RIDAA
Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes

Universidad
Nacional
de Quilmes

Esteban, Laura Emilia

Puesta a punto del modelo murino de infección por rotavirus y la evaluación de modelos de vacunas

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:
Esteban, L. E. (2015). Puesta a punto del modelo murino de infección por rotavirus y la evaluación de modelos de vacunas. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/133

Puede encontrar éste y otros documentos en: https://ridaa.unq.edu.ar

Universidad Nacional de Quilmes
Roque Sáenz Peña 352 // Bernal
Buenos Aires // Argentina
t.: (+41 11) 4365 7100
f.: (+54 11) 4365 7101
info@unq.edu.ar

Esteban, Laura Emilia, Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto,
diciembre de 2013, pp. 149,
http://ridaa.demo.unq.edu.ar,
Universidad Nacional de Quilmes, Secretaría de Posgrado,
Doctorado en Ciencia y Tecnología

Puesta a punto del modelo murino de infección por rotavirus y la evaluación de modelos de vacunas

TESIS DOCTORAL

Laura Emilia Esteban

lauraesteban@gmail.com

Resumen

Los rotavirus de grupo A son la causa individual más frecuente de diarrea severa en niños menores de 5 años. La incidencia de la enfermedad por rotavirus es similar en países en desarrollo y desarrollados, pero se estima que más del 80% de las muertes ocurren en regiones pobres. El plan de esta tesis abarcó distintos objetivos particulares que convergen en los objetivos generales de contar con la información epidemiológica sobre la circulación de serotipos en nuestra región, para evaluar críticamente la introducción de la vacunación contra rotavirus y monitorear sus resultados, pero también generar herramientas para desarrollar nuevas alternativas preventivas. La información sobre la epidemiología general y molecular de las cepas circulantes en el Gran Buenos Aires entre los años 2004 y 2007, contribuyó a la continuación de los trabajos de vigilancia de rotavirus llevados a cabo en nuestro laboratorio desde 1996. La incidencia de rotavirus en el período estudiado fue de 19,7 % y la caracterización de los tipos G y P permitió observar fluctuaciones marcadas en la prevalencia de los mismos durante las distintas temporadas estudiadas. En general, los principales tipos G detectados fueron G2 y G9, mientras que los principales tipos P detectados fueron P[8] y P[4]. Estos resultados contribuyeron a establecer el patrón natural de fluctuación de las frecuencias de genotipos en una misma área.

En cuanto a los objetivos relacionados con la generación de nuevas alternativas preventivas fue prioritaria la implementación de un modelo animal para poder encarar dichos estudios. En este sentido se llevó a cabo la puesta a punto del modelo murino de infección por rotavirus como una herramienta versátil para abordar la investigación sobre inmunógenos, vacunas modelo y nuevos adyuvantes. En particular, se describió su utilización para evaluar la inmunogenicidad y la protección inducida por distintos tipos de vectores virales y bacterianos.

Los vectores de tipo amplicón basados en HSV-1 son capaces de transducir eficientemente un amplio rango de tipos celulares, incluyendo células dendríticas. Por ello pueden ser empleados como vehículos vacunales para el delivery de antígenos dado que las proteínas heterólogas son expresadas en el contexto de un proceso cuasi-infeccioso. En línea con esta idea, se construyeron vectores amplicón que codifican una o más proteínas de rotavirus. Algunas de estas construcciones demostraron inducir respuestas inmunes específicas contra las proteínas blanco, y en algunos casos también se demostró, en cultivo celular, la eficiente formación de partículas tipo virus o Virus Like Particles (VLPs). Estas últimas construcciones generaron respuestas parcialmente protectoras ante el desafío con rotavirus en los animales inmunizados.

El modelo murino de infección también fue empleado para evaluar la inmunogenicidad y protección inducida por un tipo de vector totalmente distinto basado en bacterias del ácido láctico. Lactococcus lactis es una bacteria del ácido láctico considerada un candidato prometedor para el desarrollo de vacunas de mucosas o como componente activo de alimentos funcionales. En este trabajo se diseñó y produjeron vectores de display basados en esta bacteria mediante la construcción de plásmidos y transformación de L. lactis de manera de que expresaran la proteína VP6 de rotavirus anclada a su pared y expuesta en su superficie. Estos vectores indujeron anticuerpos específicos para rotavirus cuando se los administró a ratones, aunque la respuesta inmune generada sólo fue parcialmente protectora cuando el inóculo se administró por vía subcutánea pero no por vía oral o intranasal. Los estudios de expresión y la necesidad de un booster para generar respuestas detectables por vía subcutánea indicarían que la cantidad de antígeno expresada no fue suficiente para inducir una respuesta específica en mucosas.

Esta tesis para optar al grado de Doctor de la Universidad Nacional de Quilmes fue realizada en el Laboratorio de Inmunología y Virología, perteneciente al Departamento de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Quilmes gracias a la concesión de Becas de Posgrado tipo I y II otorgadas por la Comisión Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y financiada por:

• el Programa Microbiología Molecular Básica y Aplicaciones Biotecnológicas de la Universidad Nacional de Quilmes,

• el Proyecto Herpesvirus-based Vaccines Against Rotavirus Infections (HEVAR, subsidio de la Comunidad Europea), y

• Subsidios de apoyo a la investigación para estudiantes de grado e investigadores en formación de la Universidad Nacional de Quilmes.

Parte de los resultados correspondientes a esta tesis dieron origen a las siguientes publicaciones en revistas científicas:

Castello, A.A., Argüelles, M.H., Rota, R.P., Esteban, L.E., Scian, R., and Glikmann, G.2008. Rotavirus immune responses and vaccine update. Current Topics in Virology 7: 1-20.

Esteban, L.E., Rota, R.P., Gentsch, J.R., Jiang, B., Esona, M., Glass, R.I., Glikmann, G., and Castello, A.A. 2010. Molecular epidemiology of group A rotavirus in Buenos Aires, Argentina 2004-2007: reemergence of G2P[4] and emergence of G9P[8] strains. Journal of Medical Virology 82:1083–1093.

Laimbacher, A.S., Esteban, L.E. (co-first author), Castello, A.A., Abdusetir Cerfoglio, J.C., Argüelles, M.H., Glikmann, G., D'Antuono, A., Mattion, N., Berois, M., Arbiza, J., Hilbe, M., Schraner, E.M., Seyffert, M., Dresch, C., Epstein, A.L., Ackermann, M., and Fraefel, C. 2012. HSV-1 amplicon vectors launch the production of heterologous rotavirus-like particles and induce rotavirus-specific immune responses in mice. Molecular Therapy 2012 Sep;20(9):1810-20.

Esteban, L.E., Temprana C.F., Argüelles, M.H., Glikmann G. and Castello, A.A. 2013. Antigenicity and immunogenicity of rotavirus VP6 protein expressed on the surface of Lactococcus lactis. BioMed Research International Volume 2013 Article ID 298598.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi director de tesis, el Dr. Alejandro Castello, y a la Dra. Graciela Glikmann, directora del Laboratorio de Inmunología y Virología, Universidad Nacional de Quilmes (LIV - UNQ), por incorporarme a su grupo de investigación, por guiarme durante el desarrollo de esta tesis, por su tiempo y por brindarme los recursos que me permitieron completar este trabajo.

También quiero agradecer al Lic. Marcelo Argüelles, Lic. Rosana Rota, Lic. Juan Carlos Abdusetir Cerfoglio, Lic. Marcelo Mandile, Lic. Alejandra Belizan, Lic. Mariana Orellana y Dr. Facundo Temprana (LIV - UNQ); Dra. Andrea Laimbacher y Dr. Cornel Fraefel (Institute of Virology, University of Zurich); Liliana Rudak y Lic. Oscar Pérez (ANLIS – Malbrán) y Lic. Carlos Palacios (Instituto de Ciencia y Tecnología Dr. César Milstein) por su colaboración en los proyectos en común que formaron parte de este trabajo. Y junto a ellos, a los demás compañeros de laboratorio con los que compartí el día a día y las discusiones de técnicas y resultados a lo largo de estos años.

ÍNDICE

Lista de figuras

Lista de tablas

Abreviaturas

Objetivos

Introducción general

Rotavirus

Antecedentes históricos

Genoma

Estructura del virión

Proteínas no estructurales

Clasificación

Serogrupo y subgrupo

Electroferotipos

Genogrupos

Serotipos

Genotipos

Clasificación basada en el genoma completo

Replicación

Patogénesis

Respuesta inmune y correlatos de protección

Enfermedad, diagnóstico y tratamiento

Parte I

Epidemiología de rotavirus

Introducción

Transmisión de los rotavirus

Morbilidad y mortalidad por rotavirus

Estacionalidad

Diversidad genómica
Distribución global de genotipos

Transmisión interespecie

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Prevención

Objetivo general

Objetivos particulares

Materiales y métodos

Resultados y discusión

Detección de rotavirus en muestras de materia fecal

Prevalencia de genotipos G y P

Análisis de secuencias del genotipo G9

Comparación de las regiones antigénicas de las cepas G9

Análisis de secuencias del genotipo G2

Comparación de las regiones antigénicas de las cepas G2

Influencia de la vacunación sobre la diversidad de genotipos

Conclusiones

Parte II

Puesta a punto del modelo murino de infección por rotavirus

Introducción

Modelos animales

Modelos de animales pequeños

Propagación y titulación de cepas de rotavirus wild type en ratón

Detección de rotavirus en muestras de materia fecal de ratón

Detección de anticuerpos específicos para rotavirus

Respuesta inmune inducida por infección o vacunación en ratones adultos

Objetivo general

Objetivos particulares

Materiales y métodos

Resultados y discusión

Producción y titulación de stocks de cepas de rotavirus

Concentración y purificación de RRV

Producción de anticuerpos policlonales

ELISA para detección de IgG anti rotavirus

ELISA para detección de IgA anti rotavirus

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Western blot para detección de IgG anti rotavirus

Western blot para detección de IgA anti-rotavirus
Modelo murino de infección por rotavirus

Conclusiones

Parte III

Evaluación de la respuesta inmune y de la protección inducida por vectores herpéticos que expresan antígenos de rotavirus
Introducción

Herpesvirus

Ciclo replicativo de los herpesvirus

Herpes simplex virus tipo 1

Vectores virales basados en HSV-1

Vectores tipo amplicón basados en HSV-1

Producción de vectores amplicón dependiente de virus helper

Producción de vectores amplicón independiente de virus helper

Vectores amplicón basados en HSV-1 como vacunas

Objetivo general

Objetivos particulares

Materiales y métodos

Resultados y discusión

Expresión de proteínas de rotavirus codificadas en vectores amplicón

Ensamblado de VLPs en las células infectadas por vectores amplicón

Resultados del experimento 1

Resultados del experimento 2

Resultados del experimento 3

Resultados del experimento 4

Conclusiones

Parte IV

Evaluación de la respuesta inmune y de la protección inducida por Lactococcus lactis que expresan proteínas de rotavirus
Introducción

Bacterias del ácido láctico

Interacciones hospedador-BAL en las superficies mucosas

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Producción de proteínas heterólogas en Lactococcus lactis

Direccionamiento de proteínas en Lactococcus lactis

Lactococcus lactis como vehículo de antígenos heterólogos

Características particulares de la proteína VP6 de rotavirus
Objetivo general

Objetivos particulares

Materiales y métodos

Resultados y discusión

Expresión de VP6-CWA en L. lactis

Optimización de la expresión y determinación de la localización celular de VP6- CWA
Inmunogenicidad de L. lactis NZ9000/pCWA:VP6 en ratones

Resultados del experimento 1

Resultados del experimento 2

Resultados del experimento 3

Conclusiones

Discusión general y conclusiones

Bibliografía
LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Micrografía crio-electrónica de una muestra de rotavirus.

Figura 2. Organización estructural de los rotavirus.

Figura 3. Ciclo de replicación de los rotavirus.

Figura 4. Fisio-patología de la diarrea causada por rotavirus

Figura 5. Mortalidad global por diarrea aguda por rotavirus y cobertura de vacunación.

Figura 6. Combinaciones de genotipos G-P de rotavirus detectadas en humanos y animales.

Figura 7. Primers para genotipos G

Figura 8. Primers para genotipos P.

Figura 9. Distribución etaria de los pacientes con infección por rotavirus.

Figura 10. Frecuencia de los genotipos G y P detectados entre 2004 y 2007.

Figura 11. Frecuencia de genotipos G y P detectados por año

Figura 12. Fluctuación de la frecuencia de genotipos durante 16 años en Buenos Aires

Figura 13. Análisis filogenético de cepas G9.

Figura 14. Análisis filogenético de cepas G2.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Figura 15. Curva de excreción de rotavirus en materia fecal.

Figura 16. Niveles de anticuerpos anti rotavirus en el ratón adulto.

Figura 17. Inmunidad inducida por rotavirus.

Figura 18. Mecanismos de acción de la IgA secretora.

Figura 19. Diagrama de aplicaciones de las cepas de rotavirus empleadas

Figura 20. Perfil de purificación de RRV en gradiente de cloruro de cesio.

Figura 21. Análisis por SDS-PAGE de las preparaciones de RRV concentrado y purificado.

Figura 22. Cronograma de inmunización con RRV purificado.

Figura 23. IgG anti-rotavirus en sueros de ratones inmunizados con RRV purificado.

Figura 24. Titulación de anticuerpos anti-rotavirus por ELISA.

Figura 25. Análisis por Western blot de anticuerpos anti-rotavirus.

Figura 26. Curvas de excreción de rotavirus y anticuerpos específicos.

Figura 27. Cronograma de inmunización con inmunógenos control

Figura 28. Anticuerpos anti rotavirus en ratones inmunizados con inmunógenos control

Figura 29. Curvas de excreción de rotavirus y AUC de los ratones inmunizados con inmunógenos control y desafiados con rotavirus murino.

Figura 30. Estructura del virión de herpesvirus.

Figura 31. Ciclo replicativo de herpes simplex tipo I

Figura 32. Mapa del genoma de HSV-1.

Figura 33. Tipos de vectores basados en HSV-1.

Figura 34. Esquema representativo del sistema de empaquetamiento libre de virus helper.

Figura 35. Representación esquemática de los plásmidos amplicón.

Figura 36. Cronograma de inmunización con los vectores amplicón

Figura 37. Expresión de genes de rotavirus en células transducidas con vectores amplicón.

Figura 38. Distribución intracelular de las proteínas de rotavirus.

Figura 39. Micrografías electrónicas de VLPs producidas por vectores amplicón.

Figura 40. Proteínas de rotavirus presentes en las VLPs

Figura 41. IgG anti rotavirus en ratones inmunizados en los experimentos 1 y 2

Figura 42. Protección frente al desafío en ratones inmunizados en los experimentos 1 y 2.

Figura 43. IgG anti rotavirus en ratones inmunizados en el experimento 3.

Figura 44. Western blot de las muestras obtenidas en los experimentos 1, 2 y 3

Figura 45. Protección frente al desafío en ratones inmunizados en el experimento 3

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Figura 46. IgG anti rotavirus en ratones inmunizados en el experimento 4.

Figura 47. Análisis por Western blot de las muestras obtenidas en el experimento 4

Figura 48. Protección frente al desafío en ratones inmunizados en el experimento 4

Figura 49. Destino de las BAL en el tracto gastrointestinal.

Figura 50. Representación esquemática del sistema de expresión NICE.

Figura 51. Cronogramas de inmunización con L. lactis NZ9000/pCWA:VP6.

Figura 52. Clonado de VP6 para la obtención de pCWA:VP6.

Figura 53. Análisis de la expresión de la fusión VP6-CWA.

Figura 54. Optimización de la expresión de VP6-CWA y determinación de la localización celular.

Figura 55. Análisis de VP6-CWA en la superficie de L. lactis por citometría de flujo.

Figura 56. Resultados obtenidos durante el experimento 1.

Figura 57. Resultados obtenidos durante el experimento 2.

Figura 58. Resultados obtenidos durante el experimento 3.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades de las proteínas codificadas por cada segmento genómico.

Tabla 2. Estrategias de clasificación para los rotavirus.

Tabla 3. Constelaciones de genotipos de cepas humanas seleccionadas

Tabla 4. Primers para la amplificación y tipificación de VP7 y VP4.

Tabla 5. Incidencia de rotavirus grupo A entre 2004 y 2007.

Tabla 6. Distribución y frecuencia de los genotipos detectados entre 2004 y 2007

Tabla 7. Distribución y frecuencia de combinaciones de genotipos entre 2004 y 2007.

Tabla 8. Comparación de las regiones antigénicas A, B, C, y F de VP7 de cepas G9 y G2.

Tabla 9. Vectores amplicón evaluados en el modelo de ratón adulto.

Tabla 10. Títulos de IgG anti rotavirus determinados por ELISA en los sueros obtenidos al día 42 de los ratones inmunizados con los distintos vectores amplicón

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

ABREVIATURAS

AUC: área bajo la curva (Area Under the Curve)

BAC: cromosoma bacteriano artificial (Bacterial Artificial Chromosome) BAL: bacterias del ácido láctico

CWA: anclado a pared celular (Cell Wall Anchor)

DLP: partículas de doble capa (Double Layer Particles)

DO490: densidad óptica a 490 nm DO600: densidad óptica a 600 nm dpd: días post desafío

dpi: días post inoculación dsDNA: DNA doble cadena dsRNA: RNA doble cadena ER: retículo endoplasmático

FFU: unidades formadoras de focos fluorescentes (Fluorescent Focus-forming Units)

HBSS: solución salina balanceada de Hank (Hank's Balanced Salt Solution)

i.g.: intragástrico

i.m.: intramuscular i.n.: intranasal

IFN: interferón

Kpb: kilo pares de bases

MCS: sitio de clonado múltiple (Multiple Cloning Site)

MF: material fecal mRNA: RNA mensajero pb: pares de bases

PBS-T: PBS, Tween 0,2 % PBS-TC: PBS-T, caseína 1 % PC: pared celular

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (Polimerase Chain Reaction) PFU: unidades formadoras de placas (Plaque-Forming Units)

PP: protoplastos

PS: péptido señal

RT: retrotranscripción

RV: rotavirus

RV1: vacuna monovalente contra rotavirus

RV5: vacuna pentavalente contra rotavirus

RVA: rotavirus grupo A

s.c.: subcutáneo

ssRNA: RNA simple cadena

TLP: partículas de triple capa (Triple Layer Particles)

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

TU: unidades de transducción (Transducing Units) VLP: partículas similares a virus (Virus-Like Particles) wt: wild type

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

OBJETIVOS

Los rotavirus grupo A son la causa individual más frecuente de diarrea severa en niños menores de 5 años. La incidencia de la enfermedad por rotavirus es similar en países en desarrollo y desarrollados, pero se estima que más del 80 % de las muertes ocurre en regiones pobres. Como consecuencia de la alta morbilidad y mortalidad asociadas a la infección y al escaso efecto de las medidas higiénico-sanitarias sobre su diseminación, los rotavirus han sido identificados como un blanco para el desarrollo de vacunas. El plan de esta tesis se enmarca en los objetivos generales de nuestro laboratorio de contar con información sobre la diversidad de los rotavirus circulantes en nuestra región para evaluar la relevancia y los eventuales resultados de la introducción de vacunas licenciadas y generar herramientas para desarrollar y evaluar nuevas alternativas. En este contexto, los objetivos particulares de la presente tesis son de índole epidemiológico, de desarrollo de metodología y de ensayo de nuevos inmunógenos utilizando esta metodología. Dichos objetivos son planteados y resueltos a través de las cuatro partes que conforman la tesis, a saber:

Parte I. Epidemiología de rotavirus: Detección de rotavirus y caracterización por genotipificación de cepas prevalentes en niños en el Conurbano Bonaerense con el objetivo de contar con información epidemiológica relevante que permita un análisis sobre la fluctuación temporal y geográfica de las cepas circulantes en la región.

Parte II. Puesta a punto del modelo murino adulto de infección por rotavirus: Producción de stocks de cepas de rotavirus murino, simiano y humano, puesta a punto de inmunoensayos para detección de la respuesta inmune específica, protocolos de inmunización de ratones y desafío con rotavirus salvaje. El objetivo de esta parte fue contar con un modelo animal que permita evaluar la inmunogenicidad y capacidad protectora de cualquier antígeno o vector que contenga proteínas de rotavirus.

Parte III. Utilización del modelo murino para evaluar la respuesta inmune y la protección inducida por vectores herpéticos que contienen o expresan antígenos de rotavirus. El objetivo fue evaluar vectores vacunales derivados del Herpes Virus tipo 1 (HSV-1) que expresan distintas proteínas de rotavirus, como una alternativa conveniente para inducir una respuesta inmune específica y comparar el efecto de distintas combinaciones de genes de rotavirus sobre la inmunidad protectora.

Parte IV. Utilización del modelo murino para evaluar la respuesta inmune y la protección inducida por Lactococcus lactis que expresan antígenos de rotavirus. Debido a que Lactococcus lactis es una bacteria no invasiva y no colonizadora que ha sido propuesta para el delivery de antígenos a mucosas, el objetivo de esta parte fue emplearla para expresar la proteína VP6 de rotavirus y utilizarla como vehículo para la presentación del antígeno en la mucosa gastrointestinal, evaluando su capacidad inmunogénica y protectora.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

I. Introducción general

Rotavirus

Antecedentes históricos

Los primeros rotavirus en ser descriptos, en base a la patología y las características epidemiológicas de la enfermedad, fueron cepas murinas clasificadas bajo la denominación general de agentes responsables de la “diarrea epizoótica de los ratones lactantes” (epizootic diarrea of infant mice: EDIM). Los rotavirus murinos también fueron los primeros en ser visualizados por microscopía electrónica. Al mismo tiempo, se observaron virus con morfología comparable en hisopados rectales de monos. Estos agentes fueron descriptos como partículas de 70 nm con apariencia similar a una rueda, por lo que fueron designados rotavirus en base a la palabra en latín que significa rueda (Figura 1). En 1969 se demostró la presencia de estas partículas en heces de terneros con diarrea, asociando así a estos virus con la enfermedad en el ganado75.

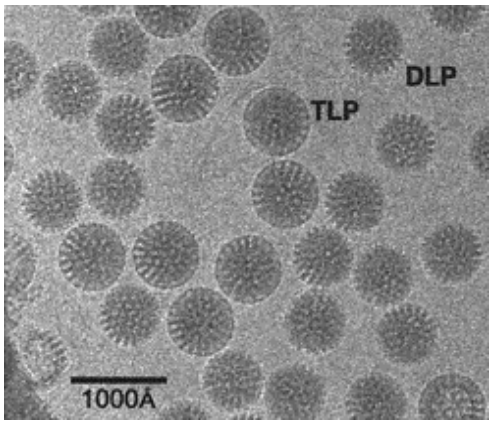


Figura 1. Micrografía crio-electrónica de una muestra de rotavirus.
En la micrografía se señalan partículas de triple capa (TLP) y partículas de doble capa (DLP). Adaptado de Baker et al, 199911.

La correlación entre la presencia de partículas compatibles con rotavirus y la diarrea severa en niños fue reportada por primera vez en 1973 por Bishop et. al.20, 80 a partir de la microscopía electrónica sobre cortes histológicos de duodeno de niños con gastroenteritis aguda. Poco después se demostró que las cepas humanas y animales, además de compartir características morfológicas, compartían un antígeno de grupo y estos virus fueron clasificados como miembros del género Rotavirus dentro de la familia Reoviridae.

En 1980, se descubrieron en cerdos partículas morfológicamente indistinguibles de las cepas establecidas de rotavirus, sin embargo estas últimas poseían un antígeno común de grupo diferente al de los virus previamente caracterizados. Este tipo de hallazgos condujo a la identificación de rotavirus pertenecientes a seis grupos adicionales (B a G) reservándose el grupo A para las cepas de rotavirus conocidas hasta el momento. Sólo los grupos A, B y C han sido asociados con enfermedad en humanos aunque la mayoría de los casos son causados por las cepas del grupo A75, 110.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Genoma

Los rotavirus poseen un genoma de dsRNA constituido por 11 segmentos, cuyos tamaños varían entre 667 pb (segmento 11) y 3.302 pb (segmento 1) (Figura 2), alcanzando un total de aproximadamente 18.500 pb74 para el genoma completo. Cada segmento codifica una proteína, con excepción del segmento 11 que codifica dos.

Los segmentos genómicos, cuya hebra positiva contiene la secuencia cap 5', se encuentran altamente ordenados dentro del core del virus. La mayoría de los segmentos poseen un único marco de lectura y secuencias terminales conservadas 5' y 3'. Se considera que estas secuencias terminales contienen señales importantes para la transcripción, la replicación y el ensamblado de los segmentos genómicos virales75.

Los rotavirus codifican seis proteínas estructurales (VP1-VP4, VP6 y VP7) y seis proteínas no estructurales (NSP1-NSP6). Se ha establecido una correlación entre genes y proteínas para varias cepas de rotavirus aunque la correlación entre las proteínas y su función sólo se conoce parcialmente (Tabla 1).

Estructura del virión

Las partículas de rotavirus constan de tres capas proteicas concéntricas: una capa interna formada por VP1, VP2 y VP3 que contiene al genoma, denominada core, una capa intermedia formada por VP6 y una capa externa formada por VP7 y VP4 (Figura 2). La estructura tridimensional de las partículas ha sido estudiada por numerosos grupos184, 240. Se determinó que las tres capas proteicas se encuentran ordenadas a lo largo de los ejes de simetría doble, triple y quíntuple, y están perforadas por 132 canales acuosos en tres arreglos simétricos distintos denominados clases. Los canales de clase I funcionan como salida de los transcriptos de mRNA desde las partículas subvirales (Figura 2)121.

La proteína VP1 actúa como RNA polimerasa RNA dependiente y se encuentra asociada al mRNA viral. También actúa como replicasa durante la síntesis de dsRNA a partir de molde de ssRNA (RNA simple cadena). VP2 es el principal componente del core y forma los viroplasmas, cuerpos de inclusión en el citoplasma de las células infectadas. Esta proteína también es necesaria para la síntesis de dsRNA. VP3 es la guanilil-transferasa y metil- transferasa, y es un componente esencial de los complejos de transcripción por lo que sería una enzima multifuncional con la capacidad de modificar el extremo 5' del mRNA para la formación de la estructura del cap75, 180.

VP4 es una de las proteínas de la cápside externa, es multifuncional, no glicosilada y presenta propiedades importantes como la unión al receptor celular y la hemaglutinación, y se asocia a las características de virulencia y tropismo. Es capaz de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes. VP4 se cliva por tripsina en dos proteínas: VP5* y VP8*, lo cual conduce a un aumento de la infectividad al facilitar la penetración y el desnudamiento del virus75, 180.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Tabla 1. Propiedades de las proteínas codificadas por cada segmento genómico.

Segmento genómico	Producto proteico	Peso molecular (kDa)	Localización en el virión	úmero de moléculas por virión	Propiedades
1	VP1	125,0	*Core*	12	RNA polimerasa RNA dependiente, unión a ssRNA, integra el complejo de transcripción con VP3
2	VP2	102,7	*Core*	120	Unión a RNA, requerida para la actividad replicasa de VP1
3	VP3	88,0	*Core*	12	Guaniltransferasa, metiltransferasa, integra el complejo de transcripción con VP1
4	VP4 (clivada en VP5* y VP8*)	86,7 (52,9 y 24,7)	Cápside externa	120	Trímeros de VP4 forman espículas, hemaglutinina, unión a receptor celular, antígeno de neutralización específica de tipo P, determinante de la virulencia
5	NSP1	58,6	No estructural	-	Unión a RNA, rol en la supresión de la respuesta de IFN, se asocia al citoesqueleto
6	VP6	44,8	Cápside intermedia	780	Principal proteína del virión, forma trímeros, antígeno de grupo y subgrupo, requerida para la transcripción
7	NSP3	34,6	No estructural	-	Unión a extremo 3' de mRNAs virales, forma dímeros, control de la traducción
8	NSP2	36,7	No estructural	-	Unión a RNA, a NSP5 y VP1, NTPasa y helicasa, formación de virosomas
9	VP7	37,4	Cápside externa	780	Glicoproteína, antígeno de neutralización específica de tipo G, unión a calcio en retículo endoplásmico
10	NSP4	20,3	No estructural	-	Glicoproteína no estructural, proteína transmembrana, enterotoxina
	NSP5	21,7	No	-	Unión a NSP2 y NSP6, forma multímeros, unión a ssRNA,

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

	11		estructural
NSP6	12,0	No estructural	

Adaptado de Estes y Kapikian, 2007[75].

localización en viroplasmas

Unión a NSP5, localización en viroplasmas

-

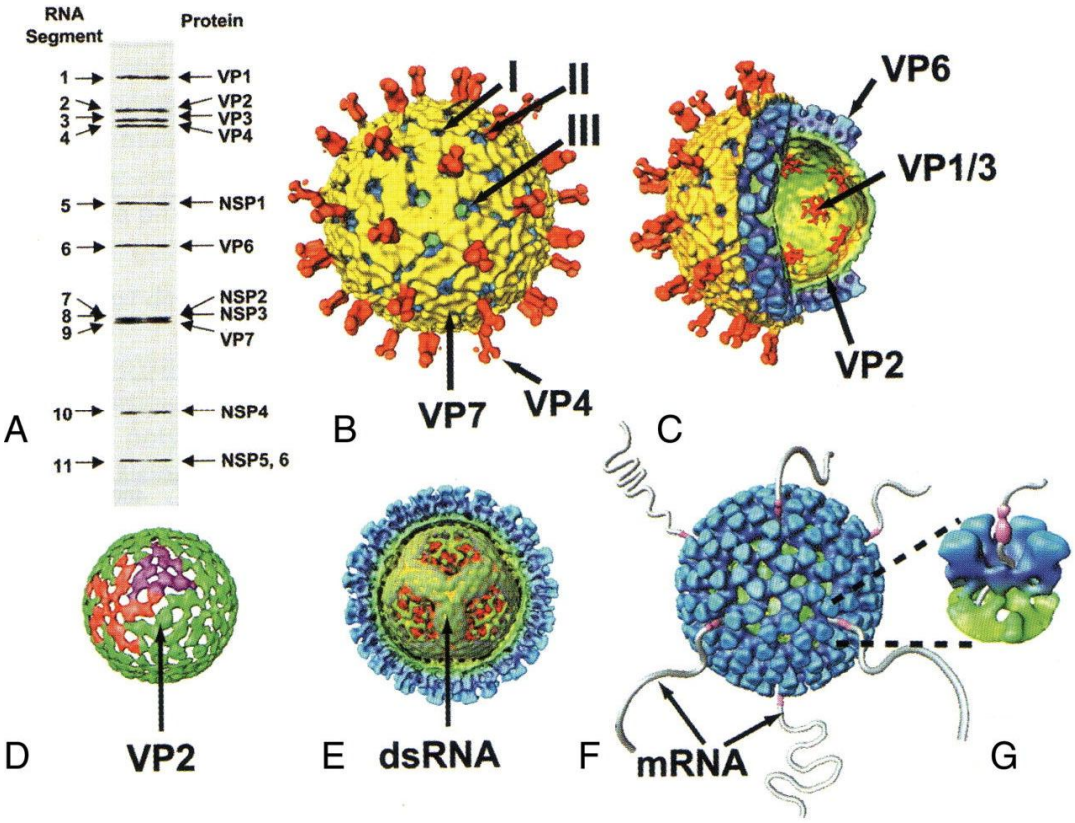


Figura 2. Organización estructural de los rotavirus.

A. Gel de poliacrilamida mostrando los segmentos genómicos de RNA 1 a 11 y las proteínas que codifican. B. Representación de la superficie del virión. Se indican los canales de clase I, II y III, VP4 se muestra en rojo y VP7 en amarillo. C. Representación de un corte del virión mostrando la capa intermedia (VP6 en azul) y la capa interna (VP2 en verde y los complejos de VP1 y VP3). D. Organización estructural de la capa de VP2 (se muestran grupos de dímeros en sus dos conformaciones en rojo y violeta). E. RNA genómico en la estructura de rotavirus. Las capas de VP6 y VP2 se muestran parcialmente descubiertas para exponer el RNA, el cual presenta apariencia dodecaédrica. F. Estructura de las partículas de doble capa (DLP) con los mRNAs nacientes (en gris) saliendo a través de los canales de clase I. G. Vista de la vía de salida en uno de los canales. Adaptado de Pesavento et al, 2006180.

La proteína VP6 es la más abundante en el virión y es el antígeno determinante de grupo y subgrupo. Es una proteína hidrofóbica que forma trímeros espontáneamente y que al ser la proteína estructural mayoritaria en masa, altamente inmunogénica y contener epítopes muy conservados, constituye el blanco más importante para la detección inmunológica de los rotavirus. Se une a la proteína no estructural NSP4, mediando la brotación de las partículas inmaduras e incompletas hacia el retículo endoplasmático, donde ocurre la maduración del virus75, 180.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

La proteína VP7 es la glicoproteína de la cápside externa y la segunda en abundancia en el virión. Está involucrada en las interacciones iniciales con las células hospedadoras, coordinando la unión y el ingreso del virus en conjunto con VP4. También es capaz de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes y sus principales determinantes antigénicos se designan A (aa 87-96), B (aa 145-150) y C (aa 211-233)75, 180.

Proteínas no estructurales

Las proteínas no estructurales de los rotavirus se encuentran en las células infectadas pero están ausentes en las partículas maduras. La proteína NSP1 presenta varias características: es muy divergente, aunque presenta una región altamente conservada y rica en cisteínas, posee actividad de unión a RNA, se acumula en el citoesqueleto. NSP1 puede interferir en la respuesta inmune innata, induciendo la degradación de los factores reguladores del interferón (IFN): IRF3 e IRF7. La proteína NSP2 actúa como factor de replicación y es esencial para la formación de los viroplasmas y el empaquetamiento del genoma. Además de unirse a RNA y tener propiedades desestabilizadoras de hélice, NSP2 presenta actividad trifosfatasa de nucleósidos. NSP3 es una proteína de unión a secuencias específicas de RNA, uniéndose al extremo 3' sin poliadenilar de los mRNAs. También interactúa con el factor de iniciación de la traducción 4GI (eIF4GI) y compite con la proteína de unión a poli-A. NSP3 también podría tener un rol importante durante el crecimiento viral en el intestino y la diseminación a sitios periféricos75, 177, 180, 222.

NSP4 es la única proteína no estructural que no une RNA. Es la primer enterotoxina viral descripta y funciona como receptor intracelular en la membrana del retículo endoplasmático. Puede afectar la movilización de calcio en las células, lo que sería importante para el ingreso del virus por mecanismos endocíticos dependientes de calcio. Durante la morfogénesis viral, está involucrada en la remoción de la envoltura transitoria. La proteína NSP5 presenta actividad de autofosforilación y podría tener un rol como reguladora de la síntesis de RNA. El segmento genómico que la codifica (11) posee dos marcos de lectura superpuestos. El marco fuera de fase (+1) codifica la proteína NSP6 que interactúa con NSP5 y se acumula en los viroplasmas75, 180, 222.

Clasificación

Los rotavirus pueden ser clasificados de distintas maneras (Tabla 2) en base a su diversidad genética y antigénica. Sin embargo, el sistema de clasificación dual en genotipos, basado en las dos proteínas de la cápside externa, VP7 (genotipo G) y VP4 (genotipo P)75 ha sido el más usado con fines epidemiológicos debido a su fuerte correlación con la clasificación en serotipos de los rotavirus del grupo A y la relativa facilidad para su determinación.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Serogrupo y subgrupo

Los serogrupos y subgrupos de rotavirus están determinados por epítopes en la proteína VP6, la cual representa más del 51 % del virión. Los serogrupos pueden caracterizarse por distintos ensayos serológicos, como inmunofluorescencia, ELISA y microscopía inmunoelectrónica. Hasta el momento se han identificado siete serogrupos denominados A a G, de los cuales los rotavirus del grupo A son los principales patógenos humanos y animales. Los grupos B y C también infectan humanos pero en menor medida. El resto de los grupos (D a G) solo infectan animales y no han sido detectados en humanos75.

Entre los rotavirus del grupo A, se han identificado cuatro subgrupos (I, II, I y II, y no I/II) en base a la reactividad con anticuerpos monoclonales contra VP6. El subgrupo I incluye a la mayoría de las cepas de rotavirus animales y el subgrupo II contiene a la mayoría de las cepas humanas. El tercer subgrupo comparte los sitios antigénicos de los subgrupos I y II, mientras que el cuarto subgrupo no comparte ninguno y consiste principalmente en cepas de rotavirus de aves75.

Tabla 2. Estrategias de clasificación para los rotavirus.

Clasificación	Determinantes	Tipos establecidos
Serogrupo	Proteína VP6	Grupos A a G
Subgrupo	Proteína VP6	Subgrupo I, II, I y II, no-I/II
Electroferotipo	Patrón de migración electroforética del segmento genómico 11	Corto, Largo, Súper-corto
Serotipo G	Proteína VP7 (Glicoproteína)	G
Serotipo P	Proteína VP4 (Sensible a Proteasas)	P
Genotipo G	Secuencia del gen de VP7	G
Genotipo P	Secuencia del gen de VP4	P[ ]
Genogrupo	Hibridación RNA-RNA de los 11 segmentos genómicos	Wa-like, DS-1-like, AU-1-like
Clasificación basada en el genoma completo	Secuencias nucleotídicas de los 11 segmentos genómicos	G, P, I, R, C, M, A, N, T, E, H

Electroferotipos

Los rotavirus del grupo A también pueden ser clasificados como de electroferotipo largo o corto en base a la movilidad electroforética del segmento 11 en geles de poliacrilamida (Figura 2a). Mientras que los rotavirus humanos con un patrón corto, exhiben generalmente la

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

especificidad del subgrupo I, aquellos con patrón largo poseen la especificidad del subgrupo II. En contraste, los patrones largos con especificidad del subgrupo I se asocian comúnmente con rotavirus animales53, 220.

