J.F., Infante-Ramirez,R., Menchaca,G.E., Arriaga,J.P.,
 Gonzalez,G., Rodriguez,C., Erosa-de la Vega,G. and Tamez,R.S.
 TITLE P[8] genotype analysis of rotavirus strains isolated from children
 in two cities of North of Mexico
 JOURNAL Unpublished
 AUTHORS Contreras,J.F., Infante-Ramirez,R., Menchaca,G.E., Arriaga,J.P.,
 Gonzalez,G., Rodriguez,C., Erosa-de la Vega,G. and Tamez,R.S.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (28-JAN-2009) Facultad de Ciencias Biologicas,
 Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Pedro de Alba S/N, San Nicolas
 de los Garza, Nuevo Leon 66451, Mexico
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..762
 /organism="Human rotavirus A"
 /mol_type="genomic RNA"
 /isolate="MX08-740"
 /host="Homo sapiens"
 /db_xref="taxon:10941"
 /country="Mexico"
 /collection_date="07-May-2008"
 /note="genotype: P[8]G1"
 gene 10..>762
 /gene="VP4"
 CDS 10..>762
 /gene="VP4"
 /codon_start=1
 /product="outer capsid protein VP8* subunit"
 /protein_id="ACN29995.1"
 /db_xref="GI:223953533"
 /translation="MASLIYRQLLTNSYSVDLYDEIEQIGSEKTQNVNTINPGPFAQTR
 YAPVNWGHGEINDSTTVEPILDGPYQPTTFTPTDYWILINSNTNGVVYESTNNSDFW
 TAVIAVEPHVDPVNRQYNVFGENKQFNVRNDSKWKFLMFRGSSQNDFYNRRLTSD
 TRLVGILKYGGRIWTFHGETPRATTDSSNTANLNGISITIHSEFYIIPRSQESKNEY
 INNGLPPIQNTRNVVPLSLSSRSIQYTRAQVNE"

ORIGIN
 1 ggctataaaa tggcttcact catttataga cagcttctca ctaattcata ttcagtagat
 61 ttatatgatg aaatagagca aattggatca gaaaaaactc aaaatgtaac tataaatcca
 121 ggtccatttg ctcaaacaag atatgctcca gtcaattggg gtcattggaga aataaatgat
 181 tcaaccacag tggaaaccaat ttagatgggt ccttatcaac caactacatt tacaccacct
 241 actgattact ggatacttat taattcaaat acaaatggag tagtatacga gagtacaat
 301 aatagtgact tttggactgc agtcattgct gttgaaccgc acgctgatcc agtaaataga
 361 caatataatg tatttgggtga aaataaacia tttaatgtaa gaaatgattc agataaatgg
 421 aagtttttag aaatgttttag aggcagtagt caaaatgact tttataatag acgtacacta
 481 acttctgata ctagactcgt aggaatatta aaatatgggt gaagaatag gacatttcat
 541 ggtgaaacac cgagggtac taccgatagc tcaaacactg caaatttgaa cggtatatca
 601 attacaattc attcagaatt ttatattatt ccaaggtccc aagagtctaa gtgtaatgaa
 661 tatattaaca acggtctacc accaattcaa aataactagaa atgtagtacc attatcatta
 721 tcacttagat ctatacagta tacgagagca caagttaatg aa