Genogrupos

La clasificación en genogrupos se basa en la homología genómica de todos los segmentos de RNA, empleando ensayos de hibridación. Se han definido tres genogrupos entre los rotavirus humanos: Wa-like, DS-1-like y AU-1-like. En este sistema, se considera que una cepa pertenece a cierto genogrupo si contiene al menos siete segmentos genómicos similares a ese genogrupo en particular161.

Serotipos

Los serotipos se definen empleando ensayos de neutralización (por reducción de placas o focos fluorescentes) empleando antisueros dirigidos contra partículas virales purificadas. Estos ensayos miden la actividad neutralizante de los anticuerpos dirigidos contra las dos proteínas de la cápside externa y permiten definir serotipos G (basados en la glicoproteína VP7) y serotipos P (basados en la proteína sensible a proteasas VP4)75.

Genotipos

La genotipificación es el sistema más usado para la clasificación de los rotavirus. Los genotipos G y P se basan en la diversidad de las secuencias de las dos proteínas de la cápside externa: VP7 y VP4, respectivamente. Se ha establecido como valor de corte, un porcentaje de identidad nucleotídica del 89 % para definir los distintos genotipos G y P. A la fecha, se han reportado al menos 27 genotipos G y 37 genotipos P en especies de mamíferos y aves143, 144, 223. Todos los genotipos G se correlacionan con los serotipos G; sin embargo, no ha sido posible establecer la correlación genotipo-serotipo P en todos los casos. Por esto, se emplea una nomenclatura dual de tipificación P: el número de genotipo P se escribe entre corchetes seguido del número (y letra en el caso de subtipos) de serotipo P75. En muchos casos, en la literatura se encuentran ambas designaciones, por ejemplo P1A[8] corresponde al serotipo 1A, genotipo 8.

Clasificación basada en el genoma completo

Recientemente se desarrolló un sistema de genotipificación basado en las secuencias completas de los 11 segmentos genómicos propuesto por Matthijnssens et al.143. En este sistema, cada uno de los segmentos genómicos de rotavirus es genotipificado empleando un valor de corte del porcentaje de identidad de la secuencia nucleotídica. De acuerdo a este sistema, se han definido 27 genotipos G (Glicoproteína, VP7), 37 P (sensible a Proteasas, VP4), 16 I (capa Intermedia, VP6), 9 R (RNA polimerasa, VP1), 9 C (Core, VP2), 8 M (Metiltransferasa, VP3), 16 A

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

(Antagonista de IFN, NSP1), 9 N (NTPasa, NSP2), 12 T (potenciador de la Traducción, NSP3), 14 E (Enterotoxina, NSP4), y 11 H (Fosfoproteína, NSP5/6)144. En base a esta clasificación, se demostró que las dos constelaciones de genotipos no-G, no-P que circulan en humanos en todo el mundo son: I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1 (Wa-like, similar a la cepa Wa) y I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2, (DS-1-like, similar a la cepa DS-1) (Tabla 3). Se cree que las cepas humanas Wa-like tienen un ancestro común con cepas de rotavirus porcinas, mientras que las cepas DS-1-like tendrían un ancestro común con cepas de rotavirus bovinas. Una tercera constelación de genotipos humana que circular de forma mucho menos extensa es la AU-1-like: I3-R3-C3-M3-A3-N3-T3-E3-H3, la cual se habría originado a partir de cepas de rotavirus de gatos o perros147.

Replicación

La replicación viral ocurre en las células epiteliales maduras del intestino delgado (enterocitos). Se ha estudiado detalladamente la replicación in vitro, cuyo ciclo se encuentra diagramado en la Figura 3. Las partículas de triple capa (TLP, es decir, los viriones infectivos) se unen a la célula hospedadora e ingresan por endocitosis mediada por receptor o por penetración directa. Si bien no se han caracterizado completamente los receptores celulares para rotavirus, se ha establecido que el ingreso viral se da por una secuencia de interacciones con receptores primarios y secundarios (que actúan como co-receptores)75.

La replicación tiene lugar en el citoplasma. Luego de la remoción de la cápside externa de las TLPs mediada por enzimas celulares y por bajos niveles de calcio, emergen las partículas de doble capa (DLP). Las mismas, se vuelven transcripcionalmente activas y un gran número de moléculas de RNA de polaridad positiva (con cap pero no poliadeniladas) se transcriben a partir de los 11 segmentos de RNA. Éstos salen de las DLPs a través de los 12 canales acuosos de clase I localizados en los extremos de los ejes de simetría quíntuple. Las nuevas moléculas de RNA actúan como mRNAs (y sus productos de traducción se acumulan en el citoplasma) o son replicadas en los viroplasmas. Las dos proteínas no estructurales, NSP2 y NSP5, son las principales componentes de los viroplasmas, esenciales para la replicación del RNA y la morfogénesis temprana. Los viroplasmas también contienen VP1, VP2, VP3, VP6, NSP4 e inicialmente, los mRNAs transcriptos a partir de todos los segmentos genómicos. NSP5 interactúa tanto con VP2 como con VP1222.

Se desconoce el orden exacto de los eventos durante la morfogénesis temprana, las interacciones moleculares y los mecanismos de control por los hacia el interior del retículo endoplasmático rugoso, por medio de la interacción entre NSP4 (como receptor intracelular) y VP6. Una envoltura derivada del retículo rodea transitoriamente a las DLPs, permitiendo la incorporación de VP7 y VP4. Los viriones infecciosos compuestos por las tres capas proteicas se liberan por lisis de células no polarizadas (como células MA104) o por salida de células polarizadas (como células Caco-2) antes de observarse efecto citopático. En muestras de materia fecal, pueden observarse tanto TLPs como DLPs e incluso partículas que no contienen RNA genómico222.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

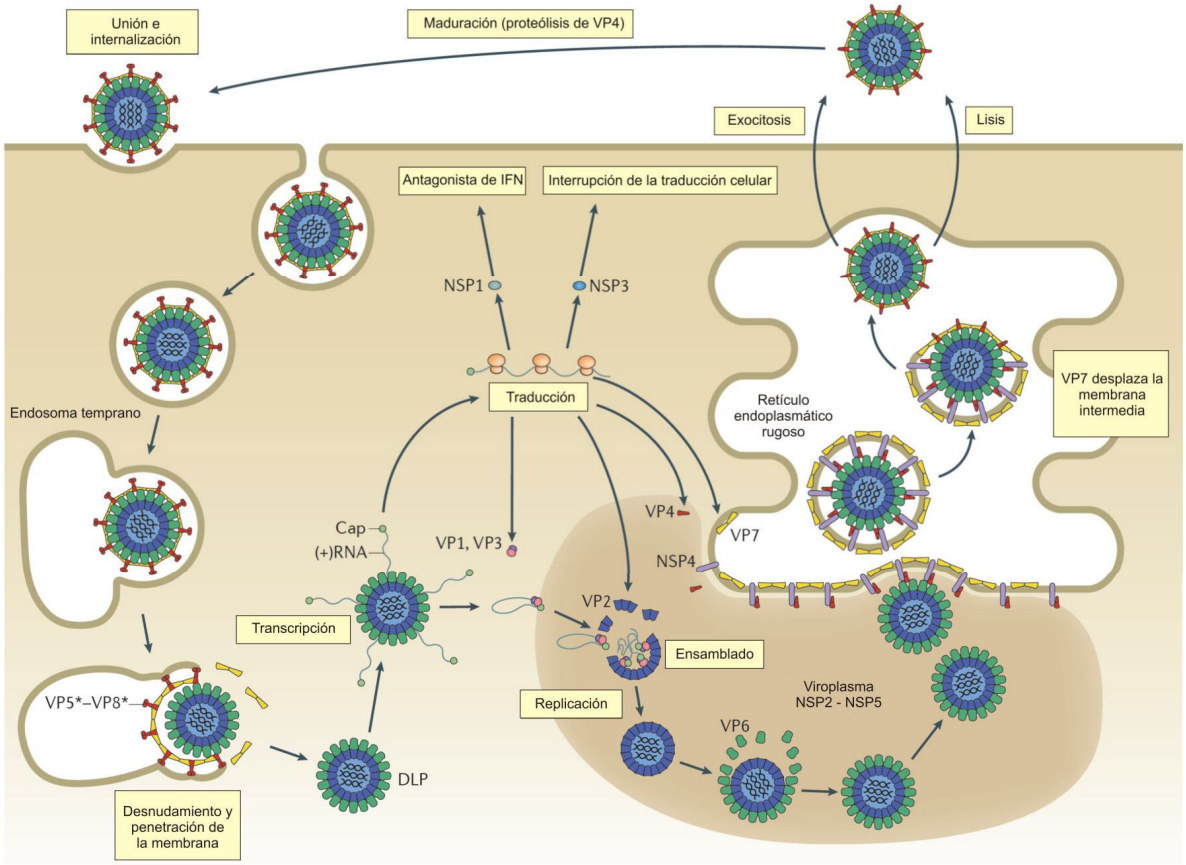


Figura 3. Ciclo de replicación de los rotavirus.

El virión (T LP) se une inicialmente a la superficie celular y es internalizado por endocitosis. La pérdida de la cápside externa y la liberación de las DLP al citosol, activa el complejo de polimerasa que transcribe los 11 segmentos genómicos. Éstos funcionan como mRNAs para la síntesis de proteínas virales o como molde para la síntesis de dsRNA genómico. En los viroplasmas se localizan los componentes necesarios para la replicación y el ensamblado de las partículas subvirales. Se ha propuesto que el ensamblado de la cápside externa ocurre por reclutamiento de las DLPs por NSP4 y la proteína VP4 ubicada en el lado citosólico de la membrana retículo endoplas mático (ER). A través de un mecanis mo no definido, el complejo DLP-VP4-NSP4 brota hacia el interior del ER. La remoción de la membrana del ER y de NSP4 permitiría el ensamblado de la proteína VP7 y la formación de las TLPs. La liberación de los viriones a partir de las células infectadas, los expone a proteasas del tracto gastrointestinal. Esto resulta en el clivaje específico de VP4 en VP5* y VP8* para producir los viriones infecciosos. IFN: interferón. Adaptado de Trask et al, 2012222.

Patogénesis

La infección con rotavirus, produce necrosis celular extensa del epitelio del intestino delgado. Esto conduce a la atrofia de las vellosidades, la pérdida de enzimas digestivas, la reducción en la absorción y un aumento en la presión osmótica del lumen intestinal que desencadena la diarrea. Estos eventos, seguidos por la hiperplasia de las criptas y la secreción de fluidos, contribuyen a la severidad de la diarrea75.

El descubrimiento de la propiedad enterotóxica de la proteína NSP4 explica la observación de que los animales infectados por rotavirus presentan una importante diarrea con anterioridad a la detección del daño histológico. NSP4 produce un aumento en la concentración de calcio

intracelular y desequilibra la homeostasis de electrolitos. Además es secretada por las células infectadas e inicia cascadas de señalización en células no infectadas (Figura 4)75, 243.

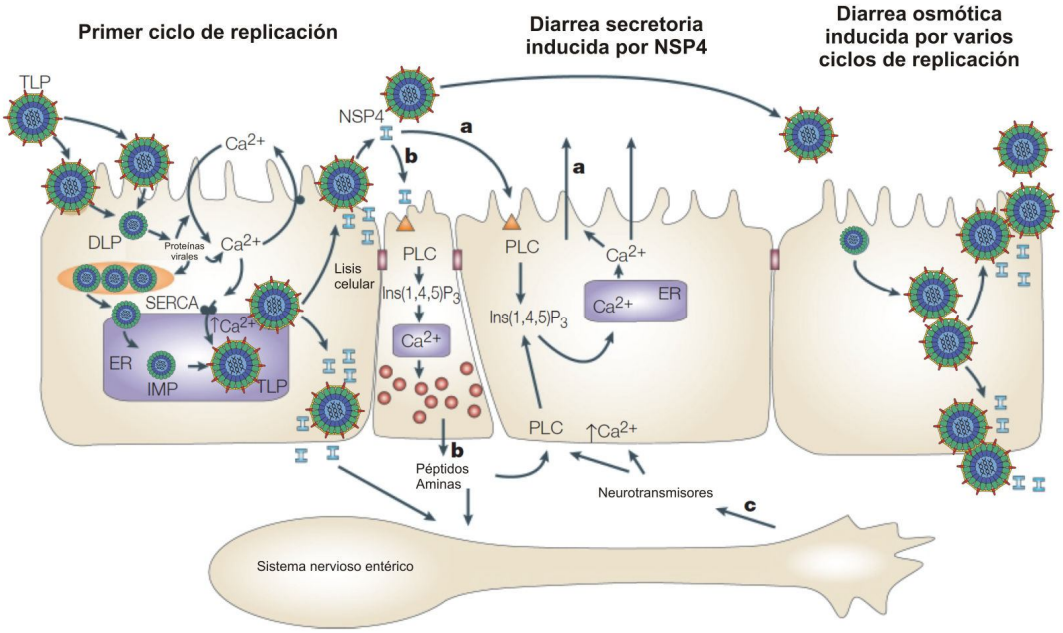


Figura 4. Fisio-patología de la diarrea causada por rotavirus.

Durante el primer ciclo de replicación de rotavirus en las células de la mucosa intestinal, la síntesis de las proteínas virales en el citoplasma conduce a: un aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática al calcio, la activación de mecanis mos regulatorios, y un incremento en la concentración de calcio en el retículo endoplasmático (ER). Esto promueve la activación de enzimas dependiente de calcio, lo que a su vez induce la lisis celular y la liberación de proteínas virales y la progenie viral. La proteína NSP4 actúa como enterotoxina sobre las células no infectadas e induce diarrea secretoria a través de: a) secreción dependiente de calcio por las células intestinales, b) secreción dependiente de calcio de péptidos y aminas que estimulan al sistema nervioso entérico, y c) activación de la secreción de iones cloruro inducida por el sistema nervioso entérico. En paralelo, el virus liberado infecta otras células. Esto conduce a muerte celular masiva y, como consecuencia, a la reducción de la superficie absortiva del epitelio intestinal y al componente osmótico de la diarrea. DLPs: partículas de doble capa, TLPs: partículas de triple capa, Ins(1,4,5)P3: inositol 1,4,5- trifosfato, PLC: fosfolipasa C, SERCA: ATPasa dependiente de calcio del retículo endoplasmático. Adaptado de Bomsel et al, 200325.

Respuesta inmune y correlatos de protección

Las infecciones neonatales o primarias por rotavirus inducen principalmente una respuesta inmune humoral que provee inmunidad homotípica y protección parcial contra infecciones subsecuentes por rotavirus de otros serotipos, la cual aumenta con el número de reinfecciones.

Aunque no han sido determinados los correlatos exactos de la inmunidad protectora, el mejor correlato parece ser el nivel de coproanticuerpos del isotipo A (IgA) específicos para rotavirus77, 84, 241. Los anticuerpos dirigidos contra las proteínas de la cápside interna e intermedia, VP2 y VP6, alcanzan títulos altos34, 109, 217 y si bien no son neutralizantes in vitro, son protectores in vivo en el modelo de ratón. Se cree que actúan por interacción con las DLPs intracelularmente durante la transcitosis de las IgA secretorias previniendo la transcripción y la maduración (neutralización intracelular)51.

Además existe una respuesta citotóxica específica para rotavirus por parte de células T, pero aún no está claro su rol exacto en la resolución de la infección primaria o en la protección frente a infecciones subsecuentes85.

Distintas líneas de evidencia demuestran que la infección natural o la vacunación, protegen contra la enfermedad severa en infecciones subsecuentes aun cuando el serotipo del virus difiera del correspondiente a infecciones o vacuna previas224.

Enfermedad, diagnóstico y tratamiento

Luego de un período corto de incubación de 1 a 2 días, el comienzo de la enfermedad es repentino. Los síntomas incluyen: diarrea de 4 a 7 días de duración, vómitos, fiebre, y deshidratación rápida. El grado de severidad de la enfermedad es variable y se han descripto manifestaciones frecuentes como el desarrollo de infecciones inaparentes por las llamadas "cepas de nursery" o muy raras como las infecciones del sistema nervioso central, las infecciones crónicas y la hepatitis en niños con inmunodeficiencias. También son frecuentes los síntomas respiratorios, aunque no hay evidencia de que rotavirus replique activamente en el tejido pulmonar65, 75.

El diagnóstico de una infección por rotavirus es relativamente sencillo dado que en el estadio agudo de la enfermedad se excretan grandes cantidades de partículas virales (hasta 1011 partículas/gramo de heces). Las principales técnicas empleadas son: los enzimoinmunoensayos (ELISA), los tests de aglutinación pasiva y la microscopía electrónica (no muy usada actualmente). Asimismo se emplean técnicas moleculares tales como RT-PCR tanto para la detección como para la tipificación. El tratamiento de la enfermedad por rotavirus consiste en rehidratación oral, subcutánea o endovenosa. Las inmunoglobulinas orales parecen tener efecto en la duración de la diarrea y en la excreción del virus pero no se usan de rutina65, 75.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

PARTE I

EPIDEMIOLOGÍA DE ROTAVIRUS

Introducción

Transmisión de los rotavirus

Los rotavirus son altamente contagiosos y su modo de transmisión es por la vía fecal- oral. Debido a que el virus es muy estable en el ambiente, la transmisión puede ocurrir por contacto persona-persona, a través de comida, agua o por contacto con superficies contaminadas. Así también, las infecciones intrahospitalarias son muy comunes62, 75. Anteriormente se consideraba que la infección por rotavirus se limitaba al tracto gastrointestinal. Sin embargo, se ha detectado rotavirus en secreciones nasofaríngeas de niños con o sin síntomas gastrointestinales244, por lo que también podría transmitirse por la vía respiratoria. Las infecciones por rotavirus se asocian comúnmente con antigenemia (presencia de antígenos virales en la sangre) en niños con diarrea y también, aunque menos frecuentemente, presencia de RNA viral en la sangre23. Además, se ha detectado rotavirus en suero y en múltiples órganos de animales infectados experimentalmente76, así como en el líquido cefalorraquídeo y en tejidos de niños y adultos. Estos hallazgos demuestran la diseminación de los rotavirus fuera del intestino y sugieren una posible infección sistémica en niños y animales infectados75.

Morbilidad y mortalidad por rotavirus

La incidencia de la enfermedad es mayor en niños de entre 6 y 24 meses. Los niños de este rango etario corren mayor riesgo de padecer enfermedad severa por rotavirus y requerir hospitalización. En total, los rotavirus son responsables de entre 25 y 50 % de las hospitalizaciones de niños por diarrea en todo el mundo. Durante los primeros 5 años de vida, virtualmente todos los niños habrán experimentado un episodio de diarrea por rotavirus tanto en países en desarrollo como en países desarrollados, pero las consecuencias de la infección son muy diferentes173. Las infecciones de rotavirus en adultos por lo general no causan manifestaciones clínicas o son mínimas, pero ocasionalmente pueden causar enfermedad75.

Hoy en día, los rotavirus son reconocidos como la principal causa de gastroenteritis infantil severa en todo el mundo22, 93. Se ha estimado que globalmente en el año 2008, los rotavirus causaron la muerte de 453.000 niños menores de 5 años (correspondiente al 37 % de las muertes totales por diarrea y al 5 % de las muertes totales en este grupo etario). Las estimaciones nacionales variaron entre menos de cinco muertes anuales (en 74 países) a 99.000 muertes anuales (en India) (Figura 5). Los datos para Latinoamérica y el Caribe se estiman en 8.000 muertes anuales por rotavirus en menores de 5 años. A pesar de que la proporción de rotavirus detectado en niños hospitalizados con diarrea fue mayor en países desarrollados, la mayoría de las muertes asociadas se detectaron en países en vías de desarrollo en África y Asia. En solo cinco países (India, Nigeria, Pakistán, República Democrática del Congo y Etiopía) se contabilizaron la mitad de las muertes173, 221. El riesgo elevado de mortalidad por rotavirus en

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

países de bajos ingresos se asocia a una combinación de factores, incluyendo el acceso limitado a la atención médica (terapias de rehidratación), una mayor prevalencia de desnutrición y otras causas de mortalidad infantil.

Por estos motivos, desde la década de 1980, la investigación se ha enfocado en el desarrollo de vacunas contra rotavirus y, desde el año 2006 se licenciaron dos vacunas en muchos países, y en algunos han sido incluidas en los planes nacionales de vacunación (Figura 5)236.

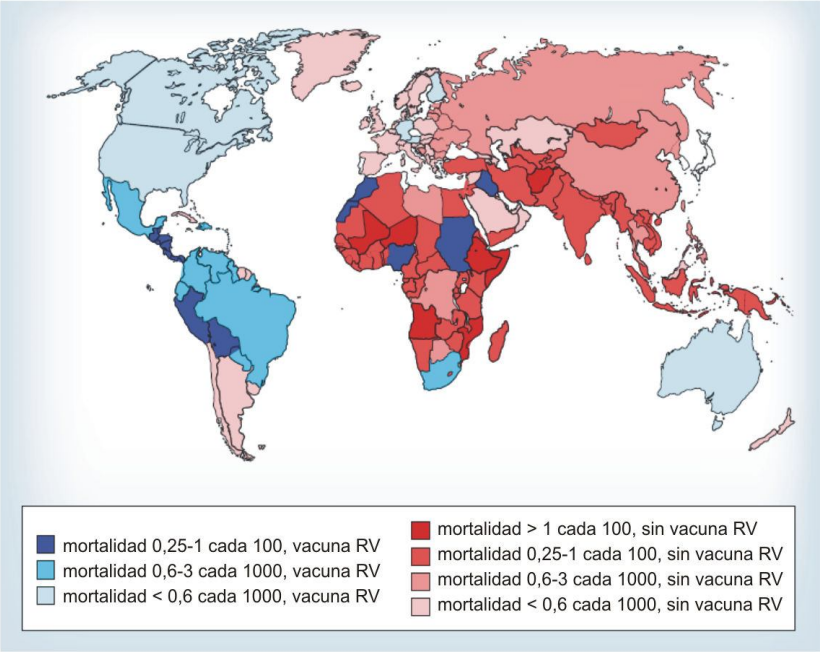


Figura 5. Mortalidad global por diarrea aguda por rotavirus y cobertura de vacunación.
Mapa mundial indicando la mortalidad estimada por rotavirus por país. Los distintos tonos indican el ries go de muerte por niño de hasta los 5 años. Los colores rojo y azul representan a los países sin o con cobertura de vacunación contra rotavirus (RV) respectivamente. Adaptado de Lepage et al, 2012126.

Estacionalidad

Los cambios estacionales son cíclicos, mayormente predecibles, y representan las variaciones externas que afectan a los sistemas naturales y humanos. La mayoría de los casos de infección con rotavirus en países con climas templados, ocurre en el invierno. En contraste, se pueden aislar rotavirus durante todo el año en países en desarrollo con climas tropicales o subtropicales, aunque algunos estudios reportaron picos durante el invierno75.

Diversidad genómica

Existen tres mecanismos evolutivos principales que afectan la diversidad genética de los rotavirus: a) la deriva genética (mutaciones puntuales), b) el rearreglo (recombinación) y c) la reasociación.

La deriva genética por acumulación de mutaciones puntuales da lugar a las variaciones intragenotípicas entre cepas de rotavirus. La frecuencia de mutación es relativamente alta debido a las características de la RNA polimerasa RNA dependiente. Los rearreglos ocurren por deleciones, inserciones o duplicaciones parciales75, 220.

La naturaleza segmentada del genoma de los rotavirus permite que ocurran reasociaciones de segmentos. Durante estos eventos, se intercambian uno o más segmentos genómicos provenientes de dos cepas distintas, lo que resulta en una progenie nueva de rotavirus. La frecuencia de reasociaciones aumenta cuando una población mixta de rotavirus se propaga en hospedadores animales y humanos. En teoría, a partir de las posibles combinaciones de los 11 segmentos es posible obtener una enorme variedad de cepas diferentes. Si la reasociación ocurriera al azar, los 11 segmentos de dos cepas parentales de rotavirus podrían dar lugar a 211 combinaciones génicas posibles99.

Debido a que las proteínas de superficie VP7 y VP4 son los principales blancos de la respuesta de anticuerpos neutralizantes del hospedador, las reasociaciones entre cepas pertenecientes a distintos tipos G (VP7) y P (VP4) han sido las más estudiadas. Al momento, se han identificado por lo menos 100 combinaciones diferentes G-P (Figura 6). Afortunadamente, la variabilidad global G-P es reducida debido a que en las cepas de rotavirus humanas, los genotipos G1, G3, G4 y G9 se asocian preferentemente con P[8], mientras que el genotipo G2 se asocia más frecuentemente con P[4]75, 143. Y, a pesar de que la reasociación es un mecanismo importante para la generación de diversidad en los rotavirus, las cepas humanas epidemiológicamente importantes poseen alguna de las dos constelaciones de genotipos Wa-like o DS-1-like.

Distribución global de genotipos

Existe una diversidad considerable de cepas de rotavirus que circulan en distintas regiones geográficas y períodos, además la incidencia de un genotipo individual en una región en particular fluctúa anualmente. Hasta mediados de la década de 1990, el 90 % de las infecciones por rotavirus en humanos en Norteamérica, Europa y Australia, eran causadas principalmente por las cuatro combinaciones de genotipos más prevalentes a nivel global: G1P[8], G2P[4], G3P[8], y G4P[8]. Sin embargo, en Sudamérica y Asia estos genotipos representaban sólo el 68 % de las infecciones. En el caso de África, sólo el 50 %. En particular, la combinación G1P[8] representaba más del 70 % de las infecciones por rotavirus en Norteamérica, Australia y Europa, pero sólo alrededor del 30 % en Sudamérica y Asia, y sólo el 23 % en África40, 66, 91, 205. Los rotavirus G9P[8] representan un claro ejemplo de una combinación de genotipos que fue considerada rara y actualmente es evaluada como la quinta combinación humana más importante globalmente54, 131, 145. En Latinoamérica, la cepa más común entre 1977 y 2009 fue G1 (34,2 %) seguida de G9 (14,6 %) y G2 (14,4 %). En esta misma región, los genotipos P más predominantes fueron P[8] y P[4] (56,6 % y 22,1 %, respectivamente)130.

Si bien una década atrás se consideraba al genotipo G12 como inusual, en base al número creciente de países que reportaron su detección, es posible que este genotipo también se vuelva globalmente dominante39, 142, 186, 202. Distintos estudios han demostrado que otros genotipos,

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

además de G1-G4 y G9, pueden ser importantes regionalmente. En Brasil y en Malawi, los genotipos G5 y G8, respectivamente fueron altamente prevalentes3, 92, 100, 124. El genotipo G8 también fue epidemiológicamente importante en otras partes de África214.

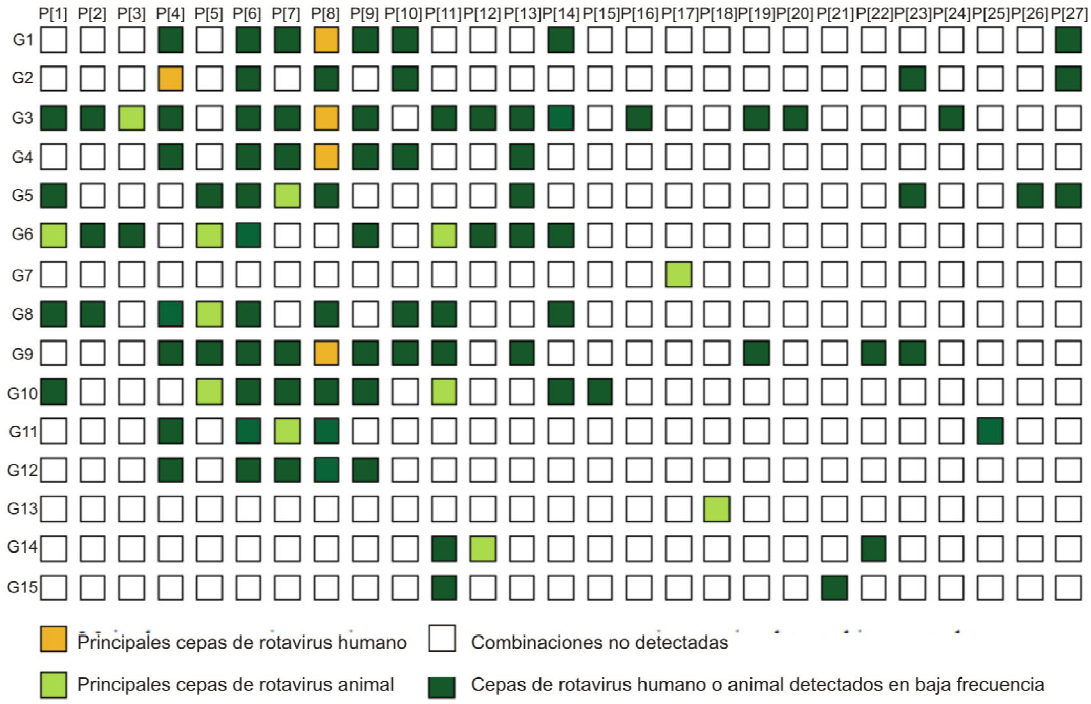


Figura 6. Combinaciones de genotipos G-P de rotavirus detectadas en humanos y animales.
Adaptado de Rahman, 2008185.

Transmisión interespecie

A pesar de que se consideraba que existía una restricción de hospedador para los rotavirus, un número creciente de artículos que reportan nuevas cepas de rotavirus detectadas en humanos sugiere que las transmisiones interespecie contribuyen considerablemente a la diversidad de los rotavirus. Por ejemplo, se detectó que ciertas cepas de rotavirus animales presentaban características antigénicas similares a algunas cepas de rotavirus humanos y algunos genotipos de origen animal, como G3, G5, G6, G8, G9 y G10, se aislaron de humanos en todo el mundo61, 75, 171.

Estas cepas pueden haber surgido por transmisión del virión completo de animales a humanos o como reasociantes génicos entre cepas animales y humanas durante coinfecciones en una misma célula. Este último caso es el más documentado. Los genotipos P raros como P[3], P[9], P[14] e incluso P[8] (que es común en humanos), tienen una relación genética y antigénica cercana con los mismos genotipos detectados en animales.

Existen varios modos por los que los rotavirus animales pueden transmitirse a humanos. En muchos países en desarrollo, los rotavirus pueden transmitirse por contacto directo entre animales de granja infectados y humanos. En áreas con tendencia a inundarse o con climas monzónicos, las probabilidades de contacto con heces de animales son mayores. Las mismas,

pueden contaminar fuentes de agua, lo que incrementa la probabilidad de transmisión. La manipulación y el cuidado de mascotas infectadas también expone directamente a los humanos a rotavirus animales75, 114.

Además, es de notar que la diversidad general de los rotavirus es mayor en países en desarrollo ya que las condiciones epidemiológicas, ambientales y de salud favorecerían una evolución más rápida de los rotavirus, incluyendo el caso particular de la introducción de genes de rotavirus animales por transmisión interespecie30.

Prevención

Los rotavirus son relativamente resistentes a la inactivación por los desinfectantes químicos y antisépticos comúnmente utilizados en hospitales y otras instituciones. El etanol, el gluconato de clorehexidina y compuestos de amonio cuaternarios pueden inactivar los rotavirus. Sin embargo, ninguno de los desinfectantes empleados comúnmente para el lavado de manos pueden inactivarlos completamente7, 75.

Las mejoras en los servicios sanitarios e higiene han tenido un gran impacto al reducir la enfermedad por diarrea y las muertes causadas por bacterias y parásitos que se diseminan principalmente a través de agua y comida contaminadas. Sin embargo, estas mejoras han tenido un impacto mucho menor sobre las infecciones por rotavirus, el cual se transmite principalmente por contacto entre personas19.

Diversos estudios demostraron que niños infectados previamente con rotavirus se encontraban protegidos contra diarreas posteriores por el mismo agente. La protección fue mayor contra la diarrea moderada a severa, y el nivel de protección aumentaba con cada nueva infección. Estos datos sugirieron que una vacuna de rotavirus atenuado que imitara la infección natural podría proveer protección contra la enfermedad, aunque probablemente se requerirían dosis múltiples de la vacuna para conferir una protección óptima75, 91, 221.

Las pruebas clínicas y el desarrollo de vacunas contra rotavirus comenzaron hacia finales de la década de 1970. La primer vacuna propuesta fue RIT4237 (monovalente, G6P[1], reasociante bovino-humano). Esta vacuna indujo un 88 % de protección contra la diarrea severa en ensayos clínicos realizados en Finlandia. Sin embargo, no se logró demostrar una eficacia protectora adecuada en países en desarrollo, y su avance se interrumpió a principios de la década de 198075, 227.

En vista de la inconsistencia de estos resultados, se procuró obtener cepas de rotavirus humanos atenuadas o cepas reasociantes que incluyeran genes provenientes de cepas humanas y animales. En 1998, se licenció en Estados Unidos una vacuna tetravalente basada en reasociantes simio-humano: RotaShield® (RRV-TV, Wyeth-Lederle). Esta vacuna demostró una elevada eficacia protectora en ensayos clínicos en Estados Unidos y Finlandia191, 225, aunque los niveles de protección fueron nuevamente mucho menores en países latinoamericanos118, 129. Sin embargo, a menos de un año de su lanzamiento, la vacuna debió ser retirada del mercado debido a que se observó una relación entre los pacientes que recibían la vacuna y casos raros de

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

intususcepción (una obstrucción del intestino potencialmente fatal)42. La experiencia con esta vacuna estableció un nuevo estándar en lo que respecta al tamaño de los ensayos clínicos para evaluar la seguridad de las vacunas, requerido para refutar la relación establecida entre la vacunación y los casos de intususcepción, comparando con grupos placebo de pacientes75.

Posteriormente al retiro de RotaShield®, dos ensayos clínicos grandes de fase III (cada uno incluyendo más de 60.000 niños) demostraron que tanto la vacuna Rotarix® como RotaTeq® eran seguras y mostraban una eficacia entre 85 y 95 % en la prevención de la gastroenteritis severa por rotavirus198, 226.

Rotarix® es una vacuna monovalente (RV1) basada en una cepa humana atenuada G1P[8] desarrollada originalmente por pasaje en cultivo celular de un aislamiento humano. La vacuna fue licenciada por GlaxoSmithKline Biologicals (Rixensart, Bélgica) y se licenció inicialmente en Méjico y en República Dominicana en 2004, y desde entonces fue aprobada para su uso en más de 90 países. Esta vacuna se administra por vía oral en dos dosis. RotaTeq® es una vacuna pentavalente (RV5) basada en reasociantes humano-bovino comprendiendo los genotipos humanos G1, G2, G3, G4 y P[8] con el resto de los segmentos pertenecientes a una cepa bovina G6P[5]. Fue licenciada por Merck & Co. (New Jersey, Estados Unidos) en febrero de 2006 para su uso en Estados Unidos y desde entonces fue aprobada en más de 100 países. Esta vacuna se administra por vía oral en tres dosis. En abril de 2013, 47 países ya habían incluido alguna de las vacunas en sus programas nacionales de vacunación6, 160, 236.

Ambas vacunas han demostrado ser eficaces para prevenir la diarrea severa y la mortalidad por rotavirus. De acuerdo a los estudios realizados previamente al licenciamiento de las vacunas, RV1 prevendría el 86 % de los casos de diarrea severa por rotavirus en países con baja mortalidad y el 63 % en países con elevada mortalidad. Por otro lado, RV5 prevendría el 87 % de los casos de diarrea severa por rotavirus en países con baja mortalidad y el 57 % en países con elevada mortalidad63, 79. Aún no se comprenden bien los motivos de la menor eficacia de las vacunas contra rotavirus en países de bajos ingresos, pero podrían estar relacionados con los títulos elevados de anticuerpos maternales transmitidos en la leche materna o a través de la placenta, las infecciones concurrentes por otros patógenos entéricos, la desnutrición, un microbioma intestinal alterado u otros factores del hospedador. Aun así, el valor absoluto de los casos de diarrea severa que se previenen por la vacunación de un número dado de niños es mayor en los países en desarrollo, debido a que el nivel de morbilidad en estos países es muy elevado172.

En el caso de Estados Unidos, desde la introducción de la vacuna, distintos estudios evaluaron la efectividad de RV563. Se demostró una efectividad de entre 78 y 100 % en cuanto a la prevención de la diarrea severa por rotavirus (hospitalizaciones y/o atención médica de emergencia) y un 96 % en cuanto a la prevención de las visitas médicas. Sin embargo, los datos más notables se refieren al efecto de la vacunación sobre el número de muertes por diarrea. En Méjico, luego de la introducción de RV1 en el programa nacional de vacunación, la mortalidad por diarrea infantil disminuyó un 35 % en 2008 al compararse con los valores anuales prevacunación (2003-2006). Asimismo, esta disminución se mantuvo por 4 años desde 2008 a 2011172, 193.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

En muchos otros países de ingresos medios a altos, incluyendo Estados Unidos, Sudáfrica e Israel, se han observado marcados descensos (entre 49 y 89 %) en el número de hospitalizaciones por diarrea severa por rotavirus dentro de los dos años de introducida la vacuna63.

Existen candidatos vacunales basados en cepas de rotavirus atenuadas que están en fase clínica para evaluar su efectividad y seguridad18, 57. Sin embargo, es difícil llevar a cabo estos ensayos clínicos tan grandes, tanto por motivos económicos como éticos. Además, las diferencias en eficacia de las vacunas según la población estimularon el interés en evaluar modificaciones en los calendarios de inmunización, introducir suplementos probióticos y/o macronutrientes y otros, que permitan mejorar la eficacia de las vacunas en poblaciones con mortalidad elevada. Teniendo en cuenta estos hechos, se investigaron posibles correlatos de protección luego de la vacunación que faciliten licenciar vacunas nuevas o estrategias nuevas para mejorar la eficacia de las ya existentes. Recientemente, se encontró que los títulos de IgA en suero se correlacionan inversamente con los niveles de mortalidad de niños menores de 5 años y que la eficacia de las vacunas durante los primeros dos años de vida es significativamente menor en países con títulos de IgA bajos a medios. Estos datos sugieren que los anticuerpos de tipo IgA rotavirus-específicos podrían ser marcadores de inmunidad a la infección por rotavirus175.

Otro aspecto importante a tener en cuenta, es la detección de rotavirus reasociantes derivados de las cepas vacunales asociados a gastroenteritis en pacientes de distintos países donde se ha introducido alguna de las vacunas26, 105. En estudios realizados en Australia, Estados Unidos y Finlandia, algunos niños se infectaron con una cepa G1P[8] derivada de RV5, resultado de un evento de reasociación entre cepas de la vacuna. También se han detectado con menor frecuencia, reasociantes entre cepas vacunales y cepas wild type pero todavía están pendientes los estudios sobre la distribución de cualquiera de estos reasociantes así como sobre la enfermedad asociada29, 172.

En ausencia de vacunación, existen un sinnúmero de factores que pueden afectar la distribución de genotipos de rotavirus, ya reconocidos por su fluctuación natural tanto geográfica como temporal. Sin embargo, los mecanismos concretos detrás de estas fluctuaciones no se comprenden completamente. Por otro lado, hay una gran diferencia con la presión selectiva que puede introducir la vacunación en masa de una población. En este caso, se expone a niños menores de 8 meses, dos o tres veces a cepas de rotavirus específicas. Se ejerce así, una presión unidireccional que potencialmente favorecería la selección de cepas de rotavirus que son relativamente más distantes de la cepa o cepas vacunales. Tales variantes podrían surgir por adquisición de genotipos G y P no presentes en las formulaciones vacunales (como G8, G9, G12, en combinación con P[4] o P[6]), o por acumulación de cambios más sutiles como sustituciones aminoacídicas en epítopes inmunogénicos de cualquiera de las proteínas involucradas en la generación de la inmunidad inducida por una vacuna146.

Diversos estudios han confirmado las consideraciones teóricas de que la vacunación con RV1 (G1P[8], Wa-like) aumentaría la prevalencia relativa de las cepas DS-1-like (Tabla 3). En distintos países (como Bélgica, Brasil y varios estados de Australia) se detectó un aumento muy marcado en

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

la prevalencia de cepas G2P[4] luego de la introducción de RV1. En el caso de RV5, esta vacuna contiene el genotipo P[8] que generalmente se asocia con las cepas Wa-like, pero también posee una constelación de genotipos bovinos, muchos asociados con cepas DS-1-like. Por este motivo las consideraciones teóricas sobre los efectos de esta vacuna no son tan claras y la presión selectiva podría ser menos marcada y más difícil de detectar. En distintos países (como Estados Unidos y varios estados de Australia) se detectó un aumento no esperado pero marcado, en la prevalencia de cepas G3P[8]. Esto podría deberse a una menor respuesta inmunológica al componente G3 de la vacuna o a que en varios casos se detectaron modificaciones en los epítopes de estas cepas al compararlas con las vacunales146.

Tabla 3. Constelaciones de genotipos de cepas humanas seleccionadas.

Cepas de rotavirus	Constelación de genotipos	VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
RVA/Human-tc/USA/Wa/1974/G1P1A[8]	Wa-*like*	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-tc/USA/P/1974/G3P1A[8]		G3	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/USA/DC5115-Bethesda/1977/G4P[8]		G4	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BEL/B3458/2003/G9P[8]		G9	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BEL/B4633/2003/G12P[8]		G12	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-tc/BRA/IAL28/1992/G5P[8]		G5	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/CIV/6736/2004/G8P[8]		*G8*	*P[8]*	*I1*	*R1*	*C1*	*M1*	*A1*	*N1*	*T1*	*E1*	*H1*
RVA/Human-wt/NGA/6717ARN/2002/G10P[8]		*G10*	*P[8]*	*I1*	*R1*	*C1*	*M1*	*A1*	*N1*	*T1*	*E1*	H1
RVA/Human-wt/BGD/Matlab36/2002/G11P[8]		G11	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-tc/USA/DS-1/1976/G2P1B[4]	DS-1-*like*	G2	P[4]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-wt/DEU/GER1H/2009/G8P[4]		G8	P[4]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-wt/BEL/B1711/2002/G6P[6]		G6	P[6]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-wt/COD/DRC88/2003/G8P[8]		G8	P[8]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-wt/COD/DRC86/2003/G8P[6]		G8	P[6]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-tc/IND/69M/1980/G8P4[10]		G8	P[10]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-wt/ZAF/GR10924/1999/G9P[6]		G9	P[6]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-tc/JPN/AU-1/1982/G3P3[9]	AU-1-*like*	G3	P[9]	I3	R3	C3	M3	A3	N3	T3	E3	H3
RVA/Human-tc/THA/T152/1998/G12P[9]		G12	P[9]	I3	R3	C3	M3	A12	N3	T3	E3	H6
RVA/Vaccine/USA/RotaTeq-WI79-9/1992/G1P7[5]	Vacunas	G1	P[5]	I2	R2	C2	M1	A3	N2	T6	E2	H3
RVA/Vaccine/USA/RotaTeq-SC2-9/1992/G2P7[5]		G2	P[5]	I2	R2	C2	M1	A3	N2	T6	E2	H3
RVA/Vaccine/USA/RotaTeq-WI78-8/1992/G3P7[5]		G3	P[5]	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T6	E2	H3
RVA/Vaccine/USA/RotaTeq-BrB-9/1996/G4P7[5]		G4	P[5]	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T6	E2	H3
RVA/Vaccine/USA/RotaTeq-WI79-4/1992/G6P1A[8]		G6	P[8]	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T6	E2	H3
RVA/Vaccine/USA/Rotarix-RIX4414/1988/G1P1A[8][c]		G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1

Los genotipos pertenecientes a la constelación Wa-like, DS-1-like y AU-1-like se muestran en verde, rojo y naranja, respectivamente. El genotipo P[6] se muestra en celeste y los genotipos típicamente bovinos se muestran en violeta y lila. Adaptado de Matthijnssens, 2012147.

Objetivo general

Estudiar la epidemiología de los rotavirus del grupo A en el Conurbano Bonaerense.

Objetivos particulares

-Determinar la incidencia de rotavirus del grupo A en niños con diarrea en un hospital materno-infantil del Conurbano Bonaerense entre 2004 y 2007.

-Determinar la frecuencia de detección de los genotipos G y P de rotavirus en las muestras positivas para rotavirus.

-Secuenciar el gen que codifica la proteína VP7 de las cepas más prevalentes durante el período analizado.

-Realizar un análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas obtenidas.

-Analizar las regiones antigénicas de VP7 en las secuencias aminoacídicas deducidas.

-Analizar la fluctuación temporal y geográfica de las cepas de rotavirus circulantes en la región.

Materiales y métodos

Muestras de materia fecal. Se analizó un total de 710 muestras de materia fecal de niños con diarrea aguda menores de 15 años que fueron atendidos en forma ambulatoria (en consultorios externos o guardia médica) en el Hospital Materno Infantil de San Francisco Solano, Quilmes, Gran Buenos Aires entre enero de 2004 y octubre de 2007. Este período incluyó cuatro temporadas de invierno durante las cuales los picos de incidencia de rotavirus ocurren normalmente entre mayo y julio. Las muestras se diluyeron al 10 % con PBS y se almacenaron a -20 ºC. Antes de utilizarlas, las diluciones de las muestras se vortexearon y centrifugaron a 1.000 g durante 10 minutos.

Diagnóstico de rotavirus del grupo A. Se empleó un ELISA desarrollado en el Laboratorio de Inmunología y Virología, UNQ10 para la detección de las muestras positivas para rotavirus del grupo A. El método consiste en un ELISA de captura que emplea anticuerpos policlonales de cabra anti-rotavirus. Se sensibilizaron placas de 96 wells con una dilución 1/250 de IgG purificada de cabra anti-rotavirus en buffer carbonato pH 9,6 incubando 1 hora a temperatura ambiente. Luego de cada una de las incubaciones, la placa se lavó tres veces con PBS-T (PBS, Tween-20 0,2 %). Las muestras a analizar se diluyeron en PBS-TC (PBS-T, caseína 1 %), se depositaron en los wells y se incubaron 1 hora a 37 ºC u overnight a 4 ºC. Luego del lavado se incubó con una dilución 1/1.000 de IgG purificada anti-rotavirus biotinilada en PBS-TC durante 1 hora a 37 °C, se lavó y se incubó 30 minutos con una dilución 1/4.000 de estreptavidina conjugada con peroxidasa (USBiologicals, Swampscott, MA, Estados Unidos) en PBS-TC. Finalmente, y luego de un último lavado, las placas se revelaron con orto-fenilendiamina 1 mg/ml (OPD) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) y peróxido de hidrógeno (0,03 % v/v) en buffer citrato, pH 5,0. Luego de 15 minutos de desarrollo de color la reacción se frenó con ácido sulfúrico 1 N y se determinó la densidad óptica a 490 nm (DO490) en un lector de microplacas Asys UVM 340 (Biochrom US, Holliston, MA, Estados Unidos), considerándose positivas aquellas muestras con DO490 mayor a 0,210.

Extracción de R A. Se diluyeron 100 µl de la muestra de materia fecal con 200 µl de Tris-HCl 50 mM. Se agregaron 300 µl de Vertrel XF (DuPont Chemicals, Wilmington DE, Estados Unidos), se vortexeó durante 1 minuto y se centrifugó durante 10 minutos a 3000 g. Se recuperaron 200 µl de sobrenadante y se combinaron con 400 µl de solución de lisis (isotiocianato de guanidinio 4 M, EDTA 0,02 M y Tritón X-114 (Sigma, St Louis MO, Estados Unidos) 0,01 %) y 40 µl de una suspensión de sílica preparada según fue descripto previamente27. Se vortexeó y se incubó a temperatura ambiente en agitación durante 15 minutos. Luego se centrifugó a 1000 g durante 1 minuto. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet de sílica con 600 µl de solución de

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

lavado (isotiocianato de guanidinio 4 M y EDTA 0,02 M). Luego se centrifugó nuevamente a 1000 g durante 1 minuto. A continuación se realizaron 3 lavados con 500 µl de etanol 70 %, centrifugando entre los lavados a 1000 g durante 1 minuto y después del tercer lavado, a 10.000 g durante 2 minutos. Se removió todo el sobrenadante y se secó a temperatura ambiente durante 10 a 15 minutos. Luego se resuspendió el pellet de sílica con 35 µl de agua destilada, se incubó a 65 ºC durante 10 minutos y se centrifugó a 10.000 g durante 2 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se repitieron todos los pasos desde la resuspensión con agua destilada para recuperar finalmente 60 µl de RNA. Se almacenó a -20 ºC. Antes de usar se incubó a 65 ºC durante 10 minutos y se centrifugó a 10.000 g durante 2 minutos. Esta técnica permitió obtener dsRNA purificado para su empleo en RT-PCR27.

RT-PCR. Para la RT-PCR se emplearon 0,6 µl del extracto de dsRNA como molde para la síntesis de cDNA de segmentos específicos de los genes de VP7 y VP4. Se empleó el kit comercial OneStep RT-PCR (QIAGEN, Hilden, Alemania) y los primers que fueron descriptos previamente (ver Tabla 4, Figura 7, Figura 8). En el caso de VP7 se emplearon RA1 y RA4101 que permiten amplificar el gen completo de VP7 (1062 pb) y en el caso de VP4 se emplearon con3dg y con2dg, primers basados en con3 y con2 90 que permiten amplificar un segmento del gen de VP4 (876 pb). Los 0,6 µl de molde se calentaron a 97 ºC durante 5 minutos con una mezcla de los dos primers específicos en un volumen final de 5 µl. La solución se enfrió rápidamente en hielo durante 2 minutos y se agregó la mezcla de reacción para la RT-PCR de manera que la concentración final de los primers fue 0,6 µM e incluyendo 6 unidades del inhibidor de ribonucleasa RNAsin (Promega, Madison, WI, Estados Unidos) en un volumen final de 10 µl. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Peltier Termal Cycler PTC-200 (MJ Research, Waltham, MA, Estados Unidos) en tubos de polipropileno de pared delgada. La RT se llevó a cabo a 45 ºC durante 30 minutos y a continuación, el perfil de ciclado de la PCR fue el siguiente: 15 minutos a 95 °C; treinta ciclos de 94 °C, 30 segundos; 45 °C, 30 segundos y 72 °C 75 segundos, seguidos por 10 minutos finales a 72 °C68.

Multiplex PCR. Como molde para la múltiplex PCR se emplearon 0,4 µl del amplicón obtenido por RT-PCR. Los primers de tipificación para los distintos genotipos G y P fueron descriptos previamente (ver Tabla 4, Figura 7, Figura 8). Para la detección de los genotipos G encontrados en humanos (pool GH1101 y pool GH258: G1-4, 8 y 9) o, cuando no pudieron ser tipificados con este pool, para genotipos G animales o raros en humanos (pool GA: G5, 6, 10 y 11)102, para la detección de genotipos P humanos (pool PH: P[4], [6], [8]-[10]) o de genotipos P animales (pool PA: P[1], [5] y [11])102. En el caso del pool de primers para la tipificación de los genotipos P humanos se reemplazó el primer de P[8] por el primer 1T-139. En el caso de los genotipos G el pool se empleó en combinación con RA4 (pool GH1) o 9con1 (pool GH2) y en el caso de los genotipos P el pool se empleó en combinación con con3dg.

El empleo de distintos conjuntos de primers para la tipificación de los genotipos G se debe a que se ha detectado que el primer de G1 del pool GH2 falla en detectar algunas cepas G1 que sí son identificadas por el primer de G1 del pool GH1187 y también se ha detectado que el primer de

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

G9 del pool GH1 da falsos resultados G3+G9 o G3 en cepas G9 que son correctamente detectadas por el primer G9 del pool GH2206.

En la mezcla de reacción para la PCR las concentraciones finales de los reactivos fueron: 0,5 µM de cada primer (excepto los primers comunes RA4, 9con1 y con3dg que se emplearon en el doble de concentración), 1,5 mM de MgCl2, 200 µM de dNTPs, 0,5 unidades de GoTaq DNA Polimerasa (Promega, Madison WI, Estados Unidos), 20 mM Tris-HCl pH 8,4 y 50 mM KCl en un volumen final de 10 µl. El perfil de ciclado fue el siguiente: un minuto a 94°C; treinta ciclos de 94°C, 30 segundos; 42°C, 30 segundos y 72°C un minuto, seguidos por 5 minutos finales a 72°C. Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en gel de agarosa 2 % Ultra Pure (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) con SYBR Safe (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) en buffer TAE (0,089 M Tris, 0,089 M acido acético y 0,002 M EDTA, pH 7,5) durante 45 minutos a 100 V y visualizados con el transiluminador Safe Imager Blue-Light (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos). En el mismo gel se corrió un marcador de peso molecular 100 pb (PB-L, Bernal, Argentina) y controles de tamaño molecular obtenidos por amplificación de cepas prototipo.

Tipificación de G12. Para la detección de este tipo G, se empleó un par de primers específicos jrg226 y jrg227 (ver Tabla 4)39. Fueron empleados individualmente en una PCR que utiliza como molde el producto de 1.062 pb obtenido en la RT-PCR del gen de VP7 con RA1 y RA4. ested PCR. En el caso de aquellas muestras a las que no se les pudo asignar un genotipo G, P o ninguno de los dos, se llevó a cabo una nested PCR con un primer interno que permitió discriminar entre muestras G o P no tipificables (NT) nested PCR positivas, y muestras no amplificables (NA) nested PCR negativas. En el caso de VP7 se empleó RA2 en combinación con RA498 y en el caso de VP4 se empleó con1dg2 en combinación con con2dg (ver Tabla 4, Figura 7, Figura 8).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Tabla 4. Primers para la amplificación y tipificación de VP7 y VP4.

Pool	Primer	Secuencia	Posición	Genotipo	Fragmento	Referencia
	RA1 (Beg9)	5' GGC TTT AAA AGA GAG AAT TTC CGT CTG G	1 - 28			101
	RA4 (End9)	5' GGT CAC ATC ATA CAA TTC TAA TCT AAG 3'	1062 - 1036			
.ested VP7	RA2	5' GGA CCA AGA GAA AAC GTA GC 3'	805-824	-	257 pb con RA4	98
	9con1	5' TAG CTC CTT TTA ATG TAT GG 3'	37 - 56			58
	9con2	5' GTA TAA AAT ACT TGC CAC CA 3'	922 - 941			
	aBT1	5' CAA GTA CTC AAA TCA ATG ATG G 3'	314 - 335	G1	749 pb con RA4	
	aCT2	5' CAA TGA TAT TAA CAC ATT TTC TGT G 3'	411 - 435	G2	652 pb con RA4	
	aET3	5' CGT TTG AAG AAG TTG CAA CAG 3'	689 - 709	G3	374 pb con RA4	
	aDT4	5' CGT TTC TGG TGA GGA GTT G 3'	480 - 498	G4	583 pb con RA4	
Pool GH1	aAT8	5' GTC ACA CCA TTT GTA AAT TCG 3'	178 - 198	G8	885 pb con RA4	
(Humano)	aFT9	5' CTA GAT GTA ACT ACA ACT AC 3'	757 - 776	G9	306 pb con RA4	
	9T-1deg2	5' TYT WGT YAA RGC AAA TAA TG 3'	176 - 195	G1	158 pb con 9con1	
	9T-2	5' GTT AGA AAT GAT TCT CCA CT 3'	262 - 281	G2	244 pb con 9con1	
	9T-3	5' GTC CAG TTG CAG TGT AGT 3'	484 - 501	G3	466 pb con 9con1	
	9T-4	5' GGG TCG ATG GAA AAT TCT 3'	423 - 440	G4	403 pb con 9con1	
Pool GH2	9T-9B	5' TAT AAA GTC CAT TGC AC 3'	131 - 147	G9	110 pb con 9con1	58
	FT5	5' CAT GTA CTC GTT GTT ACG TC 3'	779 - 760	G5	780 pb con RA1	
	DT6	5' CTA GTT CCT GTG TAG AAT C 3'	499 - 481	G6	500 pb con RA1	
	HT8	5' CGG TTC CGG ATT AGA CAC 3'	273 - 256	G8	274 pb con RA1	
	HT10	5' TTC AGC CGT TGC GAC TTC 3'	714 - 697	G10	715 pb con RA1	
Pool GA (Ani	BT11	5' GTC ATC AGC AAT CTG AGT TGC 3'	336 - 316	G11	337 pb con RA1	102
	jrg226	5' TCG TCA TGC TGC CAT TTA 3'	173-190			39
	jrg227	5' GTC CAG TCG GGA TCA GTT 3'	327-344			
	con2dg	5' ATT YCN GRC CAY TTA TAH CC 3'	868 - 887	-		90
	con3dg	5' TGS YKW SBY TMA TTT ATA GAC A 3'	11-32			
.ested VP4	con1dg	5' YTR CCA CCM ATK CAR AAT AC 3'	686 -705	-	201 pb con	2
	jrg237	5' TCT ACT GGG TTA ACG TGC 3'	339 - 356	P8	345 pb con	39
	2T-1	5' CTA TTG TTA GAG GTT AGA GTC 3'	474 - 494	P4	483 pb con	
	3T-1	5' TGT TGA TTA GTT GGA TTC AA 3'	259 - 278	P6	267 pb con	
	4T-1	5' TGA GAC ATG CAA TTG GAC 3'	385 - 402	P9	391 pb con	
Pool PH	5T-1	5' ATC ATA GTT AGT AGT CGG 3'	575 - 594	P10	583 pb con	
	pNCDV	5' CGA ACG CGG GGG TGG TAG TTG 3'	269 - 289	P1	622 pb con	
	pUK	5' GCC AGG TGT CGC ATC AGA G 3'	336 - 354	P5	555 pb con	
Pool PA (Ani	pB223	5' GGA ACG TAT TCT AAT CCG GTG 3'	574 - 594	P11	314 pb con	102

Figura 7. Primers para genotipos G.

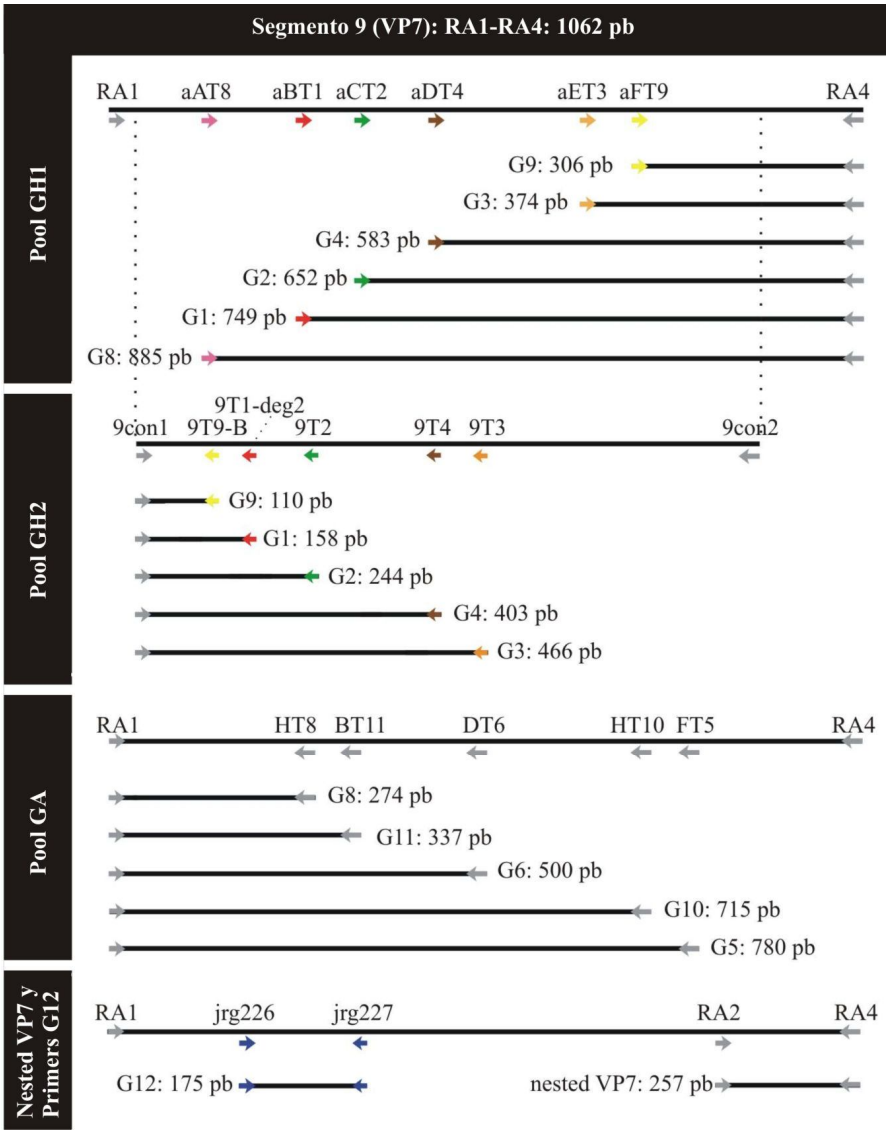
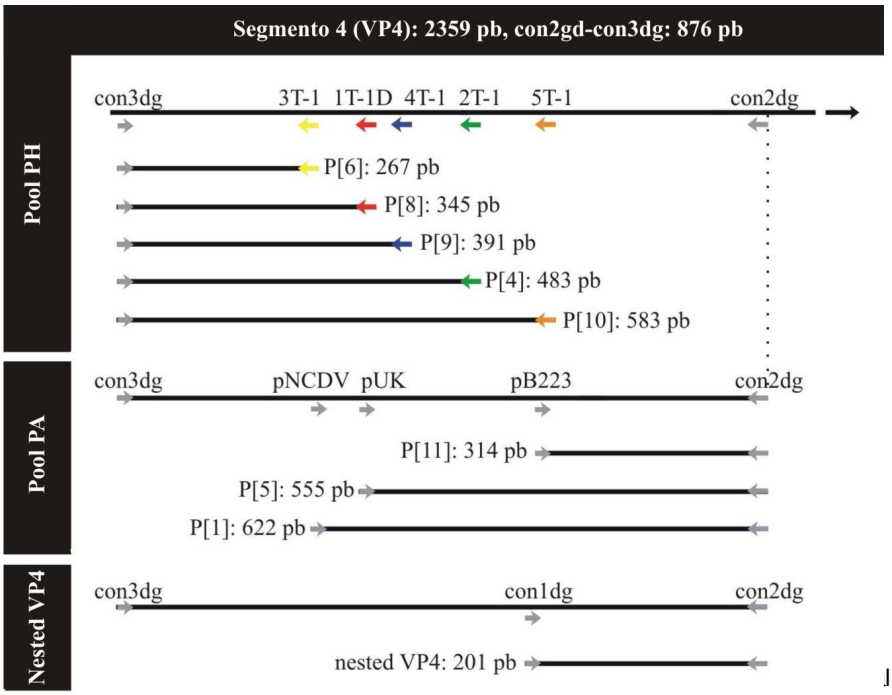


Figura 8. Primers para genotipos P.



Secuenciamiento nucleotídico. Se seleccionaron 12 de las muestras tipificadas como genotipo G9 aisladas en 199939, 2005, 2006 y 2007; y cuatro muestras tipificadas como G2 aisladas en 199710 y 2007. El amplicón que se utilizó para el secuenciamiento fue obtenido a partir de una PCR con los primers 9con1 y 9con2 (ver Tabla 4 y Figura 8). El producto de amplificación fue purificado del gel empleando el kit QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania) y secuenciado con un secuenciador automático ABI3730XL y el kit Big Dye Terminator (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) a través del servicio prestado por Macrogen Inc., Seúl, República de Corea. Las secuencias nucleotídicas fueron cargadas en la base de datos GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) y se les asignaron los siguientes números de acceso: GQ154522–GQ154534 (cepas G9) y GQ154535–GQ154538 (cepas G2).

Análisis filogenético. Las secuencias obtenidas fueron alineadas con el programa ClustalX con secuencias de genotipo G9 o G2 disponibles en la base de datos GenBank y las relaciones filogenéticas entre las secuencias se establecieron por medio del paquete de programas MEGA 4.0218 empleando el método neighbor-joining con el cálculo de distancias por Kimura 2 parámetros. El significado estadístico de los árboles filogenéticos construidos fue estimado por el método bootstrap (1.000 réplicas).

Resultados y discusión

Detección de rotavirus en muestras de materia fecal

Se llevó a cabo la detección de rotavirus del grupo A por ELISA en 170 muestras de materia fecal, de las cuales 140 (19,7 %) fueron positivas (Tabla 5). Este porcentaje fue similar al encontrado en la misma área en estudios previos realizados en muestras de pacientes atendidos en forma ambulatoria39 y es típico de poblaciones de nivel socioeconómico relativamente bajo, en las cuales son cuantitativamente importantes las diarreas causadas por bacterias y parásitos. De esta manera al aumentar la cantidad de diarreas totales, disminuye la incidencia porcentual de rotavirus. Sin embargo, cabe destacar que los porcentajes hallados en este estudio son característicos de las presentaciones moderadas a leves del paciente ambulatorio y que los porcentajes de positividad de RVA se incrementan a un aproximado del 40 % cuando se trabaja con pacientes internados, documentando la mayor severidad típica de las diarreas por este agente.

Tabla 5. Incidencia de rotavirus grupo A entre 2004 y 2007.

Número de muestras positivas / número de muestras analizadas (%)					
Año	2004	2005	2006	2007	Total
Muestras RVA	49/250 (19,6)	42/168 (25,0)	13/141 (9,2*)	36/151 (23,8)	140/710 (19,7)

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Infecciones mixtas	9/49 (18,4)	7/42 (16,7)	4/13 (30,8)	5/36 (13,9)	25/140 (17,9)

Se indica el porcentaje de muestras positivas para rotavirus del grupo A y el porcentaje de infecciones mixtas (muestras en las que se detectó más de un genotipo G o P). RVA: rotavirus grupo A, *: baja frecuencia de detección debido a una sobrerepresentación de muestras en los meses de verano.

Los pacientes para los que se pudo obtener información clínica completa, presentaron vómitos (81,0 %), fiebre (68,0 %) y deshidratación leve a moderada (68,0 %). Los pacientes tenían entre 1 mes y 13 años de edad (media: 2,4 años, mediana: 1,5 años). La mayoría fue menor de 3 años (81,0 %) (Figura 9). El conjunto de estos aspectos que caracterizan las infecciones por rotavirus difieren en niños de países desarrollados y países en desarrollo. En el caso de nuestra región, algunas características son típicas de la epidemiología en países desarrollados: 1) la baja mortalidad, 2) la mayor prevalencia en invierno39 y 3) sólo el 50 % de los niños se infectan con rotavirus en el primer año de vida (en contraste a 80 % en países en desarrollo) con una mediana de 1,5 años para la primoinfección (en contraste a 6 a 9 meses en países en desarrollo)30. Sin embargo, tanto la prevalencia (19,7 %) como el importante porcentaje de infecciones mixtas detectado (17,9 %) es característico de medios en los cuales las condiciones higiénico-sanitarias son deficientes y los inóculos virales mayores30, 114.

Figura 9. Distribución etaria de los pacientes con infección por rotavirus.
En el gráfico se muestra la frecuencia relativa para cada grupo etario con un intervalo de 6 meses (0,5 años) en el eje izquierdo y la frecuencia acumulada en el eje derecho. Se muestran dos líneas de la cuadrícula para resaltar el 0,5 y el 0,8 de la frecuencia acumulada.

Prevalencia de genotipos G y P

Entre los genotipos G detectados, G2 (38,1 %) fue predominante, seguido de G9 (36,9 %), G1 (12,5 %), G4 (6,9 %), G3 (3,8 %) y G12 (1,9 %). Entre los genotipos P detectados, P[8] (45,9 %) fue predominante, seguido por P[4] (33,8 %) y P[6] (2,0 %). Los genotipos P[9] y P[10] se detectaron en sólo una muestra cada uno. Todas las muestras pudieron ser tipificadas para genotipos G, pero un 16,9 % de las muestras no pudo ser tipificada para genotipos P (Tabla 6, Figura 10 y Figura

11). En total, se pudieron identificar todos los genotipos G y P más comunes que circulan globalmente.

En cuanto a la combinación de genotipos (Tabla 7), G9P[8] fue la más detectada durante el período 2004-2007, alcanzando un 30,0 % del total, seguida por G2P[4] (21,4 %). Ambas combinaciones de genotipos fueron detectadas en muestras en todos los años: G9P[8] fue la más común en 2005 y 2006, mientras que G2P[4] fue la más común en 2004 y 2007 (Tabla 7 y Figura 10). También se detectaron muchas combinaciones de genotipos poco comunes, como G1P[4], G2P[8], y G9P[4]. Estos son eventos probablemente relacionados al hecho de que se encontraron muchos genotipos G y P distintos en infecciones mixtas (Tabla 7). Un hallazgo notable fue la detección del genotipo G12 en 2004 y 2007 con una baja frecuencia (3,5 y 2,5 % respectivamente).

Durante el período estudiado se observaron marcadas fluctuaciones en la distribución de los genotipos. La frecuencia de G1 disminuyó de 29,8 % en 2004 a 2,0 % al año siguiente y se mantuvo en frecuencias bajas durante el resto del período. El genotipo P[8], más comúnmente asociado a G1, no disminuyó de la misma manera, dado que se detectó (y en frecuencias mayores de hasta 81,8 % en 2005) en otras de las combinaciones comunes: principalmente cepas G9P[8], pero también G3P[8] y G4P[8]. Por otro lado los genotipos G2 y P[4] presentaron una fluctuación temporal en paralelo, ya que no se detectó la combinación de P[4] con otros genotipos en frecuencias elevadas. De esta manera durante 2005, cuando la frecuencia de G2 disminuyó al 16,0 %, los porcentajes de detección de P[4] copiaron esta disminución (Figura 11).

Tabla 6. Distribución y frecuencia de los genotipos detectados entre 2004 y 2007.

Año	2004		2005		2006		2007		Total 2004-2007	
Genotipo	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
G1	17	29,8	1	2,0	0	0,0	2	5,0	20	12,5
G2	25	43,9	8	16,0	5	38,5	23	57,5	61	38,1
G3	2	3,5	4	8,0	0	0,0	0	0,0	6	3,8
G4	3	5,3	8	16,0	0	0,0	0	0,0	11	6,9
G9	8	14,0	29	58,0	8	61,5	14	35,0	59	36,9
G12	2	3,5	0	0,0	0	0,0	1	2,5	3	1,9
Total	57	100,0	50	100,0	13	100,0	40	100,0	160	100,0
P[8] P[4] P[6]	13	26,0	36	81,8	11	64,7	8	21,6	68	45,9
P[9] P[10] P T* Total	18	36,0	5	11,4	5	29,4	22	59,5	50	33,8

Se indica el porcentaje de muestras positivas para cada genotipo. *: PNT, P no tipificable.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

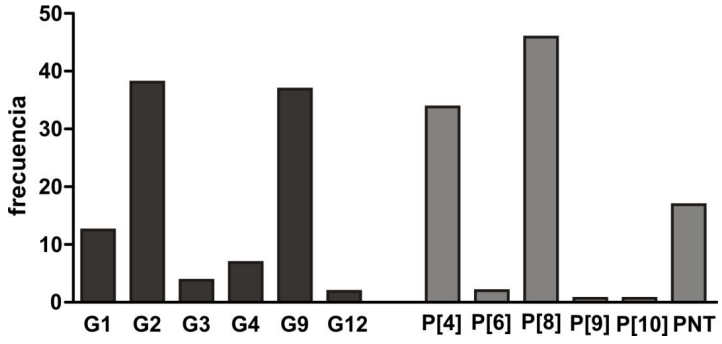


Figura 10. Frecuencia de los genotipos G y P detectados entre 2004 y 2007.

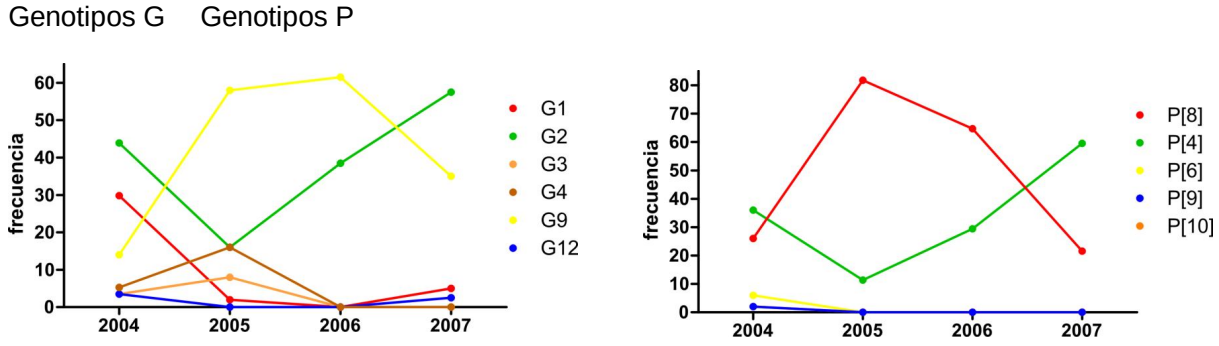


Figura 11. Frecuencia de genotipos G y P detectados por año.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Tabla 7. Distribución y frecuencia de combinaciones de genotipos entre 2004 y 2007.