LOCUS HQ585864 762 bp RNA linear VRL 04-JAN-2011
 DEFINITION Human rotavirus A isolate MX08-674 outer capsid protein (VP4) gene, partial cds.
 ACCESSION HQ585864
 SOURCE Human rotavirus A
 ORGANISM Human rotavirus A
 Viruses; dsRNA viruses; Reoviridae; Sedoreovirinae; Rotavirus; Rotavirus A.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 762)
 AUTHORS Menchaca,G.E., Infante,R., Hernandez,C.E., Rodriguez,C., Tamez,R.S. and Contreras,J.F.
 TITLE Evidence of common epitopes in VP8* variable region of rotavirus strains with lineages P[8]-1 and P[8]-3
 JOURNAL Unpublished
 AUTHORS Menchaca,G.E., Infante,R., Hernandez,C.E., Rodriguez,C., Tamez,R.S. and Contreras,J.F.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (06-NOV-2010) Facultad de Ciencias Biologicas, Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Pedro de Alba S/N, San Nicolas de los Garza, Nuevo Leon 66451, Mexico
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..762
 /organism="Human rotavirus A"
 /mol_type="genomic RNA"
 /isolate="MX08-674"
 /host="Homo sapiens"
 /db_xref="taxon:10941"
 /country="Mexico"
 /collection_date="20-Mar-2008"
 /note="genotype: P[8]"
 gene 10..>762
 /gene="VP4"
 CDS 10..>762
 /gene="VP4"
 /codon_start=1
 /product="outer capsid protein"
 /protein_id="ADU54595.1"
 /db_xref="GI:315661172"
 /translation="MASLIYRQLLTNSYSVDLYDEIEIQIGSEKTQNVTVNPGPFAQTR
 YAPVNWGHGEINDSTTVEPILDGPYQPTTFTPPSDYWILINSNTNGVVYESTNNSDFW
 TAVIAVEPHVDPVDRQYNVFGENKQFNVRNDSKWKFLMFRGSSQNDFYNRRTLSD
 TRLVGILKYGGRIWTFHGETPRATTDSSNTANLNGISITIHSEFYIIPRSQESKNEY
 INNGLPPIQNTRNVVPLSLSSRSIQYKRAQVNE"
 ORIGIN
 1 ggctataaaa tggcttcact catttataga cagcttctca ctaattcata ttcagtagat
 61 ttatatgatg aaatagagca aattggatca gaaaaaactc aaaatgtaac cgtaaatacca
 121 ggtccatttg ctcaaacaag atatgctcca gtcaattggg gtcattggaga gataaatgat
 181 tcaaccacag tggaaaccaat ctagatgggt ccctatcaac ctactacatt tacaccacct
 241 tctgattact ggatacttat taactcaaat acaaatggag tagtatacga gagtacaat
 301 aatagtgact tttggactgc agttattgct gttgaaccgc acgctgatcc agtagataga
 361 caatataatg tatttgggtga aaataaacia tttaatgtaa gaaatgattc agataaatgg
 421 aagtttttag aaatgttttag aggcagtagt caaaatgact tttataatag acgtacacta
 481 acttctgata ctagactcgt gggaatatta aaatatgggtg gaagaatatg gacattttcat
 541 ggtgaaacac cgagggtctac tactgatagc tcaaacactg caaattttaa cggtatatca
 601 attacaattc attcagaatt ttatattatt ccaaggtctc aagagtctaa gtgcaatgaa
 661 tatattaaca atggctctacc accaattcaa aataactagaa atgtagtacc attatcatta
 721 tcgtctagat ctatacagta taagagagca caagttaatg aa