Año	2004		2005		2006		2007		Total 2004-2007	
Combinación*	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
G1P[4]	5	10,2					2	5,6	7	5,0
G1P[6] G1P[8]	1	2,0							1	0,7
G1P[10] G1P T	3	6,1							4	2,9
	1	2,0	1	2,4					1	0,7
G2P[4]	10	20,4	3	7,1	1	7,7	16	44,4	30	21,4
G2P[8]	1	2,0							1	0,7
G2P T G3P[8]	8	16,3			1	7,7	3	8,3	12	8,6
G4P[8] G4P T G9P[4] G9P[6]									1	0,7
	1	2,0	1	2,4					2	1,4
			1	2,4					2	1,4
	1	2,0	2	4,8					2	1,4
G9P[8]	2	4,1	26	61,9	7	53,8	7	19,4	42	30,0
G9P T	1		1	2,4			2	5,6	4	2,9
G12P[9]	1								1	0,7
G1+2P[4]	1								1	0,7
G1+2P[8]	2	4,1							2	1,4
G2+4P[8] G2+4P T G2+9P[4]	1	2,0							1	0,7
G2+9P[8] G2+9P T G2P[4+8]	1	2,0							1	0,7
G2+3+4P[8]									1	0,7
G2+3P[4+8]										
G2+4P[4+8]							1	2,8	1	0,7
G3+9P[8]										
G4+9P[8]			1	2,4					2	1,4
G4P[4+8]										
G9P[4+8]							2	5,6	4	2,9
G9P[6+8]										
G12+2P[4]							1	2,8	2	1,4
G12+9P[4]					3	23,1			1	0,7
			2	4,8					1	0,7
			1	2,4					2	1,4
			1	2,4					1	0,7
	2	4,1							1	0,7
Total	49	100,0	42	100,0	13	100,0	36	100,0	140	100,0

Se indica el porcentaje de muestras en las que se detectó cada combinación de genotipos G y P. Las combinaciones más prevalentes se muestran resaltadas. *: PNT, P no tipificable.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Los resultados presentados en esta tesis, junto con resultados previos (1996-2003) 10, 39 y posteriores (2008-2011)135 completan 16 años de vigilancia continua de los genotipos de rotavirus. Esta gran cantidad de información permite establecer el patrón natural de fluctuación de las frecuencias de genotipos en una misma área (Figura 12). Dos características notables surgen de este análisis: primero, que las cepas G9P[8] que no habían sido detectadas previamente en Buenos Aires, fueron las predominantes entre 2004 y 2007, y segundo, que las cepas G2P[4] que no se habían detectado desde 1999, reaparecieron en 2004 alcanzando una prevalencia de 57,5 % en 2007. Durante 1998 y 1999 se detectaron cepas G9P[6] en Argentina24, 39 y desde 2004, el genotipo G9 reapareció con una frecuencia mucho más alta pero asociado a P[8]. Otras características son destacables en cuanto a la distribución en el tiempo en el área estudiada y en el contexto de los resultados previos y posteriores en Argentina:

a) El genotipo G3 no se detectó en Argentina en frecuencias elevadas desde las primeras cepas identificadas en 198312, 38 hasta el período 2008-2010 cuando alcanzaron frecuencias que oscilaron entre 25 y 50 %135.

b) El genotipo G4 fue el más común durante 2000 y 2001, pero su frecuencia fue disminuyendo y no fue detectado en 2006 ni 2007. En 2008 alcanzó un 17,5 % de los genotipos pero volvió a disminuir a niveles indetectables entre 2009 y 2011.

c) Se observó un patrón similar para G1, un genotipo que fue el más común durante 2002 y 2003 pero disminuyó constantemente hasta 2006 cuando fue indetectable, volviendo a circular en bajas frecuencias a partir de 2008.

d) Entre 1999 y 2002 se detectaron bajas frecuencias del genotipo emergente G12 en combinación con P[9]39, así como también en 2004 y 2007 (esta tesis). La frecuencia de este genotipo se incrementó marcadamente en 2009 (44,0 %), pero en combinación con P[8]135. Tanto en este caso como en el de G9, los incrementos de años posteriores a las detecciones iniciales se deben a la introducción de cepas pertenecientes a linajes o clados distintos de amplia distribución global (ver análisis de secuencia más abajo).

e) La distribución de los tipos P siguió un patrón con elevadas frecuencias del genotipo P[8] asociado con G1 y G4 entre 1999 y 2003, luego combinado con G9 en 2005 y 2006 y durante el período 2008-2010, con G3 y G12. De la misma manera, el genotipo P[4] fue prevalente en los períodos 1996-1998, 2004-2007 y en 2011, siempre en su combinación clásica con G2.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

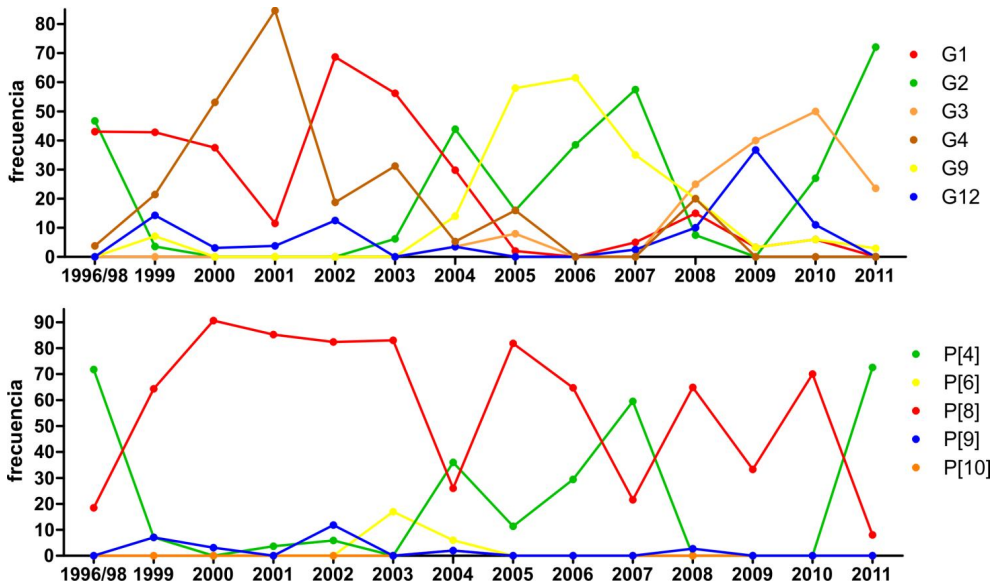


Figura 12. Fluctuación de la frecuencia de genotipos durante 16 años en Buenos Aires. La frecuencia se calculó en relación al total de genotipos tipificados por año. Los gráficos (superior para los genotipos G e inferior para los genotipos P) se obtuvieron a partir de estudios realizados entre 1996 y 199810, entre 1999 y 200339, entre 2004 y 2007 (esta tesis) y entre 2008 y 2011135.

Análisis de secuencias del genotipo G9

La primera descripción de rotavirus del genotipo G9 fue en la década de 198045. Poco después dejaron de detectarse hasta una década más tarde cuando reemergieron a mediados de la década de 1990. En una visión global, el genotipo G9 pasó a ser el quinto más detectado en humanos y fue reportado como el primero o segundo más prevalente en muchos países205. En Brasil, se detectó G9 por primera vez en el estado de Río de Janeiro entre 1997 y 1999 en un 15,9 % de las muestras207, en São Paulo entre 2000 y 2003 en un 17,2 %35 y en Salvador, Bahía entre 1999 y 2002 en un 78,8 %208. En Paraguay entre 2002 y 2005 se detectó G9 en un 36,2 %174 de las muestras analizadas mientras que en Ecuador se detectó entre un 72 y 96 % entre 2003 y 200670.

Los porcentajes de cepas G9 detectadas en Argentina se han incrementado desde su primera identificación en 1996 cuando las frecuencias eran muy bajas, hasta el período estudiado, cuando G9 fue uno de los genotipos más prevalentes entre 2005 y 2007. En este trabajo se lo detectó durante todas las temporadas entre 2004 y 2007 con un pico de prevalencia en 2005 (62,2 %). En el año 2006 representó la mitad de los genotipos detectados.

Debido a la elevada prevalencia del genotipo G9 durante el período estudiado, se seleccionaron muestras para ser sometidas al secuenciamiento de un fragmento de 904 pb del gen que codifica la proteína VP7. Las secuencias de 12 muestras G9P[8] que circularon entre 2005 y 2007, presentaron un elevado porcentaje de identidad con la cepa argentina G9P[6] (Arg562) aislada en 1999 (98,5 % - 100 % y 98,8 % - 100 % de identidad aminoacídica y nucleotídica, respectivamente) y con una cepa G9P[8] patrón (AU32) (98.5 % - 99.3 % y 98.5 % - 99.3 % de identidad aminoacídica y nucleotídica respectivamente).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

En Brasil y en Argentina, los genotipos G9 detectados hacia fines de la década de 1990 se encontraban principalmente en la combinación G9P[6], aunque entre 1997 y 1999 habían sido detectados en forma creciente en combinación con P[8] en Río de Janeiro207. A partir del 2000 en Brasil y en Paraguay, y en 2004 en Argentina el genotipo G9 se comenzó a detectar en forma casi exclusiva en la combinación G9P[8]. Dados estos antecedentes de la región Sudamericana, se realizó el estudio filogenético de las secuencias de los aislados locales buscando relaciones con las secuencias disponibles en GeneBank de Brasil y Paraguay y con las argentinas correspondientes a cepas G9 que circularon en años anteriores.

El análisis filogenético de secuencias del gen de VP7 de cepas G9 (incluyendo desde los primeros aislamientos hasta los más recientes) demostró la existencia de al menos seis linajes diferentes. La mayoría de los rotavirus G9 que circulan actualmente en el mundo pertenecen al linaje III181. Como se muestra en la Figura 13 todas las secuencias de genotipo G9 obtenidas, pertenecen al linaje III y presentan una identidad nucleotídica entre 97,1 % y 99,9 % cuando se comparan con las cepas de Paraguay y Brasil. Esto implica una relación filogenética cercana entre todos los aislamientos, aunque cuando se comparan las cepas G9P[6] con las G9P[8] se advierte un cambio aminoacídico (T→I) en la posición 171 conservado entre las cepas G9P[6] argentinas y brasileñas. La simultaneidad cronológica en la emergencia de cepas similares y la gran similitud de secuencias entre los aislamientos de G9 son datos que tomados en conjunto ilustran y sugieren que los ambientes epidemiológicos de los países del Cono Sur están relacionados.

Comparación de las regiones antigénicas de las cepas G9

El patrón de sustituciones aminoacídicas dentro de las regiones antigénicas de VP7 de las cepas G9 se analizó por medio de un alineamiento en el que se empleó la secuencia de la cepa G9 patrón AU32 como consenso. En todas las cepas argentinas G9 se identificaron los mismos cinco cambios aminoacídicos (región A posición 87 (A→T), región B posición 149 (K→E), región C posición 208 (T→I), posición 220 (A→T) y región F posición 242 (T→N) excepto en la cepa Arg2366 aislada en el año 2007, en la que sólo se detectaron cuatro de estas sustituciones (Tabla 8). La sustitución aminoacídica en la posición 208 es característica de los linajes distintos del III. En este caso, sin embargo, es el resultado de un cambio nucleotídico diferente (ATT→ACT) del que codifica treonina en otros linajes (ACA). Al comparar las cepas argentinas con otras cepas G9 aisladas en la región, se encontró que en la mayoría de los casos las regiones antigénicas fueron idénticas.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

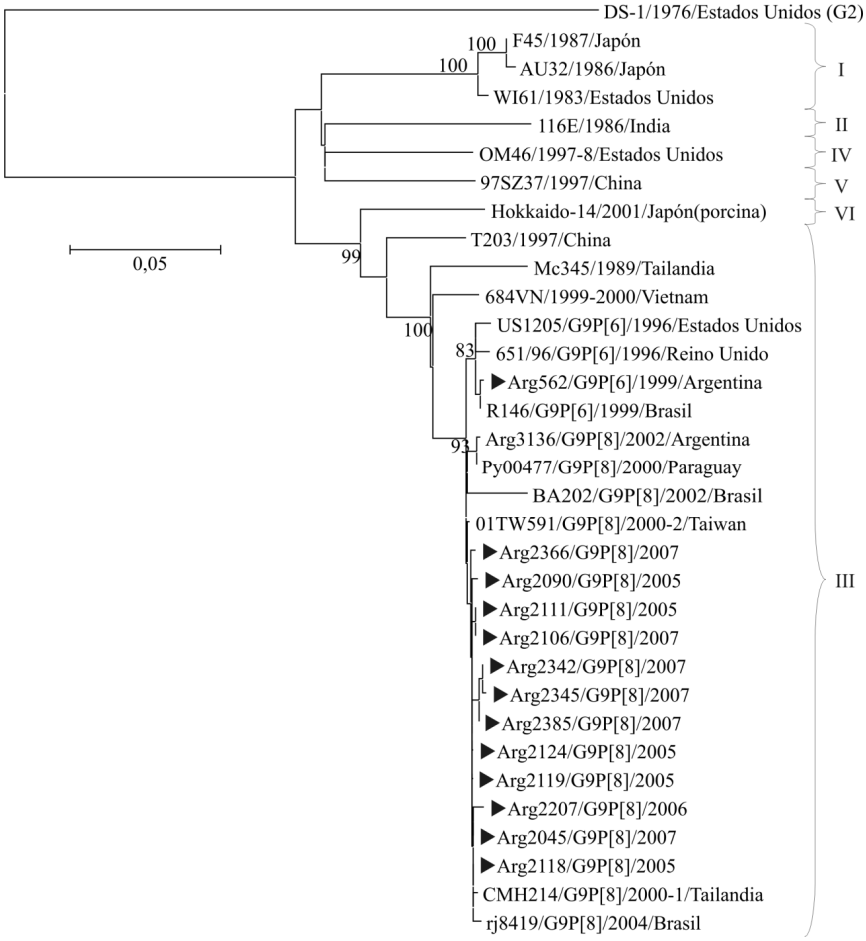


Figura 13. Análisis filogenético de cepas G9.

El árbol filogenético fue construido a partir de las secuencias de VP7 de cepas G9 obtenidas de la base de datos GenBank. Los linajes se indican en números romanos a la derecha y los valores de bootstrap se muestran en cada nodo (no se muestran los valores menores a 80 %). Las cepas argentinas aisladas entre 2004 y 2007 se señalan con un triángulo relleno. Para cada cepa se indica nombre/año de aislamiento/país de origen y en el caso de las cepas del linaje III se indica el genotipo P asociado. Una cepa prototipo G2 (DS-1) se incluyó como outgroup.

Análisis de secuencias del genotipo G2

Las cepas G2P[4] han presentado una prevalencia variable de acuerdo al continente o subcontinente según lo indica un trabajo de revisión que analiza el período comprendido entre 1973 y 2003: Latinoamérica (23 %), África (2 %), Asia (13 %), Norteamérica (11 %), Europa (9 %) y Oceanía (14 %)205. En muchos estudios se ha descripto un patrón cíclico de ocurrencia de G2 cada 10 años aproximadamente21, 125, 141. Además, se ha detectado en frecuencias elevadas (68 % a 81 %) en distintos países latinoamericanos como Honduras, Paraguay y Brasil4, 125, 130 en ausencia de programas nacionales de vacunación contra rotavirus. En el caso de Brasil, se detectaron en el norte del país prevalencias entre 59,9 % y 91 % en 2006 (previo a la introducción de la vacuna), luego de cinco años en los que la prevalencia del genotipo G2 se mantuvo alrededor del 2 %130.

En cuanto a los resultados presentados en esta tesis, en conjunto con los obtenidos en otros estudios realizados en el mismo área10, 39, 135, el genotipo G2 fue detectado en frecuencias cercanas al 50 % en 1996-1998 y no fue detectado en los siguientes cinco años. A partir de 2003 volvió a detectarse con picos de frecuencia en 2004, 2007 (esta tesis) y 2010-2011 (Figura 12). Luego de un año de ausencia en 2009, este genotipo alcanzó casi la mitad de los genotipos detectados en 2010 y más del 70 % en 2011135.

Debido a la elevada prevalencia del genotipo G2 durante el período estudiado, se seleccionaron muestras de los años 1997 y 2007 para ser sometidas al secuenciamiento de un fragmento de 904 pb del gen que codifica la proteína VP7. Las secuencias de las muestras de genotipo G2 aisladas en 1997 y en 2007 comparten un elevado porcentaje de identidad nucleotídica (96,5 % - 100,0 %) y aminoacídica (97,6 % - 100,0 %). Al compararlas con la cepa G2 patrón DS-1, las cepas argentinas divergen 13,6 % - 14,3 % y 3,5 % - 5,1 % en sus secuencias nucleotídica y aminoacídica, respectivamente. La secuencia nucleotídica de las cepas G2 aisladas en 1997 están más relacionadas entre sí que con las aisladas en 2007. Al comparar las secuencias aminoacídicas, se identificaron seis sustituciones en las posiciones 36 (K→R), 37 (F→L), 44 (I→M), 55 (M→I), 132 (Q→R) and 213 (N→D) entre las cepas aisladas en 1997 y 2007, respectivamente.

El análisis filogenético indicó que las cepas argentinas G2P[4] pertenecen al linaje II (Figura 14). Las cepas argentinas formaron grupos separados según el año de aislamiento. Las cepas aisladas en 1997 y 2007 demostraron estar más relacionadas entre sí que con el grupo de cepas G2 aisladas entre 2010 y 2011. Es destacable que tres cepas G2 que circularon en Brasil durante 2008-2009 se agruparon con las cepas argentinas aisladas en 2010 y 2011, mientras que algunas secuencias de cepas G2 aisladas en Brasil durante 2005-2006, agruparon con las cepas argentinas aisladas en 200795. Estos resultados son consistentes con la hipótesis de introducción en Argentina de ciertas cepas G2P[4] desde Brasil. En contraste, otras cepas regionales aisladas en Brasil en 2002 pertenecen al linaje III y no se han reportado cepas relacionadas en Argentina.

Comparación de las regiones antigénicas de las cepas G2

El patrón de sustituciones aminoacídicas dentro de las regiones antigénicas de VP7 entre las cepas G2 se analizó por medio de un alineamiento y empleando la secuencia de la cepa G2 patrón DS-1 como prototipo por ser la incluída en la formulación vacunal. Se identificaron tres cambios aminoacídicos en las regiones A y F de las cepas argentinas G2 aisladas en 1997 (región A: posición 87 (A→T), posición 96 (D→N) y región F posición 242 (N→S), y una sustitución adicional en la región C posición 213 (N→D), en el caso de las cepas aisladas en 2007 (Tabla 8). Además, sólo se detectó un cambio aminoacídico en las regiones antigénicas de VP7 al comparar las cepas G2 aisladas en 1997 y en 2007. Las regiones antigénicas fueron 100 % idénticas al comparar las cepas aisladas en 2007 con aislamientos más recientes obtenidos en el país (2010-2011), así como también con cepas brasileñas aisladas entre 2005 y 200995, 135.

Influencia de la vacunación sobre la diversidad de genotipos

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

En teoría, cualquier vacuna que incluya una o un número limitado de cepas de rotavirus que generen distintos niveles de protección, presentará diferencias en cuanto a su eficacia frente a distintos genotipos. Por lo tanto, la vacunación tendrá una influencia en la distribución de los genotipos circulantes36, 103, 146, 162. A pesar de que es difícil individualizar los efectos de todos los factores que pueden afectar esta distribución en una población no vacunada, existe una diferencia importante al considerar la presión selectiva inducida por la vacunación en masa. En este caso, a los niños se les administran dos o tres dosis de cepas de rotavirus atenuadas, a edades de entre 6 y 8 meses. El efecto de esta exposición programada a cepas específicas, ejerce una presión unidireccional que favorecería la selección de cepas de rotavirus que sean relativamente distintas de las cepas vacunales. Por el contrario, la exposición natural a rotavirus es esporádica, incluye un rango muy amplio de genotipos y a priori no favorece la selección de genotipos particulares. Si la presión selectiva ejercida por una vacunación masiva es dominante respecto de los restantes factores que pueden afectar la distribución de genotipos en una población, podrían detectarse cambios marcados en el patrón de circulación. Distintos estudios han demostrado un enriquecimiento de cepas G3P[8] en áreas donde se administró RV5 y un enriquecimiento de cepas G2P[4] en áreas donde se administró RV1146, 176, 242.

En particular, en Brasil la vacuna RV1 se incluyó en el programa de vacunación nacional en marzo de 2006 y desde entonces se observó un aumento en la prevalencia de cepas G2P[4], la cual ha sido identificada en algunos estudios como responsable del 100 % de los casos de gastroenteritis analizados28, 36, 37, 44, 50, 86, 113, 125, 134. Existen distintas posiciones en cuanto a si este fenómeno fue causado por la vacunación o no. Por un lado, se ha sugerido que se debería a la fluctuación natural de este genotipo dado que en otros países que limitan con Brasil también fue elevada la frecuencia de detección de G2 poco después de 2006, considerando además que en esos países no se había introducido la vacuna125, 142. Argentina y Brasil presentaron patrones similares de fluctuación de G2, dada su prevalencia entre 1996-1998 en Río de Janeiro (34 %)8 y en Buenos Aires (43 %)10; así como en los resultados obtenidos en esta tesis entre 2006-2007 para Buenos Aires (53 %) y en Brasil (80 %)125.

Sin embargo, también puede notarse que en los países limítrofes el aumento en la prevalencia de G2 luego del año 2006 no fue tan marcado como en Brasil. Este argumento se complementa con la hipótesis de que la introducción de la vacuna en el país más grande de la región (con una población que corresponde al 50 % de la población de Latinoamérica) podría haber influenciado la distribución de genotipos en sus países limítrofes. No obstante, para confirmar la identidad de las cepas en las distintas regiones y desarrollar una hipótesis más firme sobre su distribución temporal y espacial, sería necesaria una caracterización del genoma completo de las mismas.

Por otra parte, se observó una desaparición virtual de las cepas G1P[8] durante 2006 y 2007. Este es un evento notable, ya que además de ser la cepa más común en humanos, raramente se detectó en frecuencias inferiores al 10 % en Latinoamérica entre 1995 y 200440. Este descenso marcado también se observó en Paraguay y Brasil previamente al 200636, 125, 140, no

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

influenciado por la introducción de la vacuna. En particular en Argentina, G1 no estuvo entre los genotipos predominantes desde 2004 y se mantuvo en frecuencias muy bajas hasta 2011135.

En este trabajo, también se identificaron cepas G12, pertenecientes al genogrupo o constelación de genotipos AU-1-like41. Estas cepas se detectaron en bajas frecuencias desde 1999 en Argentina y más recientemente en Brasil y Paraguay39, 140, 182. Las cepas G12P[9] no comparten antígenos con la vacunas RV1 y RV5, por lo que se deberá monitorear el nivel de protección que inducirán las vacunas frente a este tipo de cepas.

Figura 14. Análisis filogenético de cepas G2.

El árbol filogenético se construyó a partir de las secuencias nucleotídicas de VP7 de cepas G2 obtenidas de la base de datos GenBank. Los linajes se indican en números romanos a la derecha y los valores de bootstrap se indican en cada nodo (no se muestran los valores menores a 80 %). Las cepas argentinas aisladas en 1997 y 2007 se señalan con un triángulo relleno, mientras que otras cepas argentinas secuenciadas en 2010 y 2011 se señalan

con un triángulo vacío135. Para cada cepa se indica nombre/año de aislamiento/país de origen. Una cepa prototipo G1 (Wa) se incluyó como outgroup.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Tabla 8. Comparación de las regiones antigénicas A, B, C, y F de VP7 de cepas G9 y G2.

| Sequence | VP7 Antigenic Regions | | |

Conclusiones

Mantener una vigilancia de la diversidad de las cepas de rotavirus en una misma comunidad a lo largo del tiempo provee información importante sobre la introducción, evolución y diseminación de cepas nuevas, así como para evaluar la influencia de la introducción de una vacuna en los patrones de circulación de las distintas cepas. En esta primer parte del trabajo, se caracterizaron los genotipos G y P correspondientes a las proteínas VP7 y VP4 respectivamente, en un área cercana a la ciudad de Buenos Aires entre 2004 y 2007. Estos resultados en conjunto con estudios previos10, 39 y posteriores135, completan más de 15 años de vigilancia continua. Esto ha permitido establecer el patrón natural de fluctuación de los distintos genotipos en una misma área en la que aún no se ha incorporado al programa nacional de inmunizaciones ninguna de las vacunas disponibles contra rotavirus.

En total, la distribución de genotipos resultó similar a la encontrada globalmente: se detectaron las cinco cepas más comunes: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] y G9P[8]91, 205. Durante el período estudiado (2004-2007), las cepas más prevalentes fueron G2P[4] y G9P[8] y las secuencias de estos genotipos G se analizaron con más profundidad. Sin embargo, también se detectaron otras menos frecuentes (como G12, P[9], P[6] y P[10]) y un alto porcentaje de infecciones mixtas.

La frecuencia elevada de infecciones mixtas (17,9 %) durante el período estudiado es de interés debido a que facilitan la evolución del virus por reasociación de segmentos. Estas coinfecciones se han documentado mejor en entornos pobres donde las infecciones entéricas son más comunes91. Se han llegado a detectar frecuencias de hasta 44,0 % con un promedio de 12,0 % en Latinoamérica40. Para mejorar la investigación sobre la frecuencia de reasociación y su influencia en la evolución de los rotavirus del grupo A, es necesario contar con información completa sobre todos sus segmentos de manera de identificar el origen de cada uno en lugar de sólo estudiar sus componentes G y P. Este tipo de tarea es la que se lleva a cabo actualmente en nuestro laboratorio y en otros interesados en la epidemiología y evolución de los rotavirus.

A medida que las vacunas contra rotavirus se introduzcan en los calendarios de vacunación de más países regionales, incluyendo Argentina, será cada vez más importante mantener la vigilancia de las cepas. Así será particularmente importante monitorear las instancias donde falle la vacuna y los niños inmunizados requieran hospitalización por infección por rotavirus. La emergencia y circulación de nuevos genotipos, variantes de los mismos, o distintas combinaciones de cualquiera de los segmentos, proveerán información sobre la estabilidad de estas nuevas cepas y por ende su capacidad o fitness para diseminarse en poblaciones humanas a lo largo del tiempo.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

PARTE II

PUESTA A PUNTO DEL MODELO MURINO DE INFECCIÓ POR ROTAVIRUS

Introducción

Modelos animales

La evaluación de vacunas siempre ha dependido del uso de modelos animales para la obtención de datos de inmunogenicidad y eficacia. Las vacunas en desarrollo son evaluadas inicialmente en modelos animales en etapas previas a los ensayos clínicos en humanos y como parte de los estudios sobre seguridad, inmunogenicidad y protección inducida. El uso de los mismos ha permitido también estudiar las infecciones por rotavirus, su patología, la enfermedad asociada y la inmunidad, incluyendo correlatos de protección. Esta información también contribuye al desarrollo de vacunas. Actualmente, existen dos modelos de infección por rotavirus en animales pequeños: el ratón y el conejo. El modelo de conejo fue el primero desarrollado para estudiar la inmunidad humoral y la protección43, seguido por el desarrollo del modelo de ratón adulto más empleado actualmente33, 77, 232, 233. Ambos modelos son modelos de infección. El único modelo de enfermedad es el de cerdos gnotobióticos, cuyo uso es limitado debido a su alto costo, número limitado de animales disponibles, el tiempo limitado durante el que los animales pueden ser mantenidos en aisladores, y la necesidad de equipamiento especializado y personal capacitado. Aún así, este modelo ha producido mucha información interesante43, 241.

Modelos de animales pequeños

Tanto el modelo de ratón como el de conejo han sido elementales durante el desarrollo de nuevas estrategias de vacunación, proveyendo sistemas que permitan estudiar la inmunidad local y sistémica luego de una infección o una vacunación. Sin embargo, ambos son modelos de infección y no modelos de diarrea. Los conejos y los ratones de todas las edades pueden ser infectados fácilmente con rotavirus y excretan altos niveles de virus en sus heces, pero la diarrea está restringida a animales de menos de 2 semanas de edad33, 43, 232, 233. Por lo tanto, la eficacia protectora en el ratón y el conejo se basa en la reducción de la excreción de antígenos de rotavirus, no en una mejoría de la enfermedad. Sin embargo, determinar la reducción en la excreción de virus es probablemente una medida más estricta de la eficacia protectora, dado que la diarrea no ocurre sin infección. Ambos modelos animales, presentan otra limitación: sólo las cepas homólogas (aisladas de la misma especie) replican eficientemente y se transmiten horizontalmente a animales control no inoculados, mientras que las cepas heterólogas (aisladas de una especie distinta, incluyendo las cepas que infectan humanos) no lo hacen 33, 43, 77.

Cuando se evalúan vacunas nuevas, existe un número de parámetros que afectan los resultados. Estos incluyen la elección del inmunógeno, la vía de inmunización, el adyuvante, y el modelo animal. Los experimentos que pretenden comparar y optimizar distintas vacunas contra rotavirus en distintos modelos animales proveen resultados conflictivos con respecto a qué se considera inmunidad protectora o eficacia protectora. Los datos obtenidos tras la evaluación de una vacuna en un modelo animal no reflejarían con exactitud los resultados en niños43.

Propagación y titulación de cepas de rotavirus wild type en ratón

En el contexto de esta tesis se denominarán cepas de rotavirus wild type (wt) a los rotavirus propagados exclusivamente por pasajes de animal a animal. Distintas cepas wt de rotavirus murino han sido propagadas en su especie de origen33, 43, 77. Estas cepas wt se usan frecuentemente como virus para el desafío en el modelo de ratón, pero han tenido un uso limitado en el modelo de conejo. Luego de la adaptación a cultivo celular, puede ocurrir una atenuación del virus que lo vuelva menos virulento o no virulento comparado con el virus wt en la especie original de la que fue aislado. En el ratón, la adaptación a cultivo celular de varias cepas de rotavirus wt, resultó en un aumento en la dosis infectiva en el ratón, en comparación al virus wt33.

Detección de rotavirus en muestras de materia fecal de ratón

Luego de una infección viral o un desafío de ratones inmunizados, la cantidad de virus excretado se determina diariamente en muestras de materia fecal. La detección de antígeno se lleva a cabo por ELISA debido a la facilidad del ensayo, el tiempo y el costo. No se conoce cómo se correlaciona la eficacia protectora basada en detección de antígeno, con la protección contra la enfermedad en niños. En general puede decirse que esto no puede medirse en los modelos de animales pequeños43 aunque en la mayoría de los desarrollos de vacunas contra rotavirus el modelo de ratón adulto configura una de las etapas pre-clínicas más frecuentemente utilizadas.

La eficacia protectora en este modelo se puede evaluar comparando distintos parámetros, tales como la duración de la excreción viral, el día de comienzo de la excreción y la cantidad promedio de excreción por día. El método establecido, sin embargo, que integra varios de estos parámetros, se basa en la duración y la amplitud de la excreción de antígeno viral. Se grafican los resultados de la detección de antígeno en las muestras de materia fecal para cada día posterior al desafío con rotavirus wt y se calcula el área bajo la curva (AUC) para cada animal (Figura 15). La eficacia protectora en animales individuales se expresa como el porcentaje de reducción del antígeno viral comparando el AUC para animales individuales con el AUC media del grupo de ratones control43.

Detección de anticuerpos específicos para rotavirus

Para medir las respuestas de anticuerpos neutralizantes o anticuerpos específicos para rotavirus, pueden emplearse varios ensayos. Se pueden analizar distintos tipos de muestras y puede emplearse ELISA, ensayos de microneutralización en cultivo celular, ELISPOT, Western blot, y también pueden determinarse los distintos isotipos de inmunoglobulinas. Como antígeno en algunos de estos ensayos pueden emplearse proteínas de rotavirus purificadas, partículas de rotavirus concentradas y purificadas o lisados celulares. En la Figura 16 se muestra la especificidad de los anticuerpos que se inducen luego de la infección natural con rotavirus murino en muestras de suero y materia fecal recolectadas a distintos tiempos.

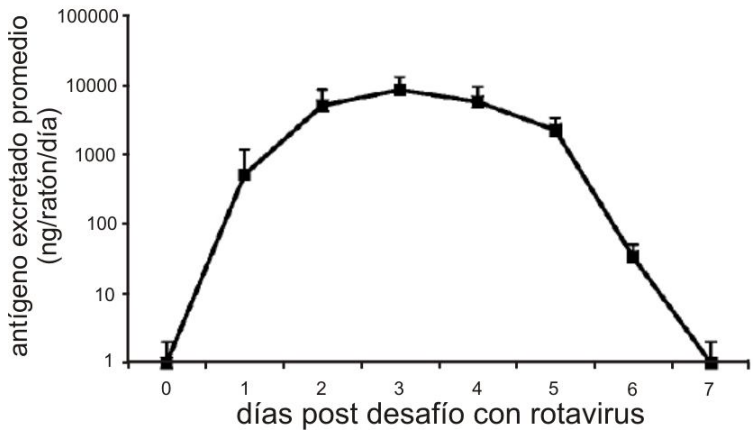


Figura 15. Curva de excreción de rotavirus en materia fecal.

El gráfico muestra el promedio de antígeno excretado por ratones no inmunizados durante los siete días posteriores al desafío con una cepa murina de rotavirus. Adaptado de Desselberger et al, 201164.

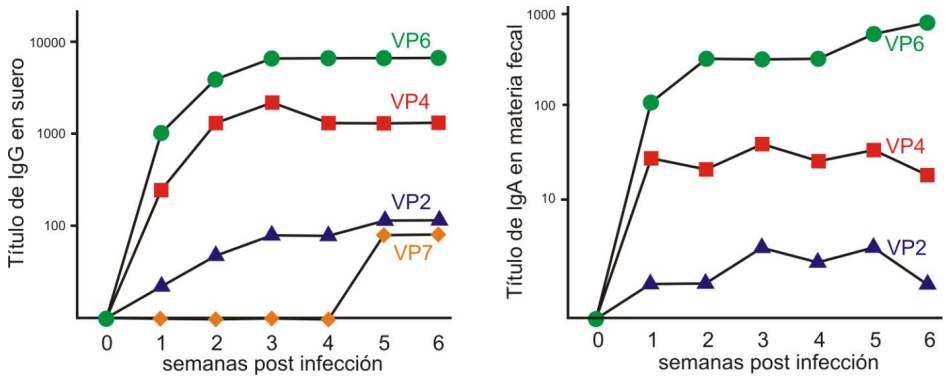


Figura 16. Niveles de anticuerpos anti rotavirus en el ratón adulto.

Los gráficos muestran la respuesta inmune humoral en suero (izquierda) y materia fecal (derecha) contra distintas proteínas estructurales en ratones adultos infectados con una cepa de rotavirus murina. Adaptado de Ishida et al, 1996108.

Respuesta inmune inducida por infección o vacunación en ratones adultos

A pesar de que los ratones no desarrollan enfermedad por rotavirus después de las dos semanas de edad, si no han estado en contacto con rotavirus previamente permanecen susceptibles a la infección durante el resto de su vida. Por lo tanto, en el modelo de ratón adulto, la medida de inmunidad es la protección contra la infección en lugar de la protección contra la enfermedad. Este modelo ha sido y continúa siendo usado por numerosos investigadores para

estudiar los mecanismos de la inmunidad frente a rotavirus que se resumen en la Figura 17232.

En este modelo, la protección frente a un desafío oral con rotavirus murino no se correlaciona con los títulos de anticuerpos neutralizantes sistémicos ni intestinales dirigidos contra el rotavirus empleado150, 233. Sin embargo, se encontró una correlación con los títulos de IgA rotavirus-específicas a nivel sistémico y en materia fecal77, 150 así como con títulos elevados de IgA rotavirus-específica en la superficie de la mucosa intestinal159. Más tarde, el uso de ratones deficientes en células B que no pueden producir anticuerpos demostró que la protección contra rotavirus a largo plazo depende en gran medida de anticuerpos85, 149. Incluso luego de una inmunización parenteral, la migración de células presentadoras de antígeno desde tejidos linfoides periféricos a tejidos asociados a intestino contribuiría a inducir respuestas de IgA en mucosas y protección46. Los anticuerpos dirigidos contra las proteínas de la cápside interna VP2 y en particular VP6, alcanzan títulos elevados34, 78, 108. Estos anticuerpos no son neutralizantes in vitro, pero protegen probablemente por medio de la interacción intracelular con DLPs, impidiendo la transcripción o la maduración (neutralización intracelular) 34, 51, 78 (Figura 18). A pesar de que la protección en este modelo se asocia típicamente con IgA anti-rotavirus, los ratones modificados genéticamente que no pueden producir IgA también están protegidos luego de una inmunización con rotavirus, probablemente debido a los títulos elevados de IgG específica169.

La resolución de la excreción de virus y la protección frente a infecciones subsecuentes por rotavirus, también se ha asociado con células T CD8 rotavirus-específicas. En ratones deficientes en células B, la depleción de células CD8 impide la resolución de la infección luego de una inoculación oral con rotavirus85, 149. Por esto, las células T citotóxicas se consideran críticas para la resolución de la excreción viral en ausencia de anticuerpos. Sin embargo, en ratones inmunocompetentes, la depleción de células CD8 sólo retrasa la resolución de la excreción que ocurre con la aparición de anticuerpos. Por lo tanto, las células CD8 son los principales efectores de la resolución viral, pero la protección a largo plazo depende principalmente de la respuesta humoral. Las células T CD4 también son esenciales para la resolución completa de la excreción de rotavirus, seguramente debido a que son esenciales para el desarrollo de las células B y la producción de anticuerpos rotavirus- específicos152.

En resumen, tanto las células B (en particular las que expresan el receptor de migración a intestino α4β7)237, como las células T CD8 y CD4 se identificaron como efectores de la protección frente a un desafío con rotavirus. Sin embargo, la importancia relativa de cada tipo parece depender del inmunógeno y de la vía de inmunización. Los resultados obtenidos con el modelo de ratón adulto permiten obtener algo de información sobre los posibles mecanismos de protección en humanos. Pero como con cualquier modelo animal, su aplicabilidad a la enfermedad en humanos no se conoce hasta que cualquier posible vacuna se ensaye en humanos. Aún así, los resultados obtenidos a través de modelos animales proveen herramientas para el desarrollo racional de futuras vacunas contra rotavirus231.

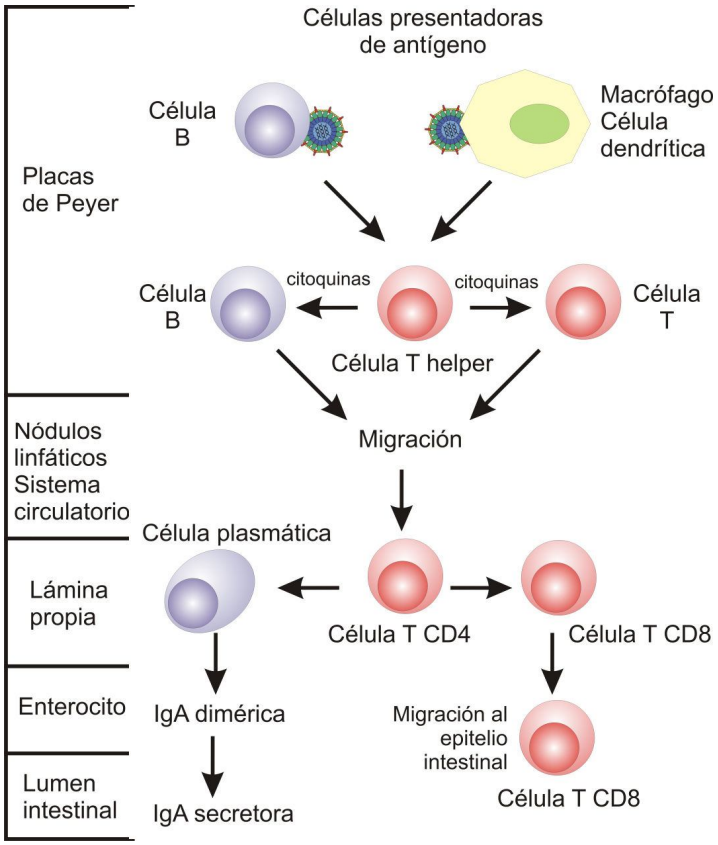


Figura 17. Inmunidad inducida por rotavirus.

Se resumen los principales eventos durante la respuesta inmune inducida por una infección por rotavirus. Los antígenos de rotavirus incorporados por células presentadoras de antígeno localizadas en sitios inductores (como las placas de Peyer) son presentados a células T CD4 y CD8. Estas células migran a través del sistema linfático e ingresan a la circulación, distribuyéndose principalmente en la mis ma mucosa de origen donde se diferencian a células efectoras o de memoria. También se producen citoquinas localmente que afectan la migración y la diferenciación celular.

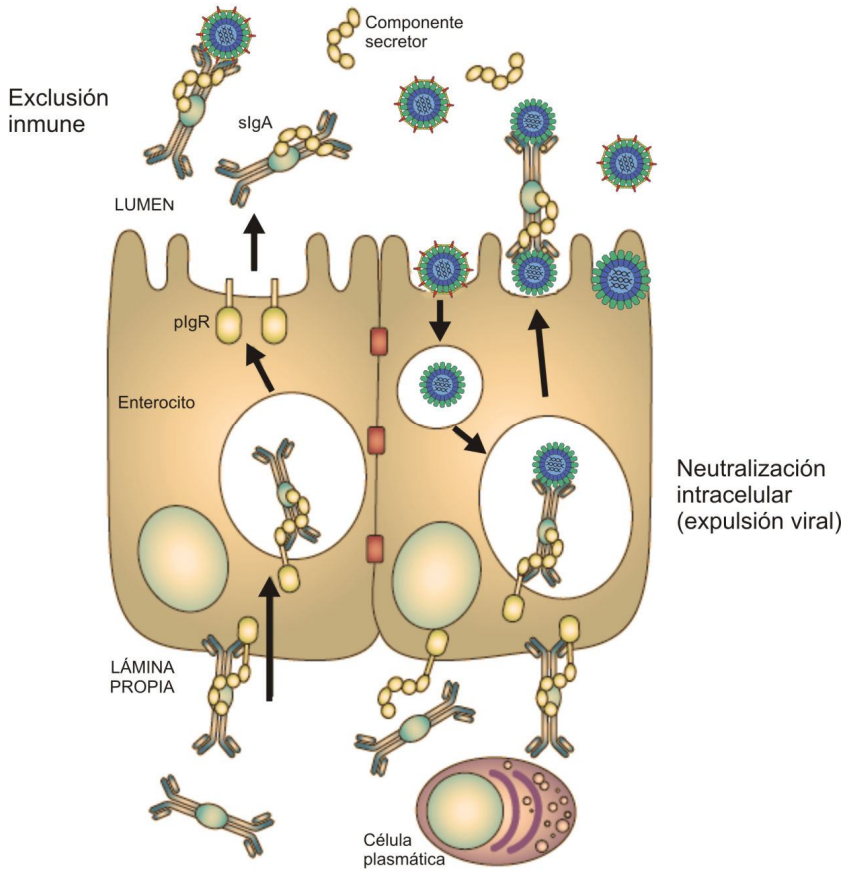


Figura 18. Mecanismos de acción de la IgA secretora.

Luego de ser producida por las células plasmáticas en la lámina propia, la IgA dimérica unida al componente secretor es transportada a través de los enterocitos y liberada en el lumen intestinal como IgA secretora (s IgA) donde actúa por exclusión inmune uniéndose a rotavirus. Otro mecanismo es la neutralización intracelular, por la que la IgA se une a antígenos virales mientras es transportada a través de los enterocitos. Adaptado de Strugnell et al, 2010215.

Objetivo general

Poner a punto el modelo de ratón adulto de infección por rotavirus.

Objetivos particulares

-Producir stocks de cepas de rotavirus.

-Producir anticuerpos policlonales de ratón específicos para rotavirus.

-Poner a punto ensayos de ELISA y Western blot para detección de anticuerpos específicos para rotavirus.

-Poner a punto el protocolo de desafío de ratones con rotavirus murino wild type y la determinación del porcentaje de protección.

-Inmunizar ratones con inmunógenos control que inducen protección total o parcial frente al desafío con rotavirus.

Materiales y métodos

Producción de stocks de cepas de rotavirus. Se produjeron stocks de las cepas de rotavirus del grupo A: RRV (G3-P[3]-I2, origen: simio), Wa (G1-P[8]-I1, origen: humano), EC adaptada a cultivo (ECcc) (G16-P[16]-I7, origen: murino) y EC wild type (ECwt) (G16- P[16]-I7, origen: murino). Las cepas RRV y Wa fueron cedidas gentilmente por el CDC (Centers for Disease Control, Atlanta, GA, Estados Unidos) y las cepas ECcc y ECwt fueron cedidas gentilmente por el Dr. Harry Greenberg (Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, Estados Unidos).

Las cepas RRV, Wa y ECcc se propagaron en células epiteliales de riñón de mono MA104 mantenidas en medio DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 0,25 µg/ml de anfotericina B. Las células confluentes crecidas en frascos de 75 o 150 cm2 se lavaron dos veces con PBS y se incubaron al menos una hora a 37 °C con medio DMEM sin suero para remover el suero residual en la monocapa. El virus fue activado incubándolo 30 minutos a 37 °C con 20 µg/ml de tripsina. Se descartó el medio del frasco y se agregó el virus diluído (MOI entre 0,1-10) en 2 ml o 5 ml de DMEM sin suero, permitiendo que el virus se adsorba durante 1 hora a 37 °C. Luego de ese período se agregó DMEM sin suero con 2 µg/ml de tripsina hasta un volumen final de 10 ml o 25 ml según corresponda. Las células se incubaron a 37 °C hasta que se observó entre 85 - 90 % de efecto citopático (principalmente lisis celular). Los frascos se congelaron y descongelaron dos veces y el virus se clarificó por centrifugación a 8.000 g durante 10 minutos. El sobrenadante se alicuotó y almacenó a -80 °C hasta su uso.

La cepa ECwt fue propagada en ratones Balb/c. El virus fue administrado por vía oral empleando una sonda gástrica en 100 µl de volumen final previa neutralización de la acidez estomacal con 100 µl de bicarbonato de sodio 4 %. Tres días después, los ratones fueron sacrificados y se les extrajo el intestino. Los intestinos fueron congelados y descongelados, homogeneizados con arena estéril en un mortero y diluídos 10 % p/v en HBSS. La suspensión se clarificó por centrifugación a 2.000 g durante 25 minutos a 4 °C, se alicuotó y se almacenó a -80 °C hasta su uso43.

Titulación de rotavirus por TCID50. La dosis infectiva de los stocks de las cepas RRV y Wa se determinó calculando la tissue culture infective dose 50 % (TCID50). Este título se determinó realizando diluciones seriadas en base 10 del stock viral e infectando grupos de wells (n=8) en placas para cultivo celular de 96 wells con monocapas de células MA104 confluentes. La infección en cada well individual se evaluó de acuerdo a la presencia o ausencia de efecto citopático (lisis celular) luego de tres días de incubación. Se determinó el número de wells infectados y no infectados para cada dilución y se calculó la TCID50/ml del stock empleando la fórmula de Reed-Muench189.

Titulación de rotavirus por focos fluorescentes. Debido a que la cepa ECcc no produce un efecto citopático notorio que permita la titulación por TCID50, se empleó la titulación por formación

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

de focos fluorescentes. Este título se determinó realizando diluciones seriadas en base 10 del stock viral e infectando grupos de wells (n=3) en placas para cultivo celular de 96 wells con monocapas de células MA104 confluentes. Luego de una incubación de 16 horas, las células fueron fijadas con formol 10 % durante 30 minutos a temperatura ambiente e incubadas con una dilución 1/300 de anticuerpos de conejo anti-rotavirus marcados con fluoresceína en PBS con 0,002 % de azul de Evans. Luego de 1 hora de incubación a 37 °C, las células se lavaron tres veces con PBS y se observaron en un microscopio de fluorescencia para contar el número de focos fluorescentes por well que permita calcular el título en focos fluorescentes por unidad de volumen (FFU/ml).

Titulación de rotavirus por SD50. La infectividad del stock de la cepa ECwt se determinó calculando la shedding dose 50 % (SD50). Este título se determinó realizando diluciones seriadas en base 10 del stock viral y administrándolas por vía oral a distintos grupos de ratones (n=5). La infección en cada ratón individual se evaluó de acuerdo a la presencia o ausencia de antígenos de rotavirus en muestras de materia fecal colectadas durante una semana por ELISA. Se determinó el número de animales infectados y no infectados para cada dilución y se calculó la SD50/ml del stock wild type empleando la fórmula de Reed-Muench43, 189.

Concentración y purificación de rotavirus. El virus clarificado fue concentrado a través de 1 ml de colchón de sacarosa 40 % en buffer TNC (Tris 10 mM, NaCl 140 mM, $CaCl_2$ 5 mM) y 32 ml de virus clarificado en tubos Ultra Clear open top (25 x 89 mm) (Beckman Coulter, Brea, CA, Estados Unidos). Se centrifugó durante 2 horas a 100.000 g en el rotor swinging-bucket SW28 (Beckman Coulter, Brea, CA, Estados Unidos). Se descartó el sobrenadante, el pellet de cada tubo se resuspendió en buffer TNC y se los combinó para obtener la preparación de rotavirus concentrado.

Para la purificación se preparó una solución de cloruro de cesio en buffer TNC de densidad 1,36 g/ml (correspondiente a un índice de refracción de 1,3683). Se emplearon tubos Ultra Clear open top (14 x 95 mm), donde se agregaron 12 ml de solución de cloruro de cesio y 1 ml de virus concentrado. Se centrifugó durante 16 horas a 80.000 g en el rotor swinging- bucket SW40 Ti (Beckman Coulter, Brea, CA, Estados Unidos). Las bandas correspondientes a las partículas de rotavirus completas se recolectaron por punción lateral de los tubos con una aguja 25 G. Para remover el cloruro de cesio, el virus concentrado se ultrafiltró en tubos Amicon Ultra-15 100K (Millipore, Billerica, MA, Estados Unidos), lavando dos veces con buffer TNC por centrifugación a 4.000 g durante 10 minutos y resuspendiendo en el mismo buffer. La concentración de virus purificado se calculó multiplicando la densidad óptica a 260 nm por 185 µg/ml43. Se analizó la composición proteica de la preparación de rotavirus concentrado y purificado por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

ELISA para detección de antígenos de rotavirus. Se empleó un ELISA desarrollado en el Laboratorio de Inmunología y Virología, UNQ10 para la detección de las muestras positivas para rotavirus del grupo A. El método consiste en un ELISA de captura que emplea anticuerpos policlonales de cabra anti-rotavirus. Se sensibilizaron placas de 96 wells con una dilución 1/250 de IgG purificada de cabra anti-rotavirus en buffer carbonato pH 9,6 incubando 1 hora a temperatura ambiente. Luego de cada una de las incubaciones, la placa se lavó tres veces con PBS-T (PBS,

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Tween-20 0,2 %). Las muestras a analizar se diluyeron en PBS-TC (PBS-T, caseína 1 %), se depositaron en los wells y se incubaron 1 hora a 37 ºC u overnight a 4 ºC. Luego del lavado se incubó con una dilución 1/1.000 de IgG purificada anti-rotavirus biotinilada en PBS-TC durante 1 hora a 37 °C, se lavó y se incubó 30 minutos con una dilución 1/4.000 de estreptavidina conjugada con peroxidasa (USBiologicals, Swampscott, MA, Estados Unidos) en PBS-TC.

Finalmente, y luego de un último lavado, las placas se revelaron con orto- fenilendiamina 1 mg/ml (OPD) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) y peróxido de hidrógeno (0,03 % v/v) en buffer citrato, pH 5,0. Luego de 15 minutos de desarrollo de color la reacción se frenó con ácido sulfúrico 1 N y se determinó la densidad óptica a 490 nm (DO490) en un lector de microplacas Asys UVM 340 (Biochrom US, Holliston, MA, Estados Unidos), considerándose positivas aquellas muestras con DO490 mayor a 0,210.

Producción de anticuerpos policlonales de ratón anti rotavirus. Se inmunizaron 5 ratones Balb/c de entre 6 y 8 semanas de edad con 50 µg de RRV concentrado y purificado en un volumen final de 100 µl por vía subcutánea en los días 0, 21 y 42. La primer dosis se administró en combinación con adyuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) (50 µl por dosis) y las dos siguientes en combinación con adyuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) (50 µl por dosis). Durante el protocolo de inmunización se tomaron muestras de sangre realizando un pequeño corte en el extremo de la cola de los ratones. El día 56 se sangró a los ratones por punción cardíaca bajo anestesia total con xilacina/ketamina. A partir de las distintas muestras de sangre, se obtuvo el suero por centrifugación a 5.000 g durante 10 minutos, se alicuotó y almacenó a -20 °C49.

Puesta a punto de ELISA para detección de IgG anti rotavirus. Se empleó un formato de ELISA directo que consistió en sensibilizar los wells de una placa de 96 wells con RRV concentrado (se ensayaron diluciones entre 1/50 y 1/500) en buffer carbonato pH 9,6, incubando durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego de cada incubación, la placa se lavó con PBS-T y todas las diluciones subsiguientes de anticuerpos o muestras se realizaron en PBS-TC, incubando 1 hora a 37 °C. Como control positivo durante la optimización del ELISA se emplearon los sueros obtenidos durante el protocolo de obtención del suero policlonal de ratón anti-RRV (incluyendo sueros preinmunes y el suero hiperinmune obtenido finalmente). Las IgG unidas al antígeno se detectaron con anticuerpos anti IgG de ratón conjugados con peroxidasa (HRP). Se ensayaron diluciones entre 1/2.000 y 1/20.000 de anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugados con peroxidasa (Pierce, Rockford, IL, Estados Unidos) y diluciones entre 1/500 y 1/4.000 de anticuerpos de conejo anti-IgG de ratón conjugados con peroxidasa (USBiologicals, Swampscott, MA, Estados Unidos).

Finalmente, las placas se revelaron con orto-fenilendiamina 1 mg/ml (OPD) (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) y peróxido de hidrógeno (0,03 % v/v) en buffer citrato, pH 5,0. Luego de 15 minutos de desarrollo de color la reacción se frenó con ácido sulfúrico 1 N y se determinó la densidad óptica a 490 nm (DO490) en un lector de microplacas Asys UVM 340 (Biochrom US, Holliston, MA, Estados Unidos). Una vez determinadas las diluciones óptimas para cada uno de los reactivos, se ensayaron 50 sueros normales de ratón (sin anticuerpos anti-rotavirus) para

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

determinar el valor de corte del ELISA como la media de la densidad óptica más tres desviaciones estándar.

Puesta a punto de ELISA para detección de IgA anti rotavirus. Se empleó un formato de ELISA de captura que consistió en sensibilizar una placa de 96 wells con anticuerpos anti IgA de ratón. Se ensayaron diluciones entre 1/50 y 1/200 de anticuerpos de cabra anti IgA de ratón (Pierce, Rockford, IL, Estados Unidos) o anticuerpos de conejo anti IgA de ratón (USBiologicals, Swampscott, MA, Estados Unidos) en buffer carbonato pH 9,6, incubando durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego de cada incubación, la placa se lavó con PBS-T y todas las diluciones subsiguientes de anticuerpos o muestras se realizaron en PBS-TC. Como control positivo durante la optimización del ELISA se emplearon diluciones 1/5 de muestras de materia fecal de ratón recolectadas al día 10 post infección con la cepa ECwt. El siguiente paso consistió en agregar a la placa diluciones entre 1/50 y 1/500 de RRV concentrado e incubar overnight a 4 °C. La detección de rotavirus unido a IgA capturada prosiguió como se indicó en el ELISA para la detección de antígenos de rotavirus. Se incubó con una dilución 1/1.000 de IgG purificada anti-rotavirus biotinilada durante 1 hora a 37 °C, y posteriormente se incubó 30 minutos con una dilución 1/4.000 de estreptavidina conjugada con peroxidasa (USBiologicals, Swampscott, MA, Estados Unidos).

Finalmente, las placas se revelaron con orto-fenilendiamina 1 mg/ml (OPD) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) y peróxido de hidrógeno (0,03 % v/v) en buffer citrato, pH 5,0. Luego de 15 minutos de desarrollo de color la reacción se frenó con ácido sulfúrico 1 N y se determinó la densidad óptica a 490 nm (DO490) en un lector de microplacas Asys UVM 340 (Biochrom US, Holliston, MA, Estados Unidos). Una vez determinadas las diluciones óptimas para cada uno de los reactivos, se ensayaron 50 muestras de materia fecal normal de ratón (sin anticuerpos anti-rotavirus) para determinar el valor de corte del ELISA como la densidad óptica media más tres desviaciones estándar.

Electroforesis en geles de poliacrilamida. La electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) se llevó a cabo según el método descripto por Laemmli116 utilizando el sistema de geles discontinuos y empleando el equipo Mini- PROTEAN Tetra Cell (BioRad, Hercules, CA, Estados Unidos). El gel de separación se preparó con una concentración de acrilamida 12 % (acrilamida/bisacrilamida) y el gel de apilamiento se preparó con una concentración de acrilamida 4 %. Las muestras a separar se preincubaron con buffer de siembra (Tris-HCl 0,25 M, pH 6,8; SDS 2 %; glicerol 10 %; β- mercaptoetanol 5 % y azul de bromofenol 0,2 %) durante 5 minutos a 100 °C. Como marcador de peso molecular se sembraron 3 µl de PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, Lafayette, CO, Estados Unidos). Una vez realizada la siembra, la separación electroforética se llevó a cabo en buffer de corrida (Tris base 0,3 %, glicina 1,4 % y SDS 0,1 %) y aplicando un voltaje constante de 100 V. Terminada la corrida, las proteínas del gel se transfirieron a una membrana de PVDF o se tiñeron con Coomasie brilliant blue R-250 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) 0,1 % en etanol: ácido acético : agua 4:1:5. Como solución decolorante se empleó etanol : ácido acético : agua 4:1:5.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Transferencia a membranas de PVDF. La electrotransferencia se realizó sobre membranas de PVDF Hybond P+ (GE Healthcare Biosciences, Pittsburg, PA, Estados Unidos) en buffer de transferencia (Tris base 0,3 %, glicina 1,4 % y metanol 20 %) y se llevó a cabo durante 30 minutos a 250 mA seguidos de 30 minutos a 350 mA. Luego de la transferencia la membrana se lavó con PBS-T y se bloqueó en PBS-TC con agitación durante 1 hora a 37 °C u overnight a 4 °C.

Puesta a punto de Western blot para detección de IgG anti rotavirus. Para la evaluación de IgG anti rotavirus en muestras individuales de ratón, las membranas conteniendo las proteínas del virus se cortaron en tiras correspondientes a calles individuales. Como control positivo se ensayaron diluciones entre 1/50 y 1/300 de sueros de ratón anti-rotavirus (obtenidos al día 10 luego de la infección con ECwt) y diluciones entre 1/500 y 1/3.000 del suero policlonal de ratón anti RRV. Estas muestras se diluyeron en PBS-TC y se incubaron con las membranas durante 1 hora a 37 °C con agitación. Se realizaron tres lavados con PBS-T y se ensayaron diluciones entre 1/500 y 1/2.000 de anticuerpos de cabra anti IgG de ratón (Pierce, Rockford, IL, Estados Unidos). A continuación se realizaron dos lavados con PBS-T y un lavado con PBS.

El revelado se llevó a cabo por incubación con el reactivo quimioluminiscente Biolumina (PB-L, Bernal, Argentina) según las indicaciones provistas por el fabricante y colocando luego una placa radiográfica sobre la membrana, que a continuación fue revelada y fijada. La comparación de la intensidad de las bandas obtenidas se llevó a cabo por densitometría, empleando el programa ImageJ188.

Puesta a punto de Western blot para detección de IgA anti rotavirus. Para la evaluación de IgA anti rotavirus en muestras individuales de ratón, las membranas conteniendo las proteínas del virus se cortaron en tiras correspondientes a calles individuales. Como control positivo se ensayaron diluciones entre 1/10 y 1/100 de materia fecal de ratón y diluciones entre 1/50 y 1/500 de sueros de ratón (ambas muestras obtenidas al día 10 luego de la infección con ECwt). Estas muestras se diluyeron en PBS-TC y se incubaron con las membranas durante 1 hora a 37 °C. Se realizaron tres lavados con PBS-T y se ensayaron diluciones entre 1/100 y 1/500 de anticuerpos de cabra anti IgA de ratón (Pierce, Rockford, IL, Estados Unidos), incubando durante 1 hora a 37 °C. Luego de tres lavados adicionales, se incubó con anticuerpos anti inmunoglobulinas de cabra conjugados con peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, Estados Unidos) diluídos 1/7.500 en PBS-TC durante 1 hora a 37 °C.

El revelado se llevó a cabo por incubación con el reactivo quimioluminiscente Biolumina (PB-L, Bernal, Argentina) según las indicaciones provistas por el fabricante y colocando luego una placa radiográfica sobre la membrana, que a continuación fue revelada y fijada. La comparación de la intensidad de las bandas obtenidas se llevó a cabo por densitometría, empleando el programa ImageJ188.

Puesta a punto del modelo murino de infección con rotavirus. Con el objetivo de determinar las condiciones óptimas de desafío y de detección de virus excretado, se inocularon grupos de 5 ratones por vía intragástrica con distintas dosis de ECwt y se emplearon distintas diluciones de las muestras de materia fecal recolectadas para la detección del virus por ELISA. En base a lo

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

reportado previamente sobre el modelo, se emplearon dosis de desafío entre 104 y 105 SD5043 en 100 µl de volumen final, previa neutralización de la acidez estomacal con 100 µl de bicarbonato de sodio 4 %. Se recolectaron muestras de heces durante 8 días post-desafío (dpd) y diluciones de las mismas (entre 1/50 y 1/100) se ensayaron por ELISA para detección de antígeno de rotavirus. Para calcular el área bajo la curva (AUC) de excreción de antígeno para cada ratón (que es proporcional a la excreción total para cada ratón), se graficaron en el eje vertical los valores de DO490 obtenidos por ELISA y en el eje horizontal los días post-desafío.

Para describir y registrar las curvas típicas de producción de anticuerpos específicos de tipo IgG e IgA séricos y fecales luego de la infección con la dosis de desafío, se inoculó un grupo de 5 ratones Balb/c con ECwt por vía intragástrica, se tomaron muestras de suero y materia fecal a los 10, 20 y 30 días, y se determinaron los distintos niveles de anticuerpos por ELISA. Las muestras de sangre obtenidas por corte del extremo de la cola del ratón se centrifugaron a 5.000 g durante 10 minutos, y los sueros obtenidos se almacenaron a -20 °C. Las muestras de materia fecal se diluyeron al 10 % p/v en PBS adicionado con Tween 0,05 % e inhibidor de proteasas Protease Inhibitor Cocktail (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos), se vortexearon hasta obtener una suspensión homogénea, se centrifugaron 10 minutos a 8.000 g, se recuperó el sobrenadante y se almacenaron a -80 °C.

Inmunización de ratones con inmunógenos control que inducen protección total o parcial frente al desafío con rotavirus. La capacidad del modelo de detectar protección frente al desafío fue evaluada administrando los inmunógenos control previamente descriptos: rotavirus inactivado por calor111 (como la cepa Wa) o atenuado47 (como la cepa ECcc) (protección parcial) o la misma cepa ECwt (protección total post-infección).

Se inmunizaron grupos de 5 de ratones por vía intramuscular (en ambas patas traseras con un volumen total no mayor a 100 µl) en los días 0 y 21 con: a) 1,5 x 105 FFU de ECcc47, b) 20 µg de iWa (rotavirus cepa Wa inactivado por calor durante 2 horas a 60 °C111) o c) PBS. Se incluyó un grupo adicional de 5 ratones que fue inoculado el día 0 con la dosis de desafío de ECwt (estos animales permanecieron aislados del resto de los ratones inmunizados hasta el momento de desafío). Durante el protocolo de inmunización se tomaron muestras de suero y materia fecal individuales los días 0, 21 y 42. El día 42 todos los ratones fueron desafiados con ECwt y se tomaron muestras de materia fecal individuales durante los 7 días siguientes.

Se determinó el perfil de anticuerpos específicos para rotavirus en suero y materia fecal previo al desafío y se calcularon las AUC para cada ratón en cada grupo. De esta manera, se determinó el porcentaje de protección para cada ratón individual frente al desafío en relación al AUC media de los ratones control inoculados con PBS. Para comparar las medias entre los grupos se empleó la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis y el método de Dunn como contraste a posteriori.

Resultados y discusión

Producción y titulación de stocks de cepas de rotavirus

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Se produjeron, alicuotaron y almacenaron stocks de las siguientes cepas de rotavirus: Wa (título: 4,64 x 106 TCID50/ml), RRV (título: 5,01 x 108 TCID50/ml), ECcc (título: 2,5 x 106 FFU/ml) y ECwt (título: 1,48 x 106 SD50/ml). Los títulos indicados para Wa y RRV corresponden a sobrenadantes de cultivo y el título indicado para ECwt se obtuvo por inoculación por vía oral de grupos de ratones. Debido a que la cepa ECcc no alcanza títulos elevados en sobrenadantes de cultivo, el título que se indica es el correspondiente a rotavirus ECcc concentrado. La Figura 19 resume el destino de cada una de las cepas propagadas durante el desarrollo de esta tesis. Dependiendo de los requerimientos de la técnica (en cuanto a la cantidad y concentración de rotavirus necesaria, así como al grado de pureza) se emplearon los stocks mencionados, preparaciones de rotavirus concentrado o preparaciones de rotavirus purificado, según se indicará en la descripción de los distintos experimentos.

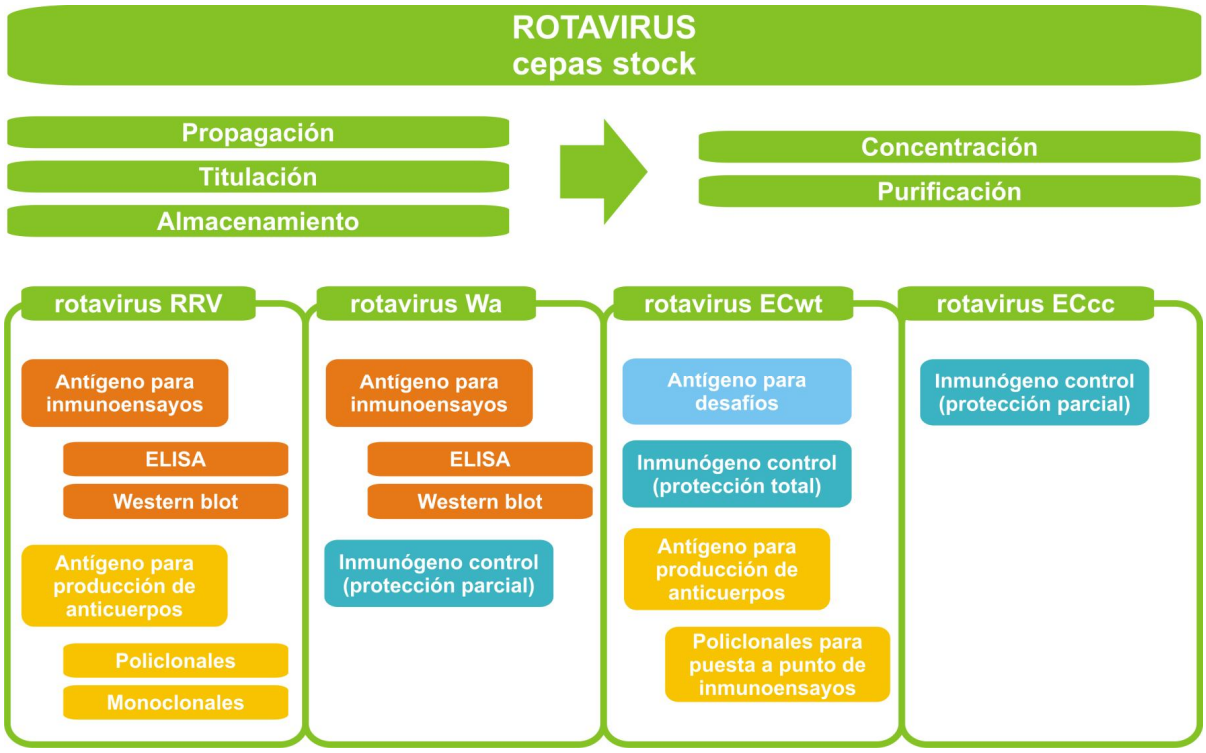


Figura 19. Diagrama de aplicaciones de las cepas de rotavirus empleadas.

En el panel superior se indican los pasos generales que permitieron obtener los stocks de las cepas de rotavirus empleadas. Algunas de las cepas fueron concentradas y purificadas. En el panel inferior se indican los distintos grupos de experimentos en los que se empleó cada cepa.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Concentración y purificación de RRV

Para la obtención de una preparación de rotavirus RRV concentrado y purificado, se partió de flasks de 175 cm2 infectados con esta cepa. Se clarificó el sobrenadante, se concentró el virus a través de un colchón de sacarosa por ultracentrifugación y se sometió a purificación empleando un gradiente de cloruro de cesio. Este método permite que las partículas de rotavirus se separen de los componentes celulares remanentes en la preparación concentrada. Luego de la formación del gradiente de densidad por ultracentrifugación, se observaron dos bandas, localizadas aproximadamente en la mitad del tubo, correspondientes a fracciones enriquecidas en partículas completas (TLP) (densidad: 1,34 g/ml) y partículas de doble capa (DLP) (densidad: 1,36 g/ml)190. Estas bandas se observaron muy próximas entre sí y la correspondiente a TLP fue de mayor intensidad que la correspondiente a DLP. Por encima de estas bandas pero claramente separada de las mismas, se localizó una banda difusa conteniendo proteínas virales o celulares (1,26 g/ml)190. La Figura 20 muestra la detección de antígenos de rotavirus por ELISA en las distintas fracciones del gradiente de densidad generado. Las bandas de partículas completas de rotavirus se recolectaron por punción lateral de los tubos con una aguja, se combinaron las provenientes de distintos tubos y se lavaron con buffer TNC por ultrafiltración. En la Figura 20 puede observarse el pico correspondiente a las partículas completas que fueron recolectadas (fracción 6). Estas partículas también se analizaron por SDS-PAGE. En la Figura 21 pueden observarse las proteínas virales de una preparación de RRV concentrado y purificado. La concentración de virus purificado obtenida fue 240,5 µg/ml.

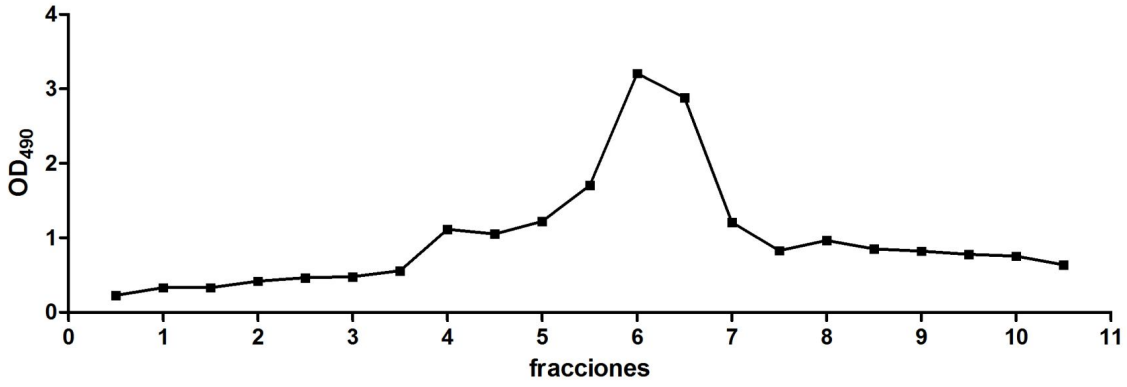


Figura 20. Perfil de purificación de RRV en gradiente de cloruro de cesio.

Se indica la densidad óptica obtenida por ELISA para detección de rotavirus en diluciones 1/100 de fracciones recolectadas desde arriba hacia abajo de un gradiente de densidad de cloruro de cesio. Los números de fracción corresponden a los ml recolectados.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

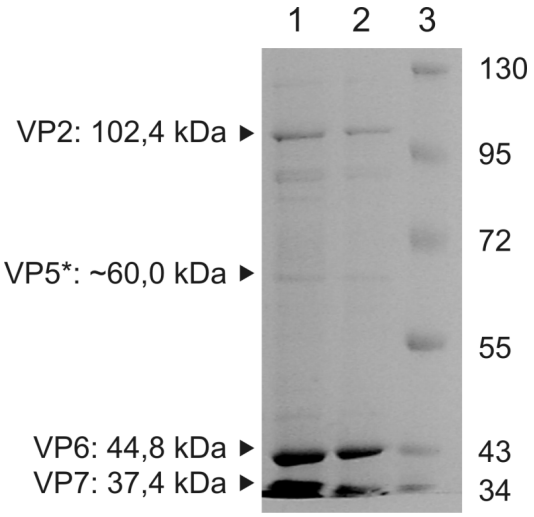


Figura 21. Análisis por SDS-PAGE de las preparaciones de RRV concentrado y purificado.

La preparación de RRV concentrado se muestra en la calle 1 y la preparación de RRV purificado se muestra en la calle 2. En la calle 3 se sembró un marcador de peso molecular y los valores para cada una de las bandas se indican a la derecha de la figura. A la izquierda de la figura se indica la identidad y el peso molecular de cada una de las proteínas de rotavirus.

Producción de anticuerpos policlonales

Para la obtención de un suero policlonal anti-rotavirus, se inmunizaron ratones Balb/c con RRV purificado administrando tres dosis en los días 0, 21 y 42 y realizando el sangrado final en el día 56 para obtener el suero hiperinmune. La Figura 22 resume el cronograma de inmunización y de toma de muestras de sangre (Figura 23). El sangrado final de los ratones resultó en la obtención de un suero policlonal anti rotavirus RRV de título 1/220.000.

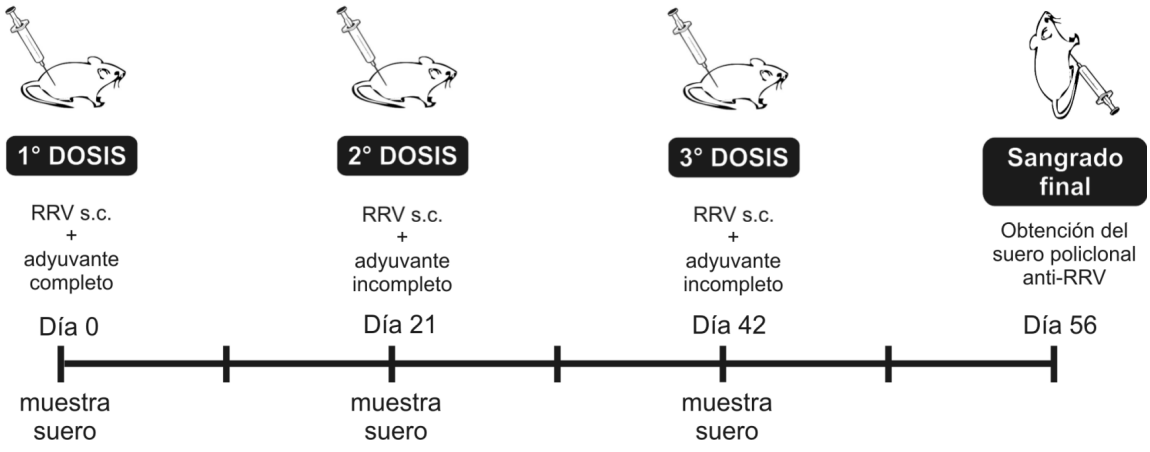


Figura 22. Cronograma de inmunización con RRV purificado.

Se indican los días 0, 21 y 42 en que se inmunizó a los ratones con RRV purificado (en combinación con adyuvante) por vía subcutánea y los días en que se tomaron muestras de sangre para obtener el suero, así como el día 56 cuando se realizó el sangrado final por punción cardíaca. s.c.: subcutáneo

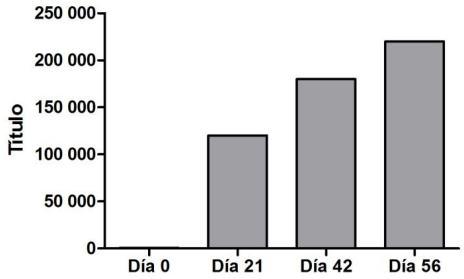


Figura 23. IgG anti-rotavirus en sueros de ratones inmunizados con RRV purificado.