LOCUS HQ585865 762 bp RNA linear VRL 04-JAN-2011
 DEFINITION Human rotavirus A isolate MX08-680 outer capsid protein (VP4) gene,
 partial cds.
 ACCESSION HQ585865
 SOURCE Human rotavirus A
 ORGANISM Human rotavirus A
 Viruses; dsRNA viruses; Reoviridae; Sedoreovirinae; Rotavirus;
 Rotavirus A.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 762)
 AUTHORS Menchaca,G.E., Infante,R., Hernandez,C.E., Rodriguez,C., Tamez,R.S.
 and Contreras,J.F.
 TITLE Evidence of common epitopes in VP8* variable region of rotavirus
 strains with lineages P[8]-1 and P[8]-3
 JOURNAL Unpublished
 AUTHORS Menchaca,G.E., Infante,R., Hernandez,C.E., Rodriguez,C., Tamez,R.S.
 and Contreras,J.F.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (06-NOV-2010) Facultad de Ciencias Biologicas,
 Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Pedro de Alba S/N, San Nicolas
 de los Garza, Nuevo Leon 66451, Mexico
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..762
 /organism="Human rotavirus A"
 /mol_type="genomic RNA"
 /isolate="MX08-680"
 /host="Homo sapiens"
 /db_xref="taxon:10941"
 /country="Mexico"
 /collection_date="02-Apr-2008"
 /note="genotype: P[8]"
 gene 10..>762
 /gene="VP4"
 CDS 10..>762
 /gene="VP4"
 /codon_start=1
 /product="outer capsid protein"
 /protein_id="ADU54596.1"
 /db_xref="GI:315661174"
 /translation="MASLIYRQLLTNSYSVDLYDEIEQIGSEKTQNVTVNPGPFAQTR
 YAPVNWGHGEINDSTTVEPILDGPYQPTTFTTTPPSDYWILINSNTNGVVYESTNNSDFW
 TAVIAVEPHVDPVDRQYNVFGENKQFNVRNDSKWKFLMFRGSSQNDFYNRRTLSD
 TRLVGILKYGGRIWTFHGETPRATTDSSNTANLNGISITIHSEFYIIPRSQESKNEY
 INNGLPPIQNTRNVVPLSLSSRSIQYKRAQVNE"
 ORIGIN
 1 ggctataaaa tggcttcact catttataga cagcttctca ctaattcata ttcagtagat
 61 ttatatgatg aaatagagca aattggatca gaaaaaactc aaaatgtaac cgtaaatacca
 121 ggtccatttg ctcaaacaag atatgctcca gtcaattggg gtcattggaga gataaatgat
 181 tcaaccacag tggaaaccaat ctagatgggt ccctatcaac ctactacatt tacaccacct
 241 tctgattact ggatacttat taactcaaat acaaatggag tagtatacga gagtacaat
 301 aatagtgact tttggactgc agttattgct gttgaaccgc acgctgatcc agtagataga
 361 caatataatg tatttgggtga aaataaacia tttaatgtaa gaaatgattc agataaatgg
 421 aagtttttag aaatgttttag aggcagtagt caaaatgact tttataatag acgtacacta
 481 acttctgata ctagactcgt gggaatatta aaatatgggtg gaagaatatg gacatttcat
 541 ggtgaaacac cgagggctac tactgatagc tcaaacactg caaatthtaa cggtatatca
 601 attacaattc attcagaatt ttatattatt ccaaggtctc aagagtctaa gtgcaatgaa
 661 tatattaaca atggctctacc accaattcaa aataactagaa atgtagtacc attatcatta
 721 tcgtctagat ctatacagta taagagagca caagttaatg aa

LOCUS HQ585866 762 bp RNA linear VRL 04-JAN-2011
 DEFINITION Human rotavirus A isolate MX08-737 outer capsid protein (VP4) gene, partial cds.
 ACCESSION HQ585866
 SOURCE Human rotavirus A
 ORGANISM Human rotavirus A
 Viruses; dsRNA viruses; Reoviridae; Sedoreovirinae; Rotavirus; Rotavirus A.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 762)
 AUTHORS Menchaca,G.E., Infante,R., Hernandez,C.E., Rodriguez,C., Tamez,R.S. and Contreras,J.F.
 TITLE Evidence of common epitopes in VP8* variable region of rotavirus strains with lineages P[8]-1 and P[8]-3
 JOURNAL Unpublished
 AUTHORS Menchaca,G.E., Infante,R., Hernandez,C.E., Rodriguez,C., Tamez,R.S. and Contreras,J.F.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (06-NOV-2010) Facultad de Ciencias Biologicas, Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Pedro de Alba S/N, San Nicolas de los Garza, Nuevo Leon 66451, Mexico
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..762
 /organism="Human rotavirus A"
 /mol_type="genomic RNA"
 /isolate="MX08-737"
 /host="Homo sapiens"
 /db_xref="taxon:10941"
 /country="Mexico"
 /collection_date="07-May-2008"
 /note="genotype: P[8]"
 gene 10..>762
 /gene="VP4"
 CDS 10..>762
 /gene="VP4"
 /codon_start=1
 /product="outer capsid protein"
 /protein_id="ADU54597.1"
 /db_xref="GI:315661176"
 /translation="MASLIYRQLLTNSYSVDLYDEIEQIGSEKTQNVTVSPGPFAQTR
 YAPVNWGHGEINDSTTVEPILDGPYQPTTFTPPSDYWILINSNTNGVVYESTNNSDFW
 TAVIAVEPHVDPVDRQYNVFGENKQFNVRNDSKWKFLIEIFRGSNQNDFYNRRLTSD
 TRLVGILKYGGRIWTFHGETPRATTDSSNTANLNGISITIHSEFYIIPRSQESKNEY
 INNGLPPIQNTRNVVPLSLSSRSIQYKRAQVNE"
 ORIGIN
 1 ggctataaaa tggcttcact catttataga cagcttctca ctaattcata ttcagtagat
 61 ttatatgatg aaatagagca aattggatca gaaaaaactc aaaatgtaac cgtaagtcca
 121 ggtccatttg ctcaaacaag atatgctcca gtcaattggg gtcattggaga gataaatgat
 181 tcaaccacag tggaaaccaat ctagatgggt ccctatcaac ctactacatt tacaccacct
 241 tctgattact ggatacttat taactcaaat acaaatggag tagtatacga gagtacaat
 301 aatagtgact tttggactgc agttattgct gttgaaccgc acgctgatcc agtagataga
 361 caatataatg tatttgggta aaataaacia tttaatgtaa gaaatgattc agataaatgg
 421 aagtttttag aaatatttag aggcagtaat caaaatgact tttataatag acgtacacta
 481 acttctgata ctagactcgt gggaatatta aaatatgggt gaagaatag gacatttcat
 541 ggtgaaacac cgagggctac tactgatagc tcaaacactg caaatttaaa cggtatatca
 601 attacaattc attcagaatt ttatatcatt ccaaggtctc aagagtctaa gtgcaatgaa
 661 tatattaaca atggctctacc accaattcaa aataactagaa atgtagtacc attatcatta
 721 tcgtctagat ctatacagta taagagagca caagttaatg aa