El gráfico muestra el título de anticuerpos anti RRV determinado por ELISA para las muestras de suero colectadas en los días indicados en la Figura 22. Se realizaron pooles de los sueros de los distintos ratones inmunizados.

ELISA para detección de IgG anti rotavirus

La puesta a punto del ELISA para detección de IgG anti rotavirus resultó en un protocolo optimizado que permitió obtener las menores DO490 para muestras negativas, pero manteniendo una máxima sensibilidad. El mismo se resume a continuación.

- Antígeno: Sensibilización de la placa con RRV concentrado 1/100 en buffer carbonato durante 1 hora a temperatura ambiente.
- Tres lavados con PBS-T.
- Muestra: Agregado de la muestra diluída en PBS-TC e incubación durante 1 hora a 37 °C.
- Tres lavados con PBS-T.
- Anticuerpo conjugado: Anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugados con peroxidasa (Pierce, Rockford, IL, Estados Unidos) diluídos 1/3.000 en PBS-TC e incubación durante 1 hora a 37°C.
- Tres lavados con PBS-T.
- Revelado con OPD y peróxido de hidrógeno en buffer citrato.
- Frenado con ácido sulfúrico y medición de DO490.

Empleando este protocolo se ensayaron 50 sueros negativos para IgG anti rotavirus (preinmunes) y se determinó el valor de corte del ELISA como DO490=0,11. Como control positivo se incluyó en todos los ensayos una dilución 1/40.000 (almacenada en alícuotas a -20 °C) del suero policlonal anti rotavirus (DO490=1), cuya titulación se muestra en la Figura 24.

ELISA para detección de IgA anti rotavirus

La puesta a punto del ELISA para detección de IgA anti rotavirus resultó en un protocolo optimizado que permitió obtener las menores DO490 para muestras negativas, manteniendo la

sensibilidad para detectar diluciones seriadas de muestras positivas. El mismo se resume a continuación.

- Anticuerpo de captura: Sensibilización de la placa con anticuerpos de cabra anti IgA de ratón (Pierce, Rockford, IL, Estados Unidos) 1/50 en buffer carbonato.
- Muestra: Agregado de la muestra diluída en PBS-TC e incubación durante 1 hora a 37 °C.
- Tres lavados con PBS-T.
- Antígeno: Agregado de RRV concentrado 1/100 en PBS-TC e incubación overnight a 4 °C.
- Tres lavados con PBS-T.
- Anticuerpo: Anticuerpos de cabra anti-rotavirus conjugados con biotina 1/1.000 en PBS-TC durante 1 hora a 37 °C.
- Tres lavados con PBS-T.
- Estreptavidina conjugada: Agregado de estreptavidina conjugada con peroxidasa (USBiologicals, Swampscott, MA, Estados Unidos) 1/4.000 en PBS-TC e incubación durante 30 minutos a 37 °C.
- Tres lavados con PBS-T.
- Revelado con OPD y peróxido de hidrógeno en buffer citrato.
- Frenado con ácido sulfúrico y medición de DO490.

Empleando este protocolo se ensayaron 50 sueros negativos para IgA anti rotavirus (preinmunes) y se determinó el valor de corte del ELISA como DO490=0,15. Como control positivo se incluyó en todos los ensayos una dilución 1/1.500 (almacenada en alícuotas a -20°C) de materia fecal de ratones desafiados con ECwt conteniendo IgA anti rotavirus (DO490=1), cuya titulación se muestra en la Figura 24.

Western blot para detección de IgG anti rotavirus

La optimización del ensayo de Western blot para la detección de IgG anti rotavirus permitió diferenciar a las muestras positivas de aquellas negativas manteniendo la sensibilidad. El mismo se resume a continuación.

- Antígeno: Se separaron por SDS-PAGE las proteínas de rotavirus RRV concentrado y se transfirieron a una membrana de PVDF. Se bloqueó la membrana con PBS-TC durante 1 hora a 37 °C y se cortaron las calles individuales.
- Muestra: Se incubó con muestras diluídas en PBS-TC durante 1 hora a 37 °C.
- Tres lavados con PBS-T durante 10 minutos cada uno a temperatura ambiente.
- Anticuerpo: Anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugados con peroxidasa (Pierce, Rockford, IL, Estados Unidos) diluídos 1/2.000 en PBS-TC e incubación durante 1 hora a 37°C.
- Dos lavados con PBS-T durante 10 minutos cada uno a temperatura ambiente.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

- Un lavado con PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Revelado: Empleando un reactivo quimioluminiscente y exposición a una placa radiográfica.

En la Figura 25 se muestra la detección de IgG anti rotavirus por Western blot en el suero policlonal anti RRV. Puede observarse que el suero reconoce las proteínas de la cápside intermedia y el core: VP6 y VP2, así como las proteínas de la cápside externa: VP7 y VP4 (clivada en VP5* y VP8*).

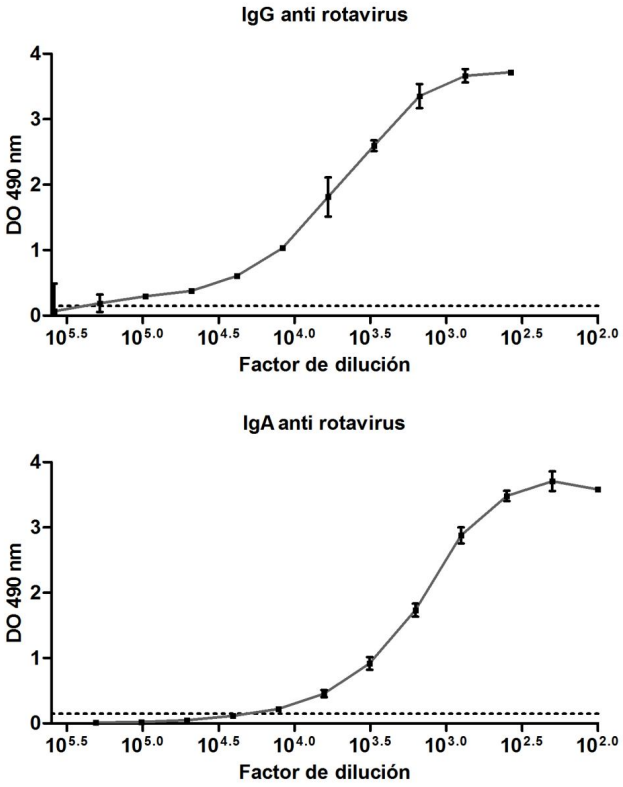


Figura 24. Titulación de anticuerpos anti-rotavirus por ELISA.

En el gráfico superior se muestra la titulación del suero hiperinmune anti-RRV por ELISA para detectar IgG anti rotavirus. En el gráfico inferior se muestra la titulación de una muestra de materia fecal de un ratón infectado con EC wt. En ambos gráficos cada punto del gráfico indica la media de duplicados de la misma muestra y su desviación estándar y la línea punteada marca el valor de corte.

Western blot para detección de IgA anti-rotavirus

La optimización del ensayo de Western blot para la detección de IgA anti rotavirus permitió diferenciar a las muestras positivas de aquellas negativas manteniendo la sensibilidad. El mismo se resume a continuación.

• Antígeno: Se separaron por SDS-PAGE las proteínas de rotavirus RRV concentrado y se transfirieron a una membrana de PVDF. Se bloqueó la membrana con PBS-TC durante 1 hora a 37 °C y se cortaron las calles individuales.

• Muestra: Se incubó con muestras diluídas en PBS-TC durante 1 hora a 37 °C.

• Tres lavados con PBS-T durante 10 minutos cada uno a temperatura ambiente.

• Anticuerpo primario: Anticuerpos de cabra anti-IgA de ratón (Pierce, Rockford, IL, Estados Unidos) diluídos 1/200 en PBS-TC e incubación durante 1 hora a 37°C.

• Tres lavados con PBS-T durante 10 minutos cada uno a temperatura ambiente.

• Anticuerpo secundario: Anticuerpos anti inmunoglobulinas de cabra conjugados con peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, Estados Unidos), diluídos 1/7.500 en PBS-TC durante 1 hora a 37 °C. Dos lavados con PBS-T durante 10 minutos cada uno a temperatura ambiente.

• Un lavado con PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente.

• Revelado: Empleando un reactivo quimioluminiscente y exposición a una placa radiográfica.

En la Figura 25 se muestra la detección de IgA (en particular anti-VP6) por Western blot en muestras de suero y materia fecal de ratones que fueron infectados con ECwt.

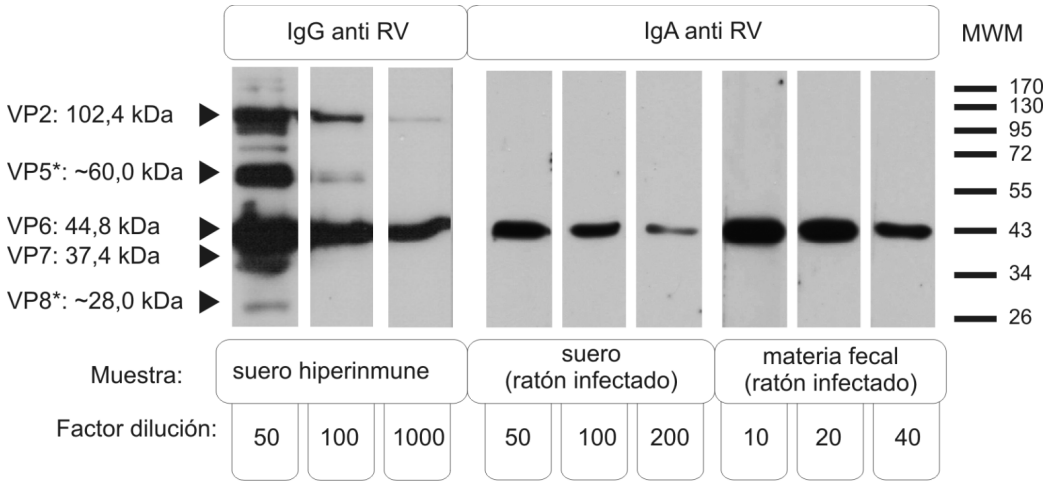


Figura 25. Análisis por Western blot de anticuerpos anti-rotavirus.

Se muestran las calles individuales ensayadas con distintas muestras. En el panel de la izquierda (primeras 3 calles) se muestran calles en las que se detectó IgG anti rotavirus (RV) y en el panel de la derecha (últimas 6 calles) se muestran calles en las que se detectó IgA anti rotavirus (RV). A la izquierda de la figura se indican los pesos moleculares de las proteínas de rotavirus identificadas y a la derecha se indican los pesos moleculares de cada banda del marcador de peso molecular (MWM). En la parte inferior de la figura se indica para cada calle el tipo y dilución de las muestras ensayadas.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Modelo murino de infección por rotavirus

La puesta a punto del modelo murino de infección por rotavirus permitió determinar el porcentaje de excreción de rotavirus en los ratones inmunizados respecto de los ratones no inmunizados. Por un lado el resultado fue un protocolo de desafío y procesamiento de las muestras de materia fecal optimizados para obtener valores de DO490 ubicados dentro del rango de sensibilidad del ELISA para la detección de antígenos virales. Por otro lado, el modelo se ensayó con inmunógenos control capaces de inducir protección parcial (porcentaje de excreción menor al 100 % establecido para los ratones inmunizados con PBS) o protección total (ausencia de excreción).

En resumen, para cada desafío los ratones fueron inoculados por vía intragástrica con 104 SD50 de rotavirus ECwt en 100 µl de volumen final, previa neutralización de la acidez estomacal con 100 µl de bicarbonato de sodio 4 %. A partir del día de desafío se recolectaron diariamente muestras individuales de materia fecal. Las muestras se diluyeron al 10 % y se ensayaron por ELISA para detectar los antígenos de rotavirus en una dilución 1/40 en PBS- TC. En la Figura 26 se muestra como ejemplo una curva de excreción de un grupo de 5 ratones no inmunizados, desafiados el día 0. Adicionalmente, se muestran los niveles de anticuerpos anti-rotavirus detectados en suero y en materia fecal. Pudo observarse claramente que los niveles de anticuerpos específicos aumentan al tiempo que disminuye la excreción de rotavirus.

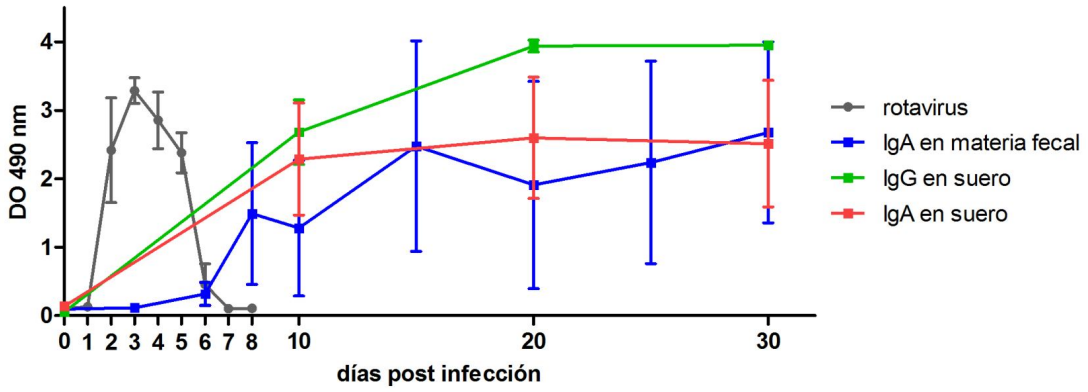


Figura 26. Curvas de excreción de rotavirus y anticuerpos específicos.

Se grafican el antígeno excretado y los anticuerpos específicos determinados por ELISA a lo largo de 30 días luego del desafío de un grupo de 5 ratones con rotavirus ECwt.

Con el objetivo de verificar que el modelo de infección por rotavirus puesto a punto es capaz de detectar la protección parcial inducida por dos inmunógenos ya descriptos por otros autores, así como verificar que luego de una infección con rotavirus los ratones presentan protección total frente a una infección subsecuente, se inmunizaron grupos de ratones que luego fueron desafiados como se mencionó anteriormente.

Grupos de 5 ratones fueron inmunizados por vía intramuscular en los días 0 y 21 con a) 1,5 x 105 FFU de ECcc, b) 20 µg de iWa (rotavirus Wa inactivado o c) PBS. Se incluyó un grupo

adicional de 5 ratones que fue inoculado por vía oral el día 0 con 104 SD50 de rotavirus ECwt (la misma dosis empleada para el desafío). La Figura 27 resume las condiciones ensayadas y las muestras recolectadas.

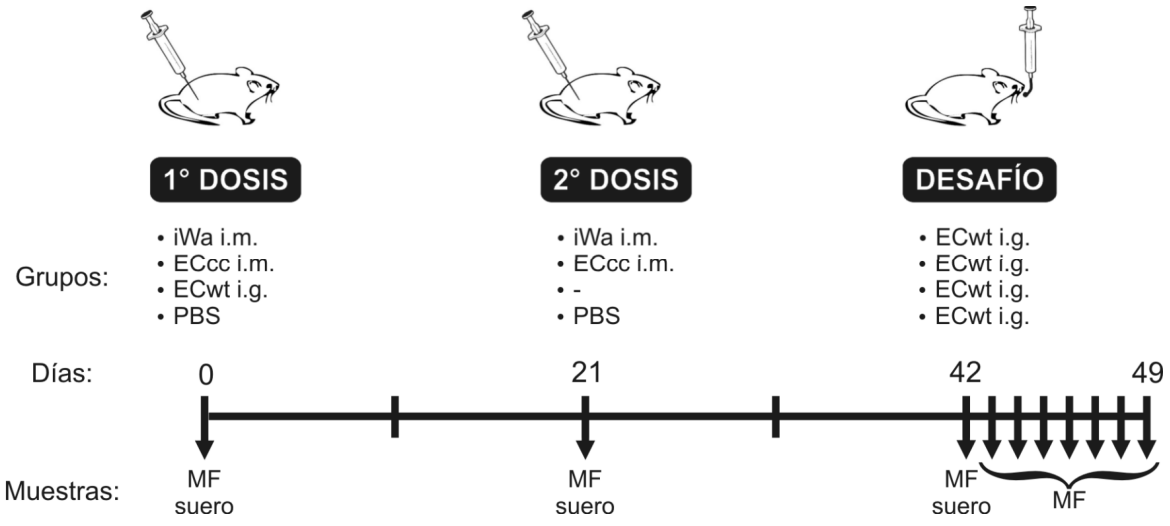


Figura 27. Cronograma de inmunización con inmunógenos control.

El diagrama muestra el tratamiento recibido por cada uno de los cuatro grupos de ratones (parte superior) a lo largo del cronograma de inmunización y desafío, así como las muestras recolectadas individualmente (parte inferior). i.m.: intramuscular, i. g.:intragástrico, MF: materia fecal.

La Figura 28 muestra los niveles de anticuerpos anti rotavirus detectados para los distintos grupos de ratones. Puede observarse que los ratones inmunizados con ECcc, iWa o ECwt presentaron niveles elevados de IgG anti rotavirus en suero y que éstos fueron detectables a partir de la tercera semana (día 21). Los títulos promedio de IgG anti rotavirus determinados al día 42 fueron: 32.000 (grupo ECcc), 92.160 (grupo iWa), 204.800 (grupo ECwt) y <100 (grupo PBS). El único grupo de ratones en el que se detectó IgA anti rotavirus en la materia fecal fue al que se administró ECwt (título al día 42: 25.600). No se detectó en ninguno de los casos IgA específica en el suero ni IgG específica en la materia fecal.

La inoculación de todos los grupos de ratones con ECwt al día 42 permitió determinar el grado de protección frente al desafío con rotavirus. En la Figura 29A, puede observarse la curva de excreción viral de los ratones control (grupo PBS) que permite la comparación con las curvas obtenidas para los grupos restantes. En la figura se evidencia que los ratones inmunizados con ECcc o iWa excretaron menos virus que los ratones del grupo control, mientras que los ratones inmunizados con ECwt no excretaron virus luego del desafío. Estos resultados se graficaron en la Figura 29B como áreas bajo la curva de excreción (AUC). Los valores obtenidos para cada grupo permitieron afirmar que la cantidad de virus excretado fue significativamente menor ($p<0,05$) en los grupos ECcc, iWa y ECwt al comparar sus AUCs con el AUC del grupo control (PBS). Por otra

parte, la Figura 29C representa estos resultados como porcentajes estableciendo el AUC promedio del grupo control como el 100 % de excreción viral. De esta manera, los ratones inmunizados con ECcc y iWa resultaron parcialmente protegidos frente al desafío ya que excretaron un 48 % y un 44 % menos del virus excretado por el grupo control respectivamente. Mientras que los ratones inmunizados con ECwt resultaron totalmente protegidos frente al desafío ya que no se detectó excreción del virus en la materia fecal.

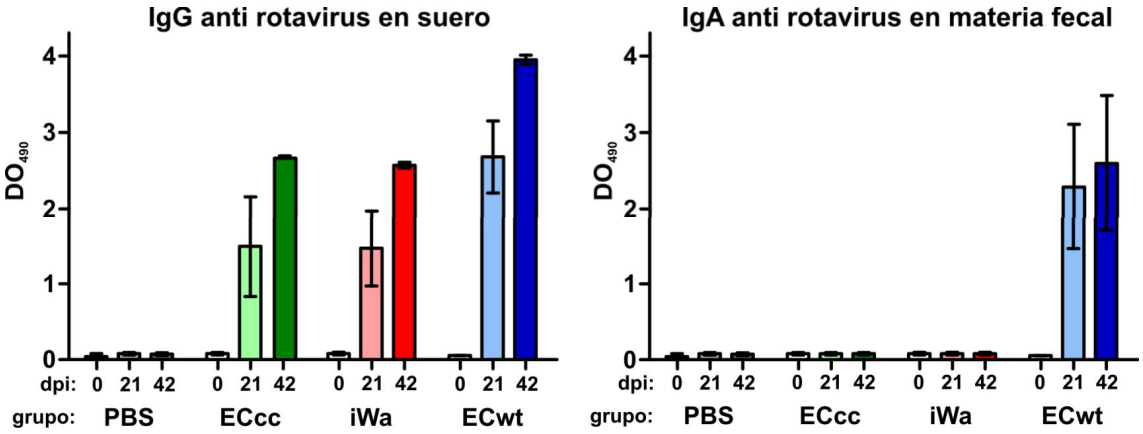


Figura 28. Anticuerpos anti rotavirus en ratones inmunizados con inmunógenos control.

Los gráficos muestran los niveles de anticuerpos específicos para rotavirus determinados por ELISA: IgG en suero (izquierda) e IgA en materia fecal (derecha).

En el eje horizontal se indican los días post inmunización (dpi) y el inmunógeno empleado para cada grupo de ratones. Las barras representan la DO490 promedio para cada grupo y las barras de error representan la desviación estándar.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

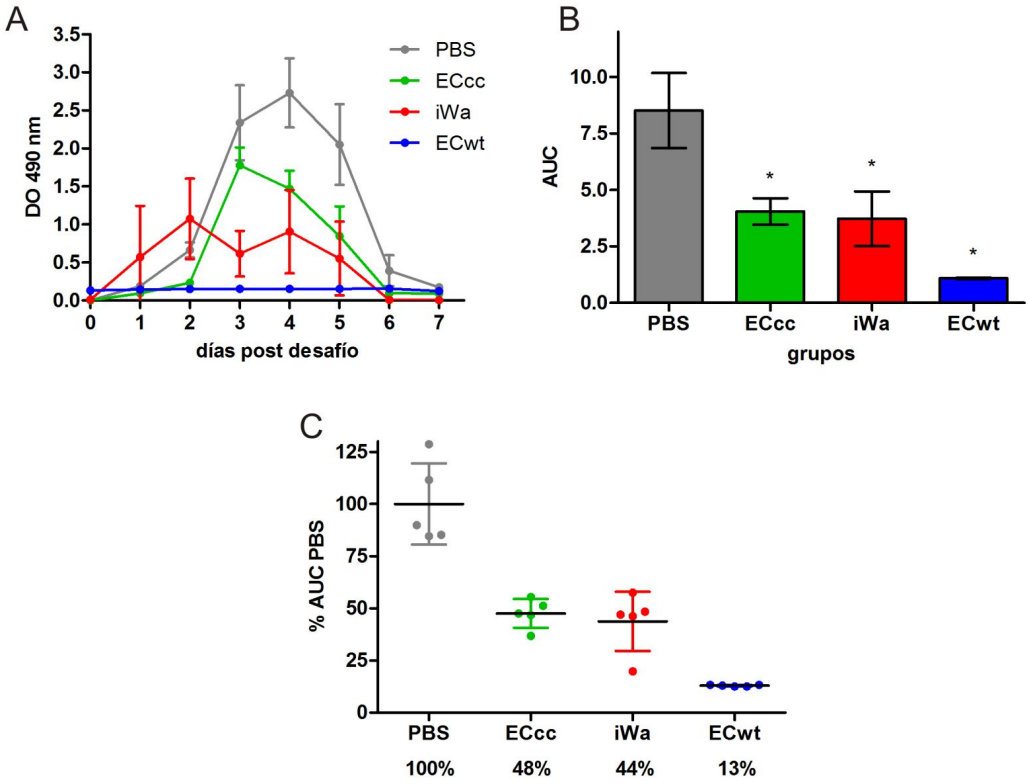


Figura 29. Curvas de excreción de rotavirus y AUC de los ratones inmunizados con inmunógenos control y desafiados con rotavirus murino.
A. Curvas de excreción de rotavirus en la materia fecal detectado por ELISA. B. Área bajo la curva de excreción promedio para cada grupo de ratones. C. Porcentaje del área bajo la curva promedio del grupo control (PBS) para cada grupo de ratones, el valor promedio se indica bajo el nombre del grupo en el eje horizontal. En todos los casos las barras de error representan la desviación estándar. *: $p<0,05$.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Conclusiones

La evaluación de potenciales vacunas contra rotavirus siempre dependió del uso de modelos animales que permitan obtener información sobre la inmunogenicidad y la eficacia protectora, antes de evaluarlas en los costosos ensayos en humanos. El uso de estos modelos también ha sido esencial para profundizar el estudio de la infección por rotavirus, la patología, la enfermedad y la inmunidad, incluyendo los correlatos de protección. Esta información también contribuye al desarrollo de vacunas. El modelo de animal pequeño más empleado es el del ratón adulto, el cual es un modelo de infección ya que no hay desarrollo de enfermedad.

En esta segunda parte de la tesis, se llevó a cabo la puesta a punto del modelo de infección por rotavirus en el ratón adulto. Este proceso incluyó la amplificación, concentración y purificación de distintas cepas de rotavirus con distintos objetivos. Por un lado para disponer del antígeno a emplear en los inmunoensayos y por otro lado para disponer de las cepas homólogas necesarias para el desafío de los ratones. La obtención de partículas de rotavirus purificadas obedece a varios propósitos. En el marco de este trabajo, permitió la evaluación de respuestas inmunes humorales específicas, la obtención de un suero hiperinmune de ratón que también permitirá detectar las proteínas de rotavirus expresadas en distintos sistemas heterólogos. Adicionalmente, en el contexto de las tareas de continuación, las preparaciones de partículas purificadas también se podrán emplear para la evaluación de respuestas celulares específicas y la producción de anticuerpos monoclonales.

La determinación de anticuerpos anti rotavirus requirió la puesta a punto de ensayos de ELISA y Western blot para detectar IgG e IgA en distintos tipos de muestras.

Adicionalmente se establecieron las condiciones óptimas de desafío con la cepa murina salvaje ECwt y los parámetros de detección del virus excretado durante la semana posterior. De esta manera se adquirieron las herramientas necesarias para evaluar la respuesta humoral inducida por diferentes modelos de vacunas y determinar la eficacia protectora de las mismas.

El modelo fue puesto a prueba con inmunógenos control que incluyeron cepas atenuadas o inactivadas de rotavirus, así como la cepa salvaje ECwt. Por medio de estos ensayos se verificaron los resultados de protección esperados (parcial para ECcc e iWa o total para ECwt) y la capacidad de los inmunoensayos de detectar la respuesta humoral específica.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

PARTE III

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE Y DE LA PROTECCIÓN INDUCIDA POR VECTORES HERPÉTICOS QUE EXPRESA

ANTÍGENOS DE ROTAVIRUS

Introducción

Herpesvirus

Los herpesvirus se encuentran altamente diseminados en la naturaleza y se ha detectado al menos un herpesvirus en la mayoría de las especies animales178. La palabra herpes significa arrastrarse en latín, en referencia a la diseminación de las lesiones visibles en la piel que han sido documentadas desde tiempos antiguos. Los herpesvirus pertenecen a la familia Herpesviridae. El virión consiste en un core que contiene el genoma de DNA doble cadena (dsDNA), una cápside icosaédrica de aproximadamente 100-110 nm de diámetro, el tegumento que rodea a la cápside, y una envoltura que posee glicoproteínas virales en su superficie (Figura 30). Esta familia comprende más de 130 miembros con un amplio rango de hospedador, desde mamíferos y aves a anfibios y reptiles197.

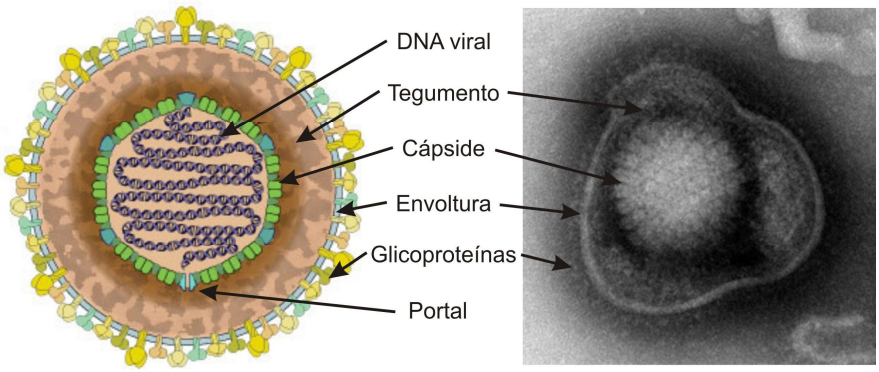


Figura 30. Estructura del virión de herpesvirus.

Los principales componentes estructurales del virión de HSV-1 son: el dsDNA viral empaquetado en una cápside icosaédrica, el tegumento con múltiples proteínas virales y la envoltura lipídica que incluye las glicoproteínas virales. A la izquierda se muestra un esquema del virión de HSV-1 (adaptado de ViralZone: www.expasy.org/viralzone, Swiss Institute of Bioinformatics) y a la derecha se muestra una microscopía electrónica del mis mo (tinción negativa, realizada por E. Schraner, University of Zurich).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Los herpesvirus comparten cuatro características biológicas178 : (1) Todos codifican una gran cantidad de enzimas involucradas en el metabolismo de los ácidos nucléicos, la síntesis de DNA y el procesamiento de proteínas, a pesar de que las enzimas en particular puedan variar de un herpesvirus a otro. (2) La síntesis del DNA viral y el ensamblado de la cápside ocurre en el núcleo y las cápsides adquieren una envoltura temporal al atravesar la membrana nuclear. (3) La producción de la progenie viral está acompañada por la destrucción de la célula infectada, seguida de una diseminación limitada a células vecinas, en general sin comprometer la vida del hospedador. (4) Los herpesvirus tienen la capacidad de permanecer latentes en sus hospedadores naturales alojándose en distintos tipos celulares específicos ya que muchos herpesvirus contienen los genes específicos necesarios para el establecimiento de la latencia. En el estado latente, el genoma viral se encuentra en forma episomal y se replica junto con el DNA del hospedador. Durante este estado, se expresa un pequeño subgrupo de genes virales y no hay producción de virus infeccioso. Los genomas latentes retienen la capacidad de replicarse y causar enfermedad al reactivarse, lo cual es desencadenado por el ambiente celular. Aún no se comprenden completamente los mecanismos precisos que conducen a la reactivación a partir del estado latente.

Los miembros de la familia Herpesviridae se clasifican, en base a sus propiedades biológicas y a las secuencias nucleotídicas de cada miembro individual, en tres subfamilias: α-, β-, y γ-Herpesvirinae. Los miembros de la subfamilia Alphaherpesvirinae se agrupan en base a su rango variable de hospedador, a sus ciclos replicativos relativamente cortos, su diseminación rápida en cultivo, la destrucción eficiente de las células infectadas y la habilidad de establecer infecciones latentes principalmente, aunque no exclusivamente, en ganglios sensoriales. Esta subfamilia incluye a los géneros: Simplexvirus (por ejemplo, HSV-1), Varicellovirus (por ejemplo, VZV), Mardivirus e Iltovirus. Los dos primeros infectan mamíferos, mientras que los últimos dos infectan aves178.

Ciclo replicativo de los herpesvirus

La unión inicial del virus a los receptores celulares (heparán sulfato o proteoglicanos de condroitín sulfato) por medio de las glicoproteínas virales gB y gC es seguida por la fusión de la envoltura con la membrana plasmática celular. La estructura tegumento-cápside sin envoltura es transportada a los poros nucleares donde el DNA es liberado hacia el interior del núcleo. La transcripción y la replicación del genoma viral, así como el ensamblado de nuevas cápsides tienen lugar en el núcleo, mientras que todas las proteínas virales son sintetizadas en el citoplasma.

Durante la infección productiva, las proteínas virales se expresan secuencialmente de un modo estrictamente regulado. Muchas de estas proteínas tienen un rol en la regulación de la expresión génica viral. La RNA polimerasa II del hospedador es la responsable de la transcripción de todos los genes virales durante la infección, a pesar de que existen productos génicos virales que pueden modificar su actividad y estructura. El ingreso del virus es seguido por la expresión de los genes inmediatamente tempranos y tempranos. Varios de los productos génicos tempranos son

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

enzimas y proteínas de unión a DNA (como por ejemplo ICP0, ICP4, ICP22 e ICP27), involucradas en la replicación del DNA viral. El DNA viral se sintetiza por medio del mecanismo del círculo rodante, generándose concatémeros que son clivados en monómeros durante el proceso de ensamblado de la cápside. Las proteínas involucradas en la replicación del DNA viral y el metabolismo nucleotídico promueven la replicación del DNA viral, lo que a su vez estimula la expresión de los genes tardíos. El objetivo final de la expresión de estos genes es producir grandes cantidades de las proteínas virales estructurales para el ensamblado de la progenie viral. El ensamblado de las cápsides ocurre en el núcleo de la célula infectada y, luego de la encapsidación de las moléculas completas de DNA genómico viral, el virus madura, adquiere infectividad y puede diseminarse de una célula a otra81, 178 (Figura 31).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

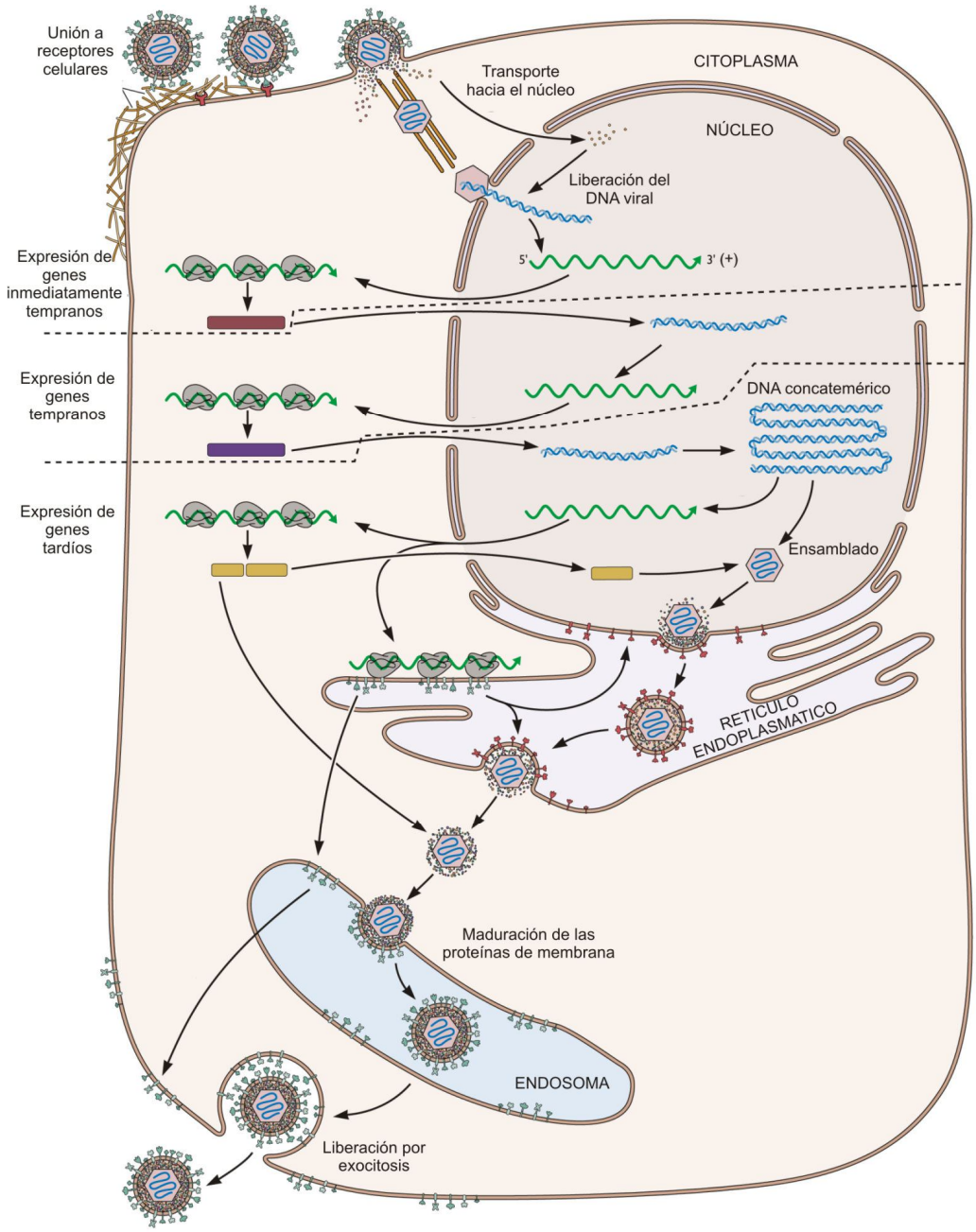


Figura 31. Ciclo replicativo de herpes simplex tipo I.

En el esquema se indican los principales pasos durante una infección productiva por HSV-1. Adaptado de Flint et al, 199981.

Herpes simplex virus tipo 1

El virus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) es un patógeno común en humanos, que causa infecciones en las superficies mucosas orofaciales. Las infecciones productivas conducen a la formación de lesiones vesiculares en la mucosa epitelial, seguida por la diseminación del virus hacia neuronas sensoriales y el establecimiento de una infección latente. El virus puede permanecer en este estado durante toda la vida del hospedador y la reactivación resulta en el desarrollo de la enfermedad recurrente, en el mismo sitio de la infección primaria o en una localización adyacente. Las llagas causadas por HSV-1 no son letales, pero el virus es capaz de infectar el sistema nervioso central, conduciendo a enfermedades graves como queratitis y encefalitis. El virus es capaz de infectar eficientemente una gran variedad de tipos celulares, incluyendo tanto células que se dividen como células que no se dividen235.

HSV-1 es un virus envuelto grande (150-200 nm de diámetro). Su genoma está compuesto por 152 kpb de dsDNA que codifica al menos 80 proteínas (Figura 32). El genoma está compuesto por dos segmentos unidos covalentemente: UL y US (por las siglas en inglés de Unique Long y Unique Short, respectivamente) flanqueados por secuencias repetidas invertidas tanto terminales (RTL y RTS) como internas (RIL y RIS). HSV-1 contiene tres orígenes de replicación, denominados de acuerdo a su ubicación, oriL u oriS, y tres señales de empaquetamiento del DNA denominadas pac ubicadas en las regiones RTL, RTS y en el empalme entre los segmentos UL y US. Las señales pac aseguran el clivaje correcto de los genomas y la incorporación de una unidad genómica completa a cada cápside197.

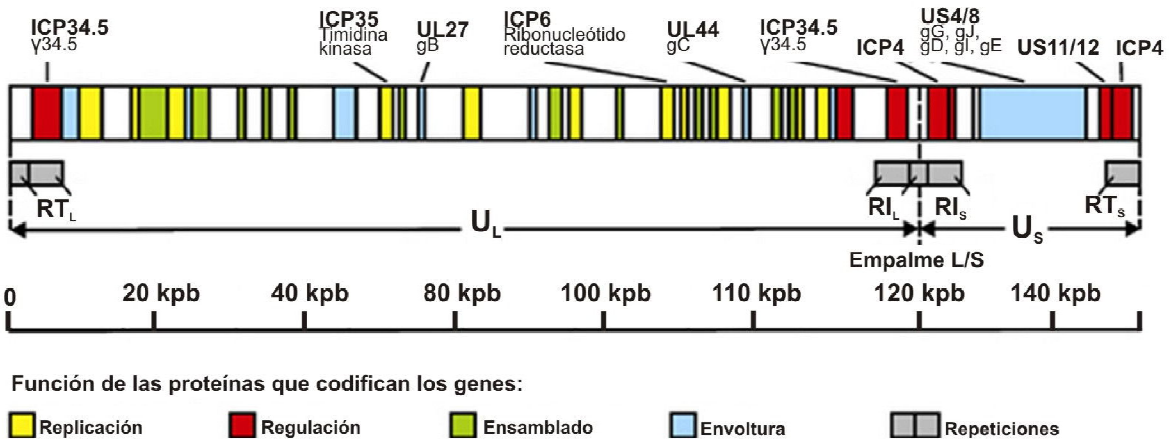


Figura 32. Mapa del genoma de HSV-1.

Representación esquemática de la posición de los genes que codifican para las proteínas involucradas en la replicación del virus, la regulación del ciclo viral y el ensamblado de las cápsides. También se encuentran representadas las repeticiones terminales (RT) e internas (RI) de cada segmento. Sobre el esquema se indican los genes (y sus productos proteicos) que suelen modificarse o delecionarse para atenuar el virus. Adaptada de Argnani et al, 20059.

Vectores virales basados en HSV-1

El estudio de las propiedades biológicas de HSV-1 y de los mecanismos moleculares de su replicación permitió el desarrollo de vectores con diversas aplicaciones potenciales en salud humana, incluyendo el delivery y la expresión de genes humanos a células del sistema nervioso, la destrucción selectiva de células cancerosas, la profilaxis contra infecciones con HSV u otras enfermedades infecciosas, e infecciones dirigidas a tejidos u órganos específicos.

A partir de HSV-1 pueden generarse dos tipos diferentes de vectores72, 138:

1. Vectores recombinantes: consisten en partículas de HSV-1 que contienen el genoma de HSV-1 modificado. Pueden ser atenuados cuando presentan mutaciones en genes que afectan la virulencia, restringiendo así la diseminación y la replicación lítica a células específicas. Por otro lado, pueden ser defectivos cuando presentan al menos una deleción de algún gen con funciones esenciales. Estos vectores son empleados principalmente como virus oncolíticos.

2. Vectores amplicón: consisten en partículas de HSV-1 que contienen un concatémero de DNA derivado de un plásmido amplicón, en lugar del genoma viral. Presentan un origen de replicación de HSV-1 (oriS) y una señal de empaquetamiento (pac) que permite la amplificación e incorporación del plásmido en las partículas. Debido a la ausencia de genes que codifican proteínas virales, los vectores amplicón sólo pueden ser generados en presencia del genoma de HSV-1 provisto por un virus HSV-1 helper o una construcción plasmídica (Figura 33).

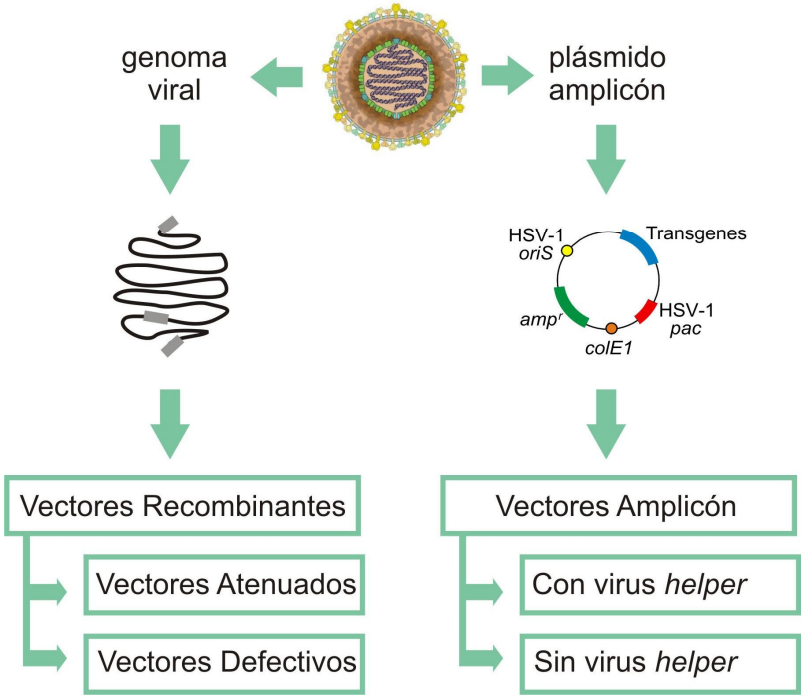


Figura 33. Tipos de vectores basados en HSV-1.

Vectores tipo amplicón basados en HSV-1

Los vectores amplicón son partículas idénticas al virus HSV-1 wild type desde los puntos de vista estructural, inmunológico y de rango de hospedador. Sin embargo en lugar del genoma viral, contienen un plásmido de DNA en forma concatemérica denominado plásmido amplicón212, 213. Las partículas de vector amplicón están compuestas por aproximadamente 40 proteínas virales estructurales que llegan a la célula durante la infección. Por lo tanto, pueden desencadenar cascadas de señales intracelulares que pueden afectar transientemente la homeostasis celular o la expresión celular. Sin embargo, estas proteínas desaparecen rápidamente y las células mantienen sus funciones normales52.

Los plásmidos amplicón (Figura 33) son plásmidos estándar de Escherichia coli que incluyen dos elementos no codificantes de HSV-1: el origen de replicación (oriS) y la señal de corte/empaquetamiento (pac). Adicionalmente incluyen un origen de replicación bacteriano (colE1) y un gen de resistencia a antibiótico para su propagación en E. coli (ampR). También contiene el cassette de expresión con los transgenes de interés, incluyendo un marcador fluorescente que permite la titulación de los stocks del vector amplicón. Los amplicones pueden ser empaquetados en viriones de HSV-1 en distintas líneas celulares como amplicones simples de hasta 150 kpb o como concatémeros con múltiples copias del cassette de transgenes gracias a la replicación por círculo rodante y la capacidad de empaquetamiento del genoma de 150 kpb. Esto resulta en altos niveles de expresión génica209.

Una de las principales ventajas de los vectores amplicón como herramientas de transferencia génica es el hecho de que no contienen genes virales y, en consecuencia, no inducen la síntesis de proteínas de HSV-1. Por lo tanto, estos vectores no son tóxicos para las células infectadas y no son patogénicos para el organismo. La reactivación, complementación o recombinación con genomas de HSV-1 latentes se reduce marcadamente al generar los vectores amplicón con un sistema libre de virus helper200.

Los vectores amplicón no expresan ningún gen viral pero dependen de funciones helper para la replicación y el empaquetamiento en viriones de HSV-1. Para la producción de los stocks de vector amplicón, estas funciones se proveen en trans por medio de un genoma viral (contenido en una construcción plasmídica) o de un virus HSV-1 helper.

Producción de vectores amplicón dependiente de virus helper

El sistema de empaquetamiento dependiente de virus helper consiste en un proceso de dos pasos. Inicialmente se transfectan células con el plásmido amplicón y se infectan con el virus helper. Debido a que este es un virus defectivo y presenta deleciones de los genes ICP34.5 (factor de virulencia) e ICP4 (gen inmediatamente temprano esencial), la infección y

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

la transfección se llevan a cabo en células que expresan ICP4. Esto resulta en una producción mixta de vector amplicón y virus helper. En un segundo paso, esta producción se emplea para infectar células que además de expresar ICP4, expresan la recombinasa Cre. Debido a que la señal pac del virus helper se encuentra flanqueada por dos sitios loxP (específicos de la recombinasa Cre) se inhibe el empaquetamiento del genoma del virus helper y sólo se produce el empaquetamiento del plásmido amplicón. Este sistema permite la preparación de stocks de vector conteniendo entre 0,05 y 0,5 % del virus helper como contaminante. Dado que ICP4 se encuentra delecionado en el genoma helper, este virus sólo puede replicar en células que lo complementen. Sin embargo, la contaminación puede ser tóxica para células sensibles y puede inducir una respuesta inmune contra las células transducidas. Además podría ocurrir una recombinación con el genoma de un HSV-1 endógeno132.

Producción de vectores amplicón independiente de virus helper

En este sistema (Figura 34), el genoma de HSV-1 (con la señal pac delecionada) se encuentra clonado en un cromosoma bacteriano artificial (BAC) basado en un plásmido F de copia única, denominado fHSVΔpac201. Usando este BAC, aún podría existir la posibilidad de una recombinación homóloga entre las secuencias oriS presentes tanto en fHSVΔpac como en el plásmido amplicón, lo que conduciría a la reincorporación de la señal pac en el genoma helper. Por ello se realizó una deleción adicional en el genoma de HSV-1 contenido en el BAC. El gen esencial ICP27 fue eliminado del genoma para obtener fHSVΔpacΔ27199, 200.

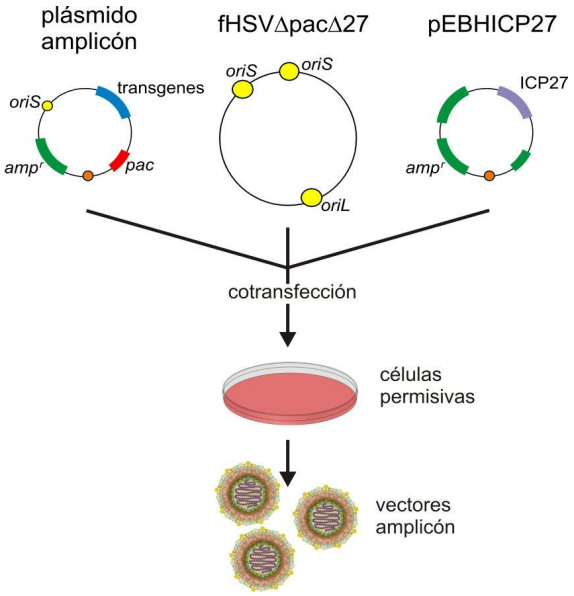


Figura 34. Esquema representativo del sistema de empaquetamiento libre de virus helper.

La cotransfección de células permisivas con el plásmido amplicón, el BAC que contiene el genoma de HSV-1 (fHSVΔpacΔ27) y un plásmido que expresa ICP27 (pEBHICP27) resulta en la producción de stocks de vector amplicón libre de virus helper. oriS y oriL: origenes de replicación de HSV-1, pac: señal de corte/empaquetamiento, ampR: resistencia a ampicilina. Adaptado de Laimbacher et al, 2012117.

En resumen, el sistema involucra la cotransfección del plásmido amplicón (conteniendo los transgenes de interés) y fHSV∆pac∆27 (conteniendo el genoma de HSV-1 con deleciones de pac e ICP27) en la línea celular VERO 2-2. Esta línea celular se encuentra establemente transformada con el gen ICP27. La complementación del gen ICP27 se asegura por cotransfección con un plásmido que expresa ICP27. Empleando este genoma helper en ausencia de virus atenuado, se logra el empaquetamiento del plásmido amplicón en tándem hasta completar la capacidad máxima sin detectarse HSV-1 replicativo en los stocks de vector amplicón200.

Vectores amplicón basados en HSV-1 como vacunas

El virus salvaje HSV-1 es un potente inmunógeno capaz de inducir respuestas inmunes innatas y adaptativas235, pero también capaz de evadir el sistema inmune del hospedador por medio de proteínas inmunomoduladoras como VHS o ICP27235. Los vectores amplicón basados en HSV-1 son candidatos prometedores para el desarrollo de vacunas debido a que retienen la inmunogenicidad inherente al virus salvaje, pero no disponen de muchas de las funciones virales para evadir el sistema inmune. Otras características biológicas que los hacen candidatos atractivos como vacunas son su gran capacidad para insertar transgenes y la posibilidad de infectar un amplio rango de células (incluyendo células presentadoras de antígenos). Se ha demostrado que la transducción de células dendríticas con vectores amplicón no inhibe su maduración ni sus capacidades inmunoestimulatorias97, 168, 238. Hasta ahora los estudios que involucran inmunizaciones con vectores amplicón se han vinculado a patógenos virales, tratamientos contra el cáncer y enfermedades neurológicas.

La mayoría de los estudios relacionados a patógenos virales se enfocan en inmunizaciones contra HIV. Se ha demostrado que una sola inoculación con 1x106 partículas de vectores amplicón que expresan la proteína de la envoltura de HIV-1 (gp120), permitió inducir una respuesta inmune celular y humoral fuerte y específica contra el antígeno106. Esta respuesta se vio incrementada al agregar una dosis adicional de vector amplicón. También pudo observarse protección parcial frente a un desafío con HIV-1 en ratones transgénicos inmunizados con este vector97. Por otro lado también se han construido vectores amplicón que expresan la proteína gag de HIV-1 y se demostró que resultaban inmunogénicos203.

Una posibilidad adicional de estos vectores es utilización para la producción de VLPs (virus like particles). Un estudio demostró la producción de VLPs en cultivo celular luego de la transducción con vectores amplicón que expresan antígenos del virus de la fiebre aftosa (FMDV). La administración de estos vectores a ratones resultó en una respuesta inmune específica, y en la protección parcial con una reducción significativa de la viremia frente a un desafío con cepas de este virus56.

Debido a la alta prevalencia de infecciones por HSV en la población humana, una de las preocupaciones para su uso como vacunas es el efecto potencial de la inmunidad antiviral preexistente sobre la eficacia de la vacuna. Este es un interrogante controversial ya que un estudio

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

(en el que se emplearon vectores defectivos) demostró una reducción sustancial en la respuesta inmune de animales inmunizados previamente con HSV-1119. En contraste, la inmunización con vectores amplicón en presencia de inmunidad anti HSV resultó en una reducción moderada de la respuesta31, 106. A pesar de que esta información sugiere un posible efecto de las infecciones previas por HSV sobre la eficacia de las vacunas basadas en el mismo virus, no se ha demostrado una ausencia de respuesta inmune en estas condiciones. Por lo tanto, podrían ser prometedores los protocolos de inmunización que incluyan varias dosis del vector o aquellos que contemplen una combinación de estrategias, por ejemplo una administración inicial de DNA que codifique para un antígeno de interés seguida de la administración de un vector basado en HSV que expresa dicho antígeno229.

Objetivo general

Evaluar los vectores herpéticos de tipo amplicón como vehículo de delivery antigénico en un modelo de rotavirus.

Objetivos particulares

-Producir stocks de vectores herpéticos de tipo amplicón que expresan una o más proteínas de rotavirus.

-Analizar la expresión de las proteínas de rotavirus en células transducidas con los vectores amplicón.

-Evaluar la capacidad de los vectores de inducir la formación de VLPs en cultivo celular.

-Evaluar la capacidad de los vectores amplicón de inducir la producción de anticuerpos específicos para rotavirus en ratones inmunizados.

-Evaluar la capacidad de los vectores de inducir protección frente al desafío con rotavirus en ratones inmunizados.

Materiales y métodos

Células y virus. Las líneas celulares epiteliales de riñón de mono HeLa, HEK293, Vero y Vero 2-2210 se cultivaron en DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 0,25 µg/ml de anfotericina B. En el caso de las células Vero 2-2 se adicionó 500 µg/ml de G418 (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos). Se emplearon las cepas de rotavirus RRV, Wa, SA11, ECcc y ECwt propagadas como se indicó en la sección “Materiales y métodos” de la Parte II de esta tesis. La cepa de rotavirus de simio SA11 fue cedida por la Dra. Catherine Eichwald (Institute of Virology, University of Zurich, Suiza).

Construcción de los plásmidos amplicón*. Los plásmidos amplicón se construyeron a partir del plásmido pHSVPrPUC89. Este plásmido contiene un origen de replicación bacteriano (colE1), la señal de empaquetamiento de HSV-1 (pac), un sitio de clonado múltiple ubicado a continuación del promotor inmediatamente temprano de HSV-1 (IE4/5) y la señal de poliadenilación de SV40 (poliA). Para obtener el plásmido amplicón pHSV[EGFP], se amplificó por PCR el ORF del gen que codifica

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

para la proteína EGFP y se lo insertó entre los sitios SacI y EcoRI del plásmido pHSVPrP UC. El mantenimiento de EGFP en todas las construcciones derivadas de pHSV[EGFP] permitió la titulación de los stocks de vector amplicón, así como la identificación de las células infectadas por los mismos56. A continuación se detalla la construcción de los plásmidos amplicón que permiten introducir uno (pHSVS), dos (pHSVD) o tres (pHSVT) genes heterólogos además de EGFP y en la Figura 35 se muestra una representación esquemática de dichas construcciones.

Para la obtención de pHSVS, se amplificó por PCR el fragmento correspondiente al IRES (Internal Ribosomal Entry Site) de poliovirus empleando como molde el plásmido pQuattro87 y se lo insertó entre los sitios SalI y XbaI del plásmido pHSV[EGFP].

Para la obtención de pHSVD, el fragmento que codifica el elemento IRES de poliovirus se insertó entre los sitios ClaI y XbaI del plásmido pHSVS. El plásmido resultante contiene dos IRES entre el promotor y la señal de poliadenilación (poliA).Para la obtención de pHSVT, se amplificó por PCR el IRES del virus de laencefalomiocarditis (EMCV) empleando como molde el plásmido pQuattro y se lo insertó entre los sitios SpeI y Ecl123II del plásmido pHSVD. El plásmido resultante contiene tres IRES entre el promotor y la señal poliA.

Construcción de los plásmidos amplicón que codifican proteínas de rotavirus*. Los ORF de las proteínas VP2, VP4, VP6, VP7 y NSP4 de las cepas de rotavirus RRV y EC, clonados en distintos plásmidos se amplificaron mediante PCR empleando primers específicos que incluyeron sitios de restricción para su posterior clonado en los plásmidos amplicón. Los ORF de las proteínas VP2, VP6 y VP7 de la cepa de rotavirus Wa se obtuvieron por síntesis química de DNA (Biomatik, Cambridge, ON, Canadá) luego de una optimización de codones empleando las frecuencias de uso de codones correspondientes a Homo sapiens (GenBank Primate Sequences). Para la introducción de un ORF de rotavirus en pHSVs [EGFP] se emplearon los sitios de restricción SalI, AsuII, o SalI y AsuII; obteniendo así pHSVS [ORF1/EGFP]. Para la introducción de otro ORF de rotavirus en pHSVS[ORF1/EGFP] se empleó la combinación de sitios de restricción AscI/ClaI; obteniendo así pHSVD[ORF1/ORF2/EGFP]. Para la introducción de un tercer ORF de rotavirus en pHSVD [ORF1/ORF2/EGFP] se emplearon las combinaciones de sitios de restricción XhoI/SpeI; obteniendo así pHSVT[ORF1/ORF2/ORF3/EGFP]. De acuerdo a esta nomenclatura, cada barra entre los diferentes ORFs indica un IRES y debido a que EGFP está presente en todas las construcciones se obviará de aquí en adelante por cuestiones de simplicidad, excepto en el plásmido amplicón pHSV[EGFP] que no incluye ninguna proteína de rotavirus (Figura 35).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

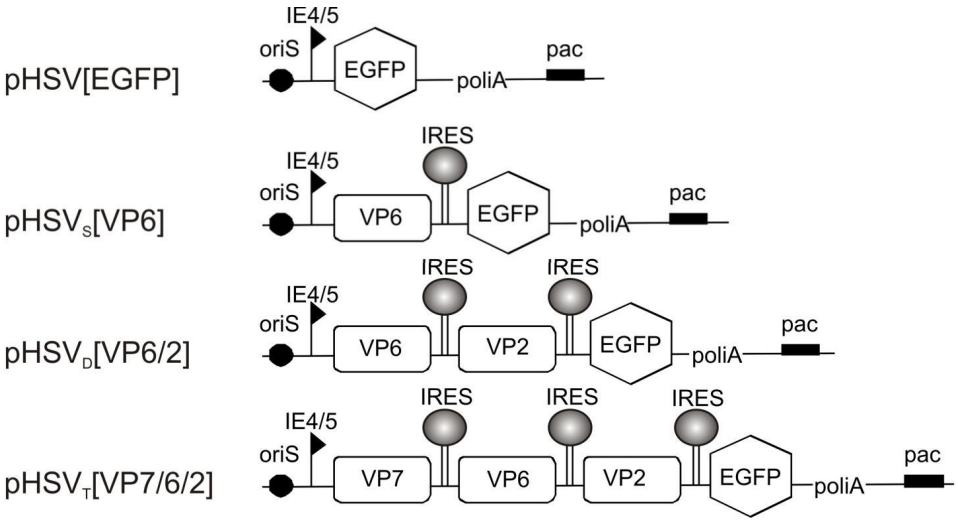


Figura 35. Representación esquemática de los plásmidos amplicón.

A la izquierda se indica el nombre de algunos de los plásmido amplicón construídos y a la derecha se muestra el orden de los genes de rotavirus incorporados. La expresión policistrónica es facilitada por los IRES y controlada por el promotor de HSV-1 IE4/5. Todos los plásmidos expresan EGFP para permitir la titulación de los stocks de vector amplicón. También se indican en el diagrama el origen de replicación de HSV-1 (oriS) y la señal de corte y empaquetamiento (pac).

Producción de los stocks de vectores amplicón*. Los stocks de vectores amplicón basados en HSV-1 libres de virus helper se prepararon como fue descripto previamente82, 83, 200, 201. Brevemente, se transfectaron células Vero 2-2 con el plásmido amplicón, el BAC fHSV∆pac∆27 y el plásmido pEBHICP27, empleando Lipofectamine y Plus Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Luego de 72 horas, se resuspendieron las células en el medio de cultivo, se sonicaron y se removieron los restos celulares por centrifugación. Para la titulación, se infectaron células Vero 2-2 con el vector amplicón y luego de 24 horas se contaron las células fluorescentes verdes empleando un microscopio de fluorescencia invertido (Axio Observer, Zeiss AG, Feldbach, Suiza). Los títulos se determinaron como unidades de transducción (TU)/ml y variaron entre 2x106 y 2x108 TU/ml. Para la inactivación de los vectores amplicón, se los trató con BEI (etilenimina binaria)1 en una concentración final de 1,4 mM durante 24 horas a temperatura ambiente. La inactivación se confirmó por ausencia de expresión detectable luego de la transducción de células Vero 2-2 y análisis por Western blot.

Análisis de la expresión de las proteínas de rotavirus por Western blot*. Se sembraron 1x105 células Vero 2-2 por well en placas de cultivo de 24 wells y se agregaron los vectores amplicón a una multiplicidad de infección de 1 TU por célula. Veinticuatro horas después, las células se lavaron con PBS, se lisaron con buffer de siembra y se separaron por SDS-PAGE 10 %. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente y se marcaron con anticuerpos anti inmunoglobulinas de ratón (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) o de conejo (Southern Biotech, Birmingham, AL, Estados Unidos) conjugados con peroxidasa. La detección se realizó empleando el kit

Amersham ECL Western Blotting Analysis System (GE Healthcare Biosciences, Pittsburg, PA, Estados Unidos) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Como anticuerpos primarios se emplearon: suero policlonal de conejo anti rotavirus cepa RF (gentilmente cedido por el Dr. Poncet, CNRS/INRA, Gif-sur-Yvette, Francia), anticuerpos monoclonales de ratón anti GFP (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, Estados Unidos) y anticuerpos monoclonales de ratón anti actina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos). Para reutilizar las membranas, se las incubó durante 15 minutos con solución de disociación (Stripping Buffer, Thermo Scientific, Rockford, IL, Estados Unidos) y se las lavó tres veces con PBS.

Ensayos de inmunofluorescencia*. Se crecieron células Vero 2-2 sobre cubreobjetos dentro de placas de cultivo de 24 wells y se las infectó con el vector amplicón a una multiplicidad de infección de 0,5 TU por célula. Veinticuatro horas después, las células se fijaron con formaldehido 3,7 % en PBS y se las trató con glicina 0,1 M en PBS. Luego de un paso de permeabilización con PBS-T, las células se bloquearon con PBS-BSA (PBS conteniendo 3 % de albúmina sérica bovina). Las células se incubaron con suero policlonal anti rotavirus cepa RF diluído 1/400 en PBS-BSA durante 90 minutos a temperatura ambiente y luego se lavaron tres veces con PBS. Como anticuerpo secundario se emplearon anticuerpos de cabra anti IgG de conejo conjugados con Alexa Fluor 594 o 633 (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) diluídos 1/400. Las células se incubaron con DAPI 1µg/ml (Roche, Basel, Suiza) en PBS para visualizar los núcleos. El retículo endoplasmático se marcó empleando ConcavalinaA conjugada con Alexa Fluor 594 20 µg/ml (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) en PBS. Luego de lavar las células con PBS y agua, se analizaron empleando un microscopio confocal láser de barrido SP2 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) y un objetivo 63X (aceite).

Microscopía electrónica*. Se sembraron 1,2x106 células Vero 2-2 en placas de cultivo de 6 cm2 y se las infectó con el vector amplicón a una multiplicidad de infección de 0,5 o 1 TU por célula. Luego de 48 horas, las células se resuspendieron en el medio de cultivo y fueron sometidas a ciclos repetidos de congelado y descongelado. Los restos celulares se removieron por centrifugación y filtración a través de filtros de 0,45 µm. Se le adicionó inhibidor de proteasas (Protease inhibitor cocktail tablets complete, Mini, EDTA-free, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) y el sobrenadante clarificado se concentró a través de un colchón de sacarosa 10 % por centrifugación a 100.000 g durante 2 horas a 20 °C. Para la inmunoelectromicroscopía, las muestras se adsorbieron sobre films de parlodion/carbono montados sobre cuadrículas de cobre (EMS, Fort Washington, PA, Estados Unidos) durante 10 minutos, se bloquearon con PBS-BSA durante 10 minutos y se incubaron con suero policlonal anti rotavirus diluído 1/1.000 en PBS-BSA durante una hora. Se lavó con PBS- BSA y se incubó con anticuerpos de cabra anti inmunoglobulinas de conejo conjugados con partículas de oro coloidal de 12 nm (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, Estados Unidos). Se lavó con PBS y agua y luego se marcó con ácido fosfotúngstico 2 % (Aldrich, Steinheim, Alemania) durante 1 minuto. El análisis se realizó empleando un microscopio de transmisión electrónica (CM12, Philips, Eindhoven, Holanda)

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

equipado con una cámara CCD (Ultrascan 1000, Gatan, Pleasanton, CA, Estados Unidos) a un voltaje de aceleración de 100 kV.

Inmunización de ratones con vectores amplicón que expresan proteínas de rotavirus. Se inmunizaron grupos de ratones por vía intramuscular (en ambas patas traseras con un volumen total no mayor a 100 µl) en los días 0 y 21 con distintos vectores amplicón que expresan las proteínas de rotavirus (Figura 36). A continuación se detallan las inmunizaciones realizadas en cuatro experimentos representativos:

Experimento 1: Se inmunizaron grupos de 4 ratones con 5x105 TU/dosis de HSVT[VP7/6/2] (ORFs de rotavirus, cepa RRV), 5x105 TU/dosis de HSV[EGFP], o PBS.

Experimento 2: Se inmunizaron grupos de 4 ratones con 1x106 TU/dosis de HSVT[VP7/6/2] (ORFs de rotavirus, cepa RRV), 1x106 TU/dosis de HSVS[VP7] (ORF de rotavirus cepa RRV), 1x106 TU/dosis de HSV[EGFP], o PBS.

Experimento 3. Se inmunizaron grupos de 4 ratones con 1x106 TU/dosis de HSVT[VP7/6/2] (ORFs de rotavirus, cepa RRV), 1x106 TU/dosis de iHSVT[VP7/6/2] (ORFs de rotavirus, cepa RRV) inactivado con BEI, 1x106 TU/dosis de HSVS[VP6] (ORF de rotavirus, cepa RRV), 1x106 TU/dosis de HSV[EGFP], o PBS.

Experimento 4. Se inmunizaron grupos de 5 ratones con 1x106 TU/dosis de HSVT[VP7/6/2] (ORFs de rotavirus, cepa RRV), 1x106 TU/dosis de HSVD[VP6/2] (ORFs de rotavirus, cepa RRV), 1x106 TU/dosis de HSVT[VP2/6/7] (ORFs de rotavirus cepa Wa con codones optimizados), 1x106 TU/dosis de HSV[EGFP], 20 µg de iWa o PBS.

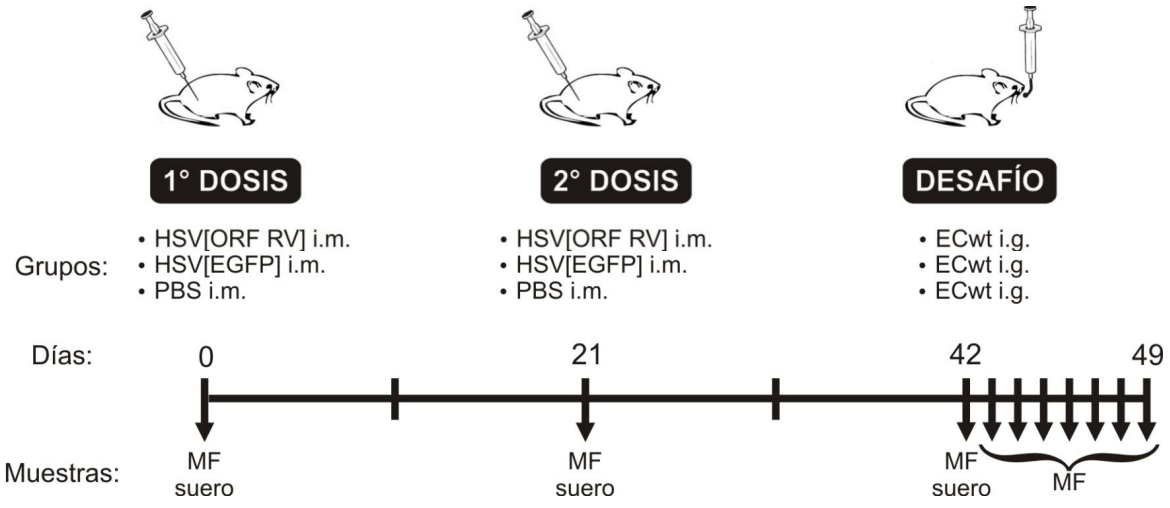


Figura 36. Cronograma de inmunización con los vectores amplicón.

El diagrama muestra el tratamiento recibido por cada grupo de ratones (parte superior) a lo largo del cronograma de inmunización y desafío, así como las muestras recolectadas (parte inferior). i. m.: intramuscular, i.g.: intragástrico, HSV[ORF RV]: vector amplicón que expresa proteínas de rotavirus, MF: materia fecal.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Recolección de muestras de suero y materia fecal. Las muestras de sangre se obtuvieron por corte del extremo de la cola del ratón, se centrifugaron a 5.000 g durante 10 minutos para obtener el suero y se almacenaron a -20 °C. Las muestras de materia fecal se diluyeron al 10 % p/v en PBS adicionado con Tween 0,05 % e inhibidor de proteasas Protease Inhibitor Cocktail (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos), se vortexearon hasta obtener una suspensión homogénea, se centrifugaron 10 minutos a 8.000 g, se recuperaron los sobrenadantes y se almacenaron a -80 °C.

Desafío de los ratones con rotavirus ECwt. Los ratones de cada experimento fueron inoculados por vía intragástrica con 104 SD50 de rotavirus ECwt en 100 µl de volumen final, previa neutralización de la acidez estomacal con 100 µl de bicarbonato de sodio 4 %. A partir del día de desafío se recolectaron diariamente muestras individuales de materia fecal (Figura 36) y se ensayaron por ELISA para la detección de antígenos de rotavirus en una dilución 1/40 en PBS-TC. Para calcular el área bajo la curva (AUC) de excreción de antígeno de rotavirus para cada ratón, se graficaron en el eje vertical los valores de DO490 obtenidos por ELISA y en el eje horizontal los días post-desafío. El porcentaje de excreción con respecto al grupo de ratones control se calculó considerando como 100 % el AUC de los ratones inoculados con PBS y el porcentaje de protección se determinó como 100 % menos el porcentaje de excreción. Para comparar las medias entre los distintos grupos se empleó la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis y el método de Dunn como contraste a posteriori.

ELISA para la detección de rotavirus. Se empleó un ELISA desarrollado en el Laboratorio de Inmunología y Virología, UNQ10 para la detección de las muestras positivas para rotavirus del grupo A. El método consiste en un ELISA de captura que emplea anticuerpos policlonales de cabra anti-rotavirus. Se sensibilizaron placas de 96 wells con una dilución 1/250 de IgG purificada de cabra anti-rotavirus en buffer carbonato pH 9,6 incubando 1 hora a temperatura ambiente. Luego de cada una de las incubaciones, la placa se lavó tres veces con PBS-T (PBS, Tween-20 0,2 %). Las muestras a analizar se diluyeron en PBS-TC (PBS-T, caseína 1 %), se depositaron en los wells y se incubaron 1 hora a 37 ºC u overnight a 4 ºC. Luego del lavado se incubó con una dilución 1/1.000 de IgG purificada anti-rotavirus biotinilada en PBS-TC durante 1 hora a 37 °C, se lavó y se incubó 30 minutos con una dilución 1/4.000 de estreptavidina conjugada con peroxidasa (USBiologicals, Swampscott, MA, Estados Unidos) en PBS-TC.

Finalmente, y luego de un último lavado, las placas se revelaron con orto- fenilendiamina 1 mg/ml (OPD) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) y peróxido de hidrógeno (0,03 % v/v) en buffer citrato, pH 5,0. Luego de 15 minutos de desarrollo de color la reacción se detuvo con ácido sulfúrico 1 N y se determinó la densidad óptica a 490 nm (DO490) en un lector de microplacas Asys UVM 340 (Biochrom US, Holliston, MA, Estados Unidos), considerándose positivas aquellas muestras con DO490 mayor a 0,210.

ELISA para la detección de IgG anti rotavirus. El ELISA fue puesto a punto como se describió en la sección “Resultados” de la Parte II de esta tesis. Se sensibilizaron placas de 96 wells con

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

RRV concentrado 1/100 en buffer carbonato durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego de cada incubación se realizaron tres lavados con PBS-T. Las muestras se agregaron diluídas en PBS-TC y se incubó durante 1 hora a 37 °C. A continuación se agregaron anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugados con peroxidasa (Pierce, Rockford, IL, Estados Unidos) diluídos 1/3.000 en PBS-TC y se incubó durante 1 hora a 37°C. El revelado se llevó a cabo con OPD y peróxido de hidrógeno en buffer citrato. La reacción se detuvo con ácido sulfúrico y se midió la DO490. El valor de corte del ELISA fue DO490=0,11. Como control positivo se incluyó en todos los ensayos una dilución 1/40.000 (almacenada en alícuotas a -20 °C) de suero policlonal anti rotavirus (DO490=1).

ELISA para la detección de IgA anti rotavirus. El ELISA fue puesto a punto como se describió en la sección "Resultados" de la Parte II de esta tesis. Se sensibilizaron placas de 96 wells con anticuerpos de cabra anti IgA de ratón (Pierce, Rockford, IL, Estados Unidos) 1/50 en buffer carbonato. Luego de cada incubación se realizaron tres lavados con PBS-T. Las muestras se agregaron diluídas en PBS-TC y se incubó durante 1 hora a 37 °C. A continuación se agregó RRV concentrado 1/100 en PBS-TC y se incubó overnight a 4 °C. Para detectar el antígeno unido, se incubó con anticuerpos de cabra anti-rotavirus conjugados con biotina 1/1.000 en PBS-TC durante 1 hora a 37 °C y luego con estreptavidina conjugada con peroxidasa (USBiologicals, Swampscott, MA, Estados Unidos) 1/4.000 en PBS-TC durante 30 minutos a 37 °C. El revelado se llevó a cabo con OPD y peróxido de hidrógeno en buffer citrato. La reacción se frenó con ácido sulfúrico y se midió la DO490. El valor de corte del ELISA fue DO490=0,15. Como control positivo se incluyó en todos los ensayos una dilución 1/1.500 (almacenada en alícuotas a -20 °C) de materia fecal de ratones inoculados con ECwt conteniendo IgA anti rotavirus (DO490=1).

Western blot para la detección de IgG. El Western blot fue puesto a punto como se describió en la sección "Resultados" de la Parte II de esta tesis. Se separaron por SDS-PAGE las proteínas de rotavirus RRV concentrado y se transfirieron a una membrana de PVDF. Se bloqueó la membrana con PBS-TC durante 1 hora a 37 °C y se cortaron las calles individuales. A continuación se incubó con las muestras diluídas en PBS-TC durante 1 hora a 37 °C y se realizaron tres lavados con PBS-T durante 10 minutos cada uno a temperatura ambiente. Luego se detectaron los anticuerpos unidos agregando anticuerpos de cabra anti- IgG de ratón conjugados con peroxidasa (Pierce, Rockford, IL, Estados Unidos) diluídos 1/2.000 en PBS-TC e incubando durante 1 hora a 37 °C. Finalmente se realizaron dos lavados con PBS-T durante 10 minutos cada uno y un lavado con PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. El revelado se llevó a cabo empleando un reactivo quimioluminiscente y exposición a una placa radiográfica.

Western blot para la detección de IgA anti rotavirus. El Western blot fue puesto a punto como se describió en la sección "Resultados" de la Parte II de esta tesis. Se separaron por SDS-PAGE las proteínas de rotavirus RRV concentrado y se transfirieron a una membrana de PVDF. Se bloqueó la membrana con PBS-TC durante 1 hora a 37 °C y se cortaron las calles individuales. A continuación se incubó con las muestras diluídas en PBS- TC durante 1 hora a 37 °C y se realizaron tres lavados con PBS-T durante 10 minutos cada uno a temperatura ambiente. Luego se

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

detectaron los anticuerpos unidos con anticuerpos de cabra anti-IgA de ratón (Pierce, Rockford, IL, Estados Unidos) diluídos 1/200 en PBS-TC e incubación durante 1 hora a 37°C y se realizaron tres lavados con PBS-T durante 10 minutos cada uno a temperatura ambiente. Como anticuerpo secundario se emplearon anticuerpos anti inmunoglobulinas de cabra conjugados con peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, Estados Unidos) diluídos 1/7.500 en PBS-TC incubando durante 1 hora a 37 °C. Dos lavados con PBS-T durante 10 minutos cada uno a temperatura ambiente. Finalmente se realizaron dos lavados con PBS-T durante 10 minutos cada uno y un lavado con PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. El revelado se llevó a cabo empleando un reactivo quimioluminiscente y exposición a una placa radiográfica.

Resultados y discusión

Los vectores amplicón basados en HSV-1 construidos incluyeron secuencias de varios genes provenientes de distintas cepas de rotavirus. Los genes codificantes para las proteínas estructurales VP6, VP2, VP7 y VP4 fueron los seleccionados para realizar los vectores simples, o los vectores dobles y triples que permitieran la coexpresión de más de una de estas proteínas. Los motivos principales para incluir el gen que codifica la proteína VP6 en las construcciones, fueron la abundancia relativa de esta proteína en el virión, su inmunogenicidad y el hecho de que se encuentra altamente conservada entre las cepas de rotavirus del grupo A. Por otra parte, la coexpresión de VP6 y VP2 se planteó con la intención de inducir la producción de VLPs en las células infectadas (en uno de los casos se incluyó también el gen de NSP4 con el objetivo de facilitar la formación de las partículas). También se incluyeron los genes que codifican para las proteínas VP4 y VP7, ya que ambas son capaces de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes en el hospedador.

Con el objetivo de evaluar la inmunogenicidad y la capacidad protectora de los vectores amplicón que expresan proteínas de rotavirus, los mismos se ensayaron en el modelo de ratón adulto de infección por rotavirus. Por este motivo, una de las cepas de rotavirus seleccionadas como origen de las secuencias de las proteínas fue una cepa homóloga al modelo de ratón: la cepa de rotavirus murino EC. Por otro lado, se seleccionó la cepa de rotavirus de simio RRV para evaluar la posible inducción de protección heteróloga.

Diversos factores influyeron en qué conjuntos de vectores amplicón alcanzaron la etapa final de obtención de stocks destinados a la inmunización de ratones. Entre ellos, pueden mencionarse la disponibilidad inicial de las cepas de rotavirus, las dificultades intrínsecas al proceso de clonado y expresión de proteínas en sistemas heterólogos y la optimización de la producción de stocks de vectores amplicón. Además, la distancia geográfica entre los laboratorios que participaron de la colaboración también influyó en cuándo y qué vectores amplicón fueron producidos a lo largo del proyecto. Por estos motivos, inicialmente sólo se contó con stocks de vectores amplicón con títulos bajos que impidieron la administración intramuscular y que limitaron el número de ratones por grupo. Así también, la disponibilidad temprana de las secuencias de la cepa RRV aceleró el proceso de producción de vectores triples con secuencias de esta cepa y los resultados positivos obtenidos con los mismos, pospusieron el desarrollo de vectores que

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

codifiquen las proteínas de rotavirus de la cepa EC. De la misma manera, los resultados obtenidos con distintos vectores en cultivo celular impusieron un sesgo en la elección de vectores destinados a la inmunización de ratones. La Tabla 9 resume los distintos vectores amplicón ensayados y los resultados obtenidos en cuanto a la respuesta inmune humoral inducida y el porcentaje de protección determinado luego del desafío con rotavirus.

Tabla 9. Vectores amplicón evaluados en el modelo de ratón adulto.

Vector amplicón	Cepa de RV	Dosis	Vía	IgG anti RV	IgA anti RV	Protección
HSVS[VP2]	EC	4 x 105 TU	s.c.	-	-	0 %
HSVS[VP4]	RRV	6 x 105 TU	i.m.	+/-	-	0 %
HSVS[VP7]	RRV	6 x 105 TU	i.m.	+/-	-	0 %
HSVS[VP6]	EC	2 dosis de 5 x 105 TU	s.c.	+	-	0 %
		2 dosis de 5 x 105 TU	i.m.	+	-	0 %
HSVD[VP6/2]	EC	2 dosis de 5 x 105 TU	i.m.	+	-	0 %
HSVT[VP6/2/NSP4]	EC	2 dosis de 5 x 105 TU	i.m.	+	-	0 %
HSVS[VP6]	RRV	2 dosis de 1 x 106 TU	i.n.	-	-	0 %
			i.m.	+	-	23,0 %
HSVS[VP7]	RRV	2 dosis de 1 x 106 TU	i.m.	-	-	8,5 %
HSVD[VP6/2]	RRV	2 dosis de 1 x 106 TU	i.m.	+	+	25,2 %
HSVT[VP7/6/2]	RRV	2 dosis de 5 x 105 TU	i.m.	+	+	18,7 %
		2 dosis de 1 x 106 TU	i.m.	+	+	36,0 %*†
HSVT[VP2/6/7]	Wa‡	2 dosis de 1 x 106 TU	i.m.	+	+	44,6 %*

Se resumen los resultados obtenidos con las distintas construcciones de vectores amplicón que codifican proteínas de rotavirus. Para cada vector se indica en las distintas columnas: la cepa de

rotavirus (RV) de la que se obtuvieron las secuencias codificantes (columna Cepa de RV), la dosis y el número de dosis (columna Dosis) y la vía de administración a los ratones (columna Vía), la detección de IgG anti RV por ELISA en el suero de los ratones inmunizados (columna IgG anti RV), la detección de IgA anti RV por Western blot en materia fecal de los ratones inmunizados (columna IgA anti RV) y el porcentaje de protección frente a un desafío con rotavirus murino (columna Protección). Las filas sombreadas indican los vectores amplicón para los cuales se muestran los resultados completos en esta tesis. *: $p<0,05$, †: resultado promedio de distintos experimentos, ‡: las secuencias codificantes de las proteínas fueron optimizadas, s.c.: subcutánea, i.m.: intramuscular, -: las muestras de ninguno de los ratones fueron positivas, +/-: las muestras de sólo algunos de los ratones fueron positivas, +: las muestras de todos los ratones fueron positivas.

Por razones de simplicidad y claridad, se presentarán en las siguientes secciones los resultados obtenidos con algunos de los vectores amplicón (Tabla 9) empleados en cuatro experimentos representativos que se realizaron durante la tesis.

Expresión de proteínas de rotavirus codificadas en vectores amplicón

La expresión de los genes que codifican las proteínas estructurales de rotavirus VP2, VP6 y VP7 se confirmó mediante el análisis por Western blot de lisados celulares cosechados luego de 24 horas de la transducción con los distintos vectores amplicón. En la Figura 37 se muestran los resultados obtenidos para los vectores empleados en los experimentos representativos (filas sombreadas de la Tabla 9). Puede observarse la detección de bandas correspondientes a las proteínas de rotavirus codificadas en cada vector simple, doble o triple. En general, los niveles de expresión disminuyen en las células infectadas con vectores dobles en comparación a los simples, pero este efecto es más notorio en los vectores triples. Como puede esperarse, este efecto se asocia con el orden de los genes en el cassette policistrónico (Figura 35) y con la disminución del número de copias del cassette incorporadas en el vector al aumentar la longitud del mismo. En consecuencia, también puede notarse en los niveles decrecientes de expresión de EGFP que llegan a ser indetectables en los vectores triples en los que este gen se encuentra luego del tercer gen heterólogo introducido.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

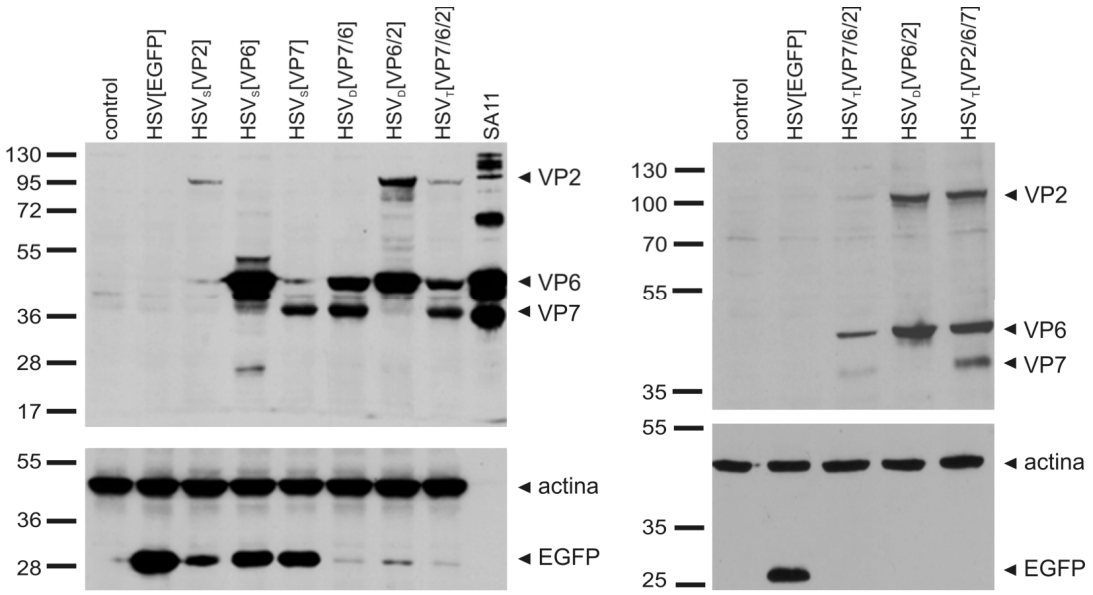


Figura 37. Expresión de genes de rotavirus en células transducidas con vectores amplicón.

Se infectaron células Vero 2-2 con los distintos vectores amplicón indicados en la parte superior de las membranas. Los lisados celulares de las células infectadas o no infectadas (control) se analizaron por Western blot empleando un suero policlonal anti rotavirus para detección de las proteínas VP2 (102,7 kDa), VP6 (44,8 kDa) y VP7 (37,4 kDa) (panel superior). Sobre las mismas membranas, se emplearon anticuerpos anti-EGFP (32,7 kDa) y anti-actina (42,0 kDa) (panel inferior) para la detección de EGFP y como control de siembra respectivamente. Como control positivo se emplearon partículas de rotavirus de la cepa SA11. A la izquierda de cada membrana se indican las posiciones de las bandas del marcador de peso molecular en kDa.

A continuación, se analizó por inmunofluorescencia la expresión y localización intracelular de las proteínas de rotavirus en las células infectadas por los vectores amplicón construidos (Figura 38). En las células infectadas con los vectores simples, las proteínas VP2 y VP7 se observaron como pequeños focos, lo que genera un patrón moteado, en algunos casos agregados alrededor del núcleo. Por otra parte, y tal como se describió previamente74, la proteína VP6 se observó formando estructuras similares a fibras en el citoplasma en las células infectadas con el vector simple HSVS[VP6]. Sin embargo, en las células infectadas con vectores dobles o triples que coexpresan VP6 (pHSVD[VP6/2], pHSVD[VP7/6], pHSVT[VP7/6/2], o pHSVT[VP2/6/7]), las proteínas de rotavirus se distribuyeron en un patrón moteado en todo el citoplasma y no se detectaron estructuras similares a fibras. Al igual que lo observado por Western blot, la intensidad de la fluorescencia de EGFP disminuyó al aumentar el número de genes en el policistrón.

Normalmente, en las células infectadas por rotavirus wild type, la glicoproteína VP7 se localiza en el retículo endoplasmático74. En este caso pudo demostrarse que la proteína VP7 también se localiza en el retículo endoplasmático cuando es expresada en células infectadas por los vectores amplicón que la codifican (Figura 38C).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

En conjunto, estos resultados demuestran que las tres proteínas de rotavirus VP2, VP6 y VP7 se expresan a partir de los distintos vectores amplicón, aunque la eficiencia de expresión está relacionada con su ubicación en el policistrón. Además, la localización intracelular de las tres proteínas codificadas por los vectores amplicón fue comparable a la descripta para las codificadas por los rotavirus wild type48, 133.

Ensamblado de VLPs en las células infectadas por vectores amplicón

Con el objetivo de evaluar la capacidad de los vectores amplicón para permitir el ensamblado de VLPs a partir de las proteínas estructurales de rotavirus que codifican, se realizó un análisis por microscopía electrónica y Western blot de VLPs concentradas y purificadas a partir de lisados celulares. Se pudieron observar partículas de rotavirus vacías en lisados de células Vero 2-2 infectadas con HSVD[VP6/2], HSVT[VP7/6/2] y HSVT[VP2/6/7] (Figura 39A-D, I-K). Su identidad se confirmó por marcación con un suero policlonal anti rotavirus y un anticuerpo secundario marcado con partículas de oro coloidal (Figura 39C y D). Para determinar si las VLPs también podrían ensamblarse en células humanas se infectaron células HeLa y HEK293 con HSVD[VP6/2] y HSVT[VP7/6/2] (Figura 39E-H y L). En ambos casos pudo detectarse la formación de VLPs. Sólo en el caso de infecciones con el vector triple HSVT[VP2/6/7] que codifica proteínas de rotavirus (con los codones optimizados para su expresión en células humanas), se pudieron detectar VLPs en secciones ultrafinas de estas células sin necesidad de su concentración y purificación como fue el caso del resto de los vectores (Figura 39I y J).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

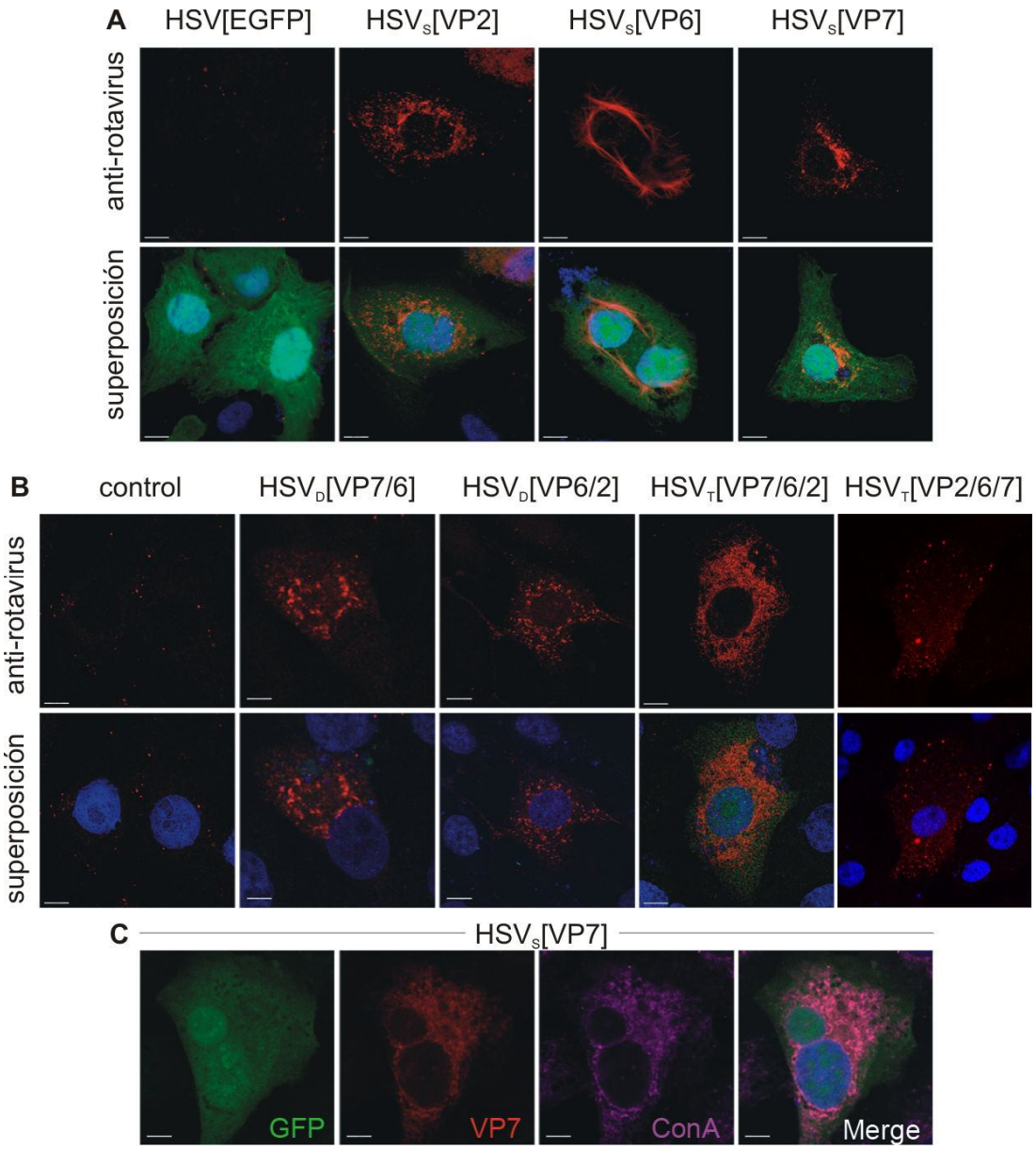


Figura 38. Distribución intracelular de las proteínas de rotavirus.

Se infectaron células Vero 2-2 con los distintos vectores amplicón indicados en la parte superior de las fotografías. Las células fijadas y permeabilizadas se marcaron con un suero policlonal anti rotavirus y se analizaron empleando un microscopio láser confocal. En los paneles superiores de A y B se muestran las proteínas de rotavirus identificadas en rojo y en los paneles inferiores la superposición con los núcleos marcados con DAP I (azul) y EGFP (verde). A. Células infectadas con vectores simples que expresan VP2, VP6 o VP7. B. Células infectadas con vectores dobles o triples que expresan distintas combinaciones de VP2, VP6 y VP7 o control (sin transfectar). C. Células infectadas con HSVS[VP7] en las que se observa la colocalización de VP7 (rojo) y ConcavalinaA conjugada (ConA, violeta). Merge: superposición. Barras= 5 µm.

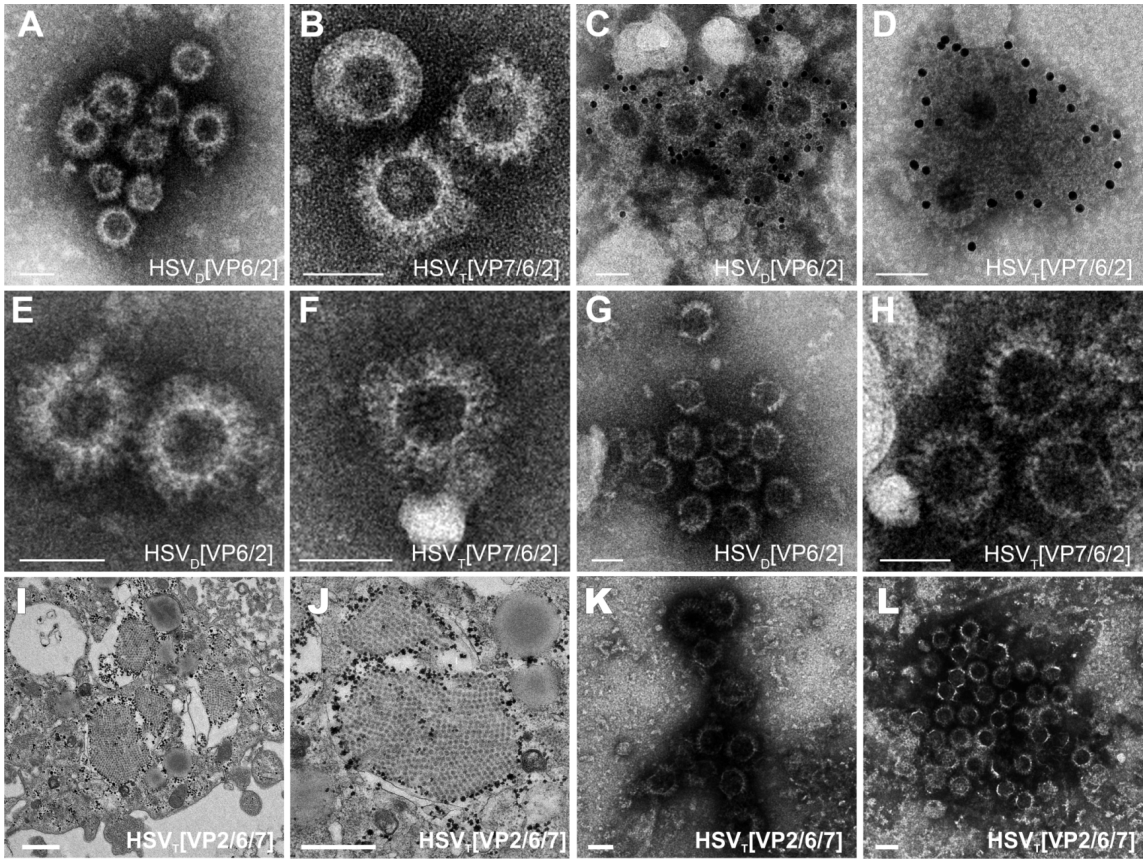


Figura 39. Micrografías electrónicas de VLPs producidas por vectores amplicón. Se muestran las VLPs de doble capa concentradas y purificadas a partir de lisados celulares: A-D, K. Vero 2-2, E-F. HeLa, G,H,L. HEK293, infectadas los vectores amplicón que se indica en cada micrografía. Las micrografías A,B, E-H, K-L corresponden a tinciones negativas. Las micrografías C, D corresponden a inmunomarcaciones con oro coloidal. Las micrografías I, J son secciones ultrafinas de células Vero 2-2 infectadas con HSVT[VP2/6/7].

Barras = 50 nm, excepto micrografías I, J: Barras = 1µm.

El análisis por Western blot permitió determinar la composición de las VLPs detectadas (Figura 40). En todos los casos, se detectaron las proteínas VP6 y VP2. Sin embargo, no se detectó la proteína VP7 en las VLPs ensambladas en células infectadas con los vectores triples HSVT[VP7/6/2] o HSVT[VP2/6/7]. Esto indicaría que la proteína VP7 no fue incorporada en las VLPs durante su ensamblado. En conjunto, estos resultados demuestran que la expresión de las proteínas estructurales de rotavirus codificadas en los vectores amplicón permite el ensamblado in situ de VLPs de capa doble que incluyen las proteínas VP6 y VP2.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

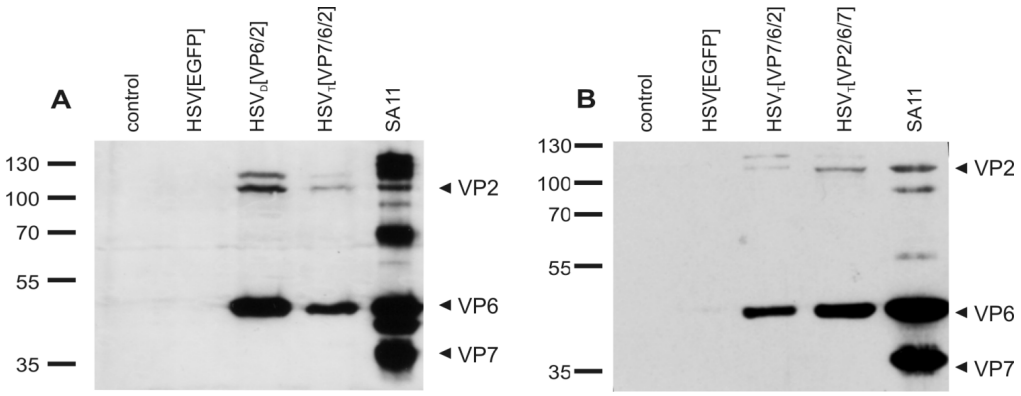


Figura 40. Proteínas de rotavirus presentes en las VLPs.

Las VLPs concentradas y purificadas a partir de lisados de células Vero 2-2 infectadas con los vectores amplicón que se indican en la parte superior de las membranas A y B se analizaron por Western blot empleando un suero policlonal anti rotavirus para la detección de las proteínas VP2 (102,7 kDa), VP6 (44,8 kDa) y VP7 (37,4 kDa). Como control positivo se emplearon partículas de rotavirus (cepa SA11) y como control negativo, lisados de células no infectadas (control). A la izquierda de cada membrana se indican las posiciones de las bandas del marcador de peso molecular en kDa.

Resultados del experimento 1

Se inmunizaron grupos de 4 ratones con 5x105 TU/dosis de HSVT[VP7/6/2] (ORFs de rotavirus cepa RRV), 5x105 TU/dosis de HSV[EGFP], o PBS de acuerdo a un cronograma de dos dosis (días 0 y 21) administradas por vía intramuscular. La presencia de anticuerpos anti rotavirus en las muestras de suero y materia fecal recolectadas durante el experimento se determinó por ELISA (Figura 41A) y Western blot (Figura 44). Los sueros y la materia fecal de los ratones pertenecientes a los grupos control inmunizados con PBS o el vector amplicón HSV[EGFP] que no contiene proteínas de rotavirus, resultaron negativos para IgG e IgA anti rotavirus por ambas técnicas. Por otro lado, los sueros de los ratones inmunizados con HSVT[VP7/6/2] presentaron niveles muy bajos de IgG anti rotavirus que sólo fueron detectables en las muestras obtenidas el día 42 (3 semanas después de la segunda dosis) y que apenas superaron el valor de corte del ELISA (DO490=0,15). No se detectó IgA anti rotavirus por ELISA en ninguna de las muestras. Al realizar la detección de los anticuerpos por Western blot, pudieron confirmarse los resultados obtenidos mediante ELISA en cuanto a la detección de IgG específica en suero. Los anticuerpos detectados en sueros de ratones inmunizados con HSVT[VP7/6/2] fueron principalmente específicos para VP6 y en uno de los ratones se detectó IgG específica para VP2. Por otro lado, en este mismo grupo de ratones pudo detectarse IgA específica para VP6 en las muestras de materia fecal recolectadas el día 42, aunque la señal fue débil.

Tres semanas luego de la segunda dosis, los ratones fueron desafiados con la cepa de rotavirus wild type murino ECwt. La recolección de muestras de materia fecal a lo largo de una semana para cada ratón en forma individual permitió determinar el AUC de excreción de rotavirus para cada grupo de ratones y el porcentaje de excreción con respecto al grupo de ratones control inoculado con PBS (Figura 42). Estos datos permitieron observar que si bien el grupo de ratones inmunizado con HSVT[VP7/6/2] excretó un 25,2 % menos de virus que el grupo de ratones control, la diferencia entre las áreas bajo la curva promedio no fue significativa ($p>0,05$). A pesar de haber detectado niveles muy bajos de anticuerpos anti rotavirus en el suero de los ratones inmunizados con HSVT[VP7/6/2] se decidió ensayar una dosis más elevada de este vector con el objetivo de verificar si se podría incrementar el porcentaje de protección parcial.

Resultados del experimento 2

Se inmunizaron grupos de 4 ratones con 1x106 TU/dosis de HSVT[VP7/6/2] (ORFs de rotavirus cepa RRV), 1x106 TU/dosis de HSVS[VP7] (ORF de rotavirus cepa RRV), 1x106 TU/dosis de HSV[EGFP], o PBS de acuerdo a un cronograma de dos dosis (días 0 y 21) administradas por vía intramuscular. En la Figura 41B se muestran los resultados obtenidos por ELISA para la detección de IgG anti rotavirus. Los sueros y la materia fecal de los ratones pertenecientes a los grupos control inmunizados con PBS o el vector amplicón HSV[EGFP], resultaron negativos para IgG e IgA anti rotavirus. Así también, los ratones inmunizados con el vector HSVS[VP7] no presentaron anticuerpos detectables anti rotavirus por ELISA ni por Western blot. En cuanto a los ratones que recibieron dos dosis de 1x106 TU de HSVT[VP7/6/2], los mismos desarrollaron niveles más elevados de IgG anti rotavirus al día 42 en comparación al grupo de ratones inoculados con dos dosis de 5x105 TU en el experimento 1. De acuerdo a los resultados obtenidos por Western blot (Figura 44), estos anticuerpos fueron específicos para VP6. En cuanto a la detección de IgA en materia fecal, a pesar de seguir siendo indetectable por ELISA, se detectaron mayores niveles por Western blot en comparación al experimento anterior. Mediante el análisis densitométrico de las bandas de IgA anti VP6 de dicho ensayo se puede estimar que la respuesta fue unas nueve veces mayor al administrar la dosis más elevada.

Los resultados correspondientes al desafío con rotavirus permitieron detectar un porcentaje de protección del 39,9 % en el grupo de ratones inmunizados con HSVT[VP7/6/2] en comparación al grupo control (Figura 42). Esta diferencia fue significativa ($p<0,05$) y podría estar asociada a una mayor inmunogenicidad lograda al incrementar la dosis del vector. Los niveles elevados de IgA específica anti VP6 en materia fecal son el principal correlato de protección en el modelo de ratón adulto de infección por rotavirus77, 150 y se ha sugerido que estos anticuerpos pueden neutralizar el virus intracelularmente51. En el caso de la administración intramuscular de un inmunógeno, se ha descripto que las células B presentadoras de antígeno pueden migrar desde la periferia hacia los tejidos linfoides asociados a mucosas46. Esto contribuiría a la generación de una respuesta de IgA en mucosas y explicaría su detección en la materia fecal a pesar de la administración intramuscular del antígeno. Aún cuando en este experimento se detectó IgA anti

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

rotavirus y la misma podría correlacionarse con la protección parcial observada, no puede descartarse la existencia de otros mecanismos inmunológicos que estén contribuyendo al resultado obtenido. En el modelo de ratón, a partir de experiencias con distintos tipos de inmunógenos (cepas atenuadas, inactivadas, vacunas a subunidad o DNA) y del análisis de las respuestas generadas a partir de la infección natural es posible afirmar que distintos efectores inmunes pueden ser los responsables de una respuesta protectora. Los mecanismos protectores también difieren dependiendo de la vía de inoculación, el tipo de adyuvante empleado e incluso el origen y la pureza de la preparación112, 190.

Debido a que los anticuerpos detectados en ratones inmunizados con HSVT[VP7/6/2] fueron mayormente anti VP6, se decidió ensayar en el siguiente experimento la administración del vector HSVS[VP6] que sólo codifica esta proteína de rotavirus. Los resultados obtenidos permitirían determinar si la respuesta inmune contra esta proteína es suficiente para inducir, al menos, una protección parcial.

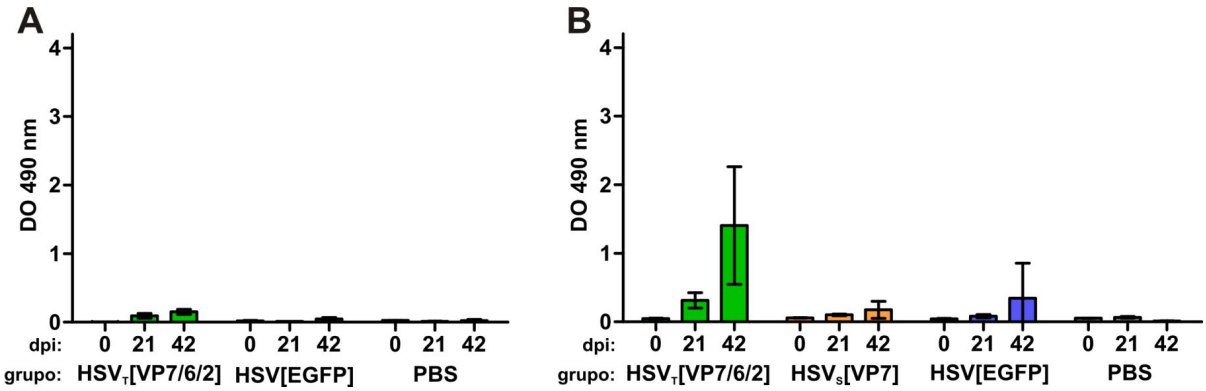


Figura 41. IgG anti rotavirus en ratones inmunizados en los experimentos 1 y 2. Los gráficos muestran los niveles de IgG específica anti rotavirus determinados por ELISA en diluciones 1/100 de los sueros de los ratones inmunizados con vectores amplicón. En el eje horizontal se indican los días post inmunización (dpi) y debajo el vector amplicón administrado a cada grupo de ratones. Las barras representan la DO490 promedio para cada grupo y las barras de error representan la desviación estándar. A. Experimento 1, B. Experimento 2.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

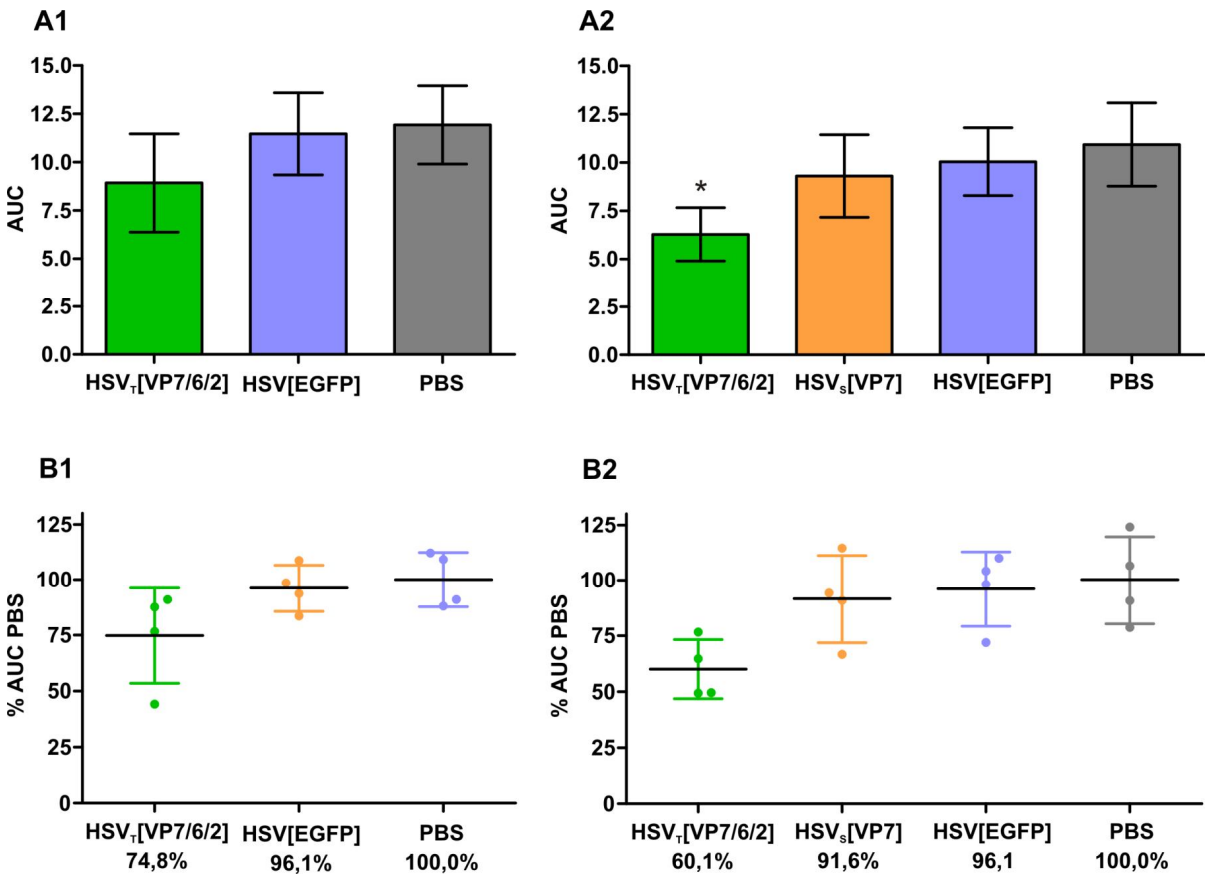


Figura 42. Protección frente al desafío en ratones inmunizados en los experimentos 1 y 2. A. Área bajo la curva de excreción promedio para cada grupo de ratones. B. Porcentaje del área bajo la curva promedio del grupo control (PBS) para cada grupo de ratones, el valor promedio