RESUMEN BIOGRÁFICO

Griselda Edith Menchaca Rodríguez

Candidata para el Grado de

Doctor en Ciencias con Especialidad en Microbiología

Tesis: EPITOPES INMUNODOMINANTES EN LA SUBUNIDAD VP8* DE LA PROTEÍNA VP4 DE CEPAS HUMANAS DE ROTAVIRUS CON GENOTIPO P[8]

Campo de Estudio: Virología

Biografía:

Datos Personales: Nacida el 3 de Febrero de 1971, hija de Pedro Avelardo Menchaca del Valle y Eloisa Rodríguez de la Rosa.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León con el título de Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 1994 y con el grado de Maestro en Ciencias con Especialidad en Microbiología en 1997, recibiendo mención honorífica.

Experiencia Profesional: Jefe Administrativo del Laboratorio de Microbiología, Planta Monterrey, Cervecería Cuauhtémoc Moctezuma, en 1998-2000. Maestro nivel Preparatoria en la Universidad TecMilenio Campus San Nicolás, en 2003-2006. Investigador tiempo completo en Laboratorio Virología Unidad L-11, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL de 2010 a la fecha.

Evidence of conserved epitopes in variable region of VP8* subunit of VP4 protein of rotaviruses of P[8]-1 and P[8]-3 lineages

J.F. CONTRERAS^{1*}, G.E. MENCHACA¹, R. INFANTE², C. E. HERNÁNDEZ¹, C. RODRÍGUEZ¹, R.S. TAMEZ¹

¹Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L. 66451 México; ²Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua. Nuevo Campus Universitario, Chihuahua, Chih. 31125 México

Received February 15, 2011; accepted

Summary. – Although antibody responses to the human rotavirus VP4 protein have been reported, few studies have analyzed the specificity of these responses to the VP8* subunit. This study investigated antibody responses generated against the variable region of the VP4 protein (VP8* subunit) in children infected with rotavirus genotype P[8]. Recombinant VP8* subunit (rVP8*) and truncations corresponding aa 1–102 (peptide A) and 84–180 (peptide B) of rotavirus strains P[8]-1 and P[8]-3 lineages were expressed in *Escherichia coli* and examined for antibody reactivity using ELISA and Western blot assays. Sera from infected children had IgG antibodies

*E-mail: juan.contrerascr@uanl.edu.mx; contrerasjfco@gmail.com; fax: 52 8183524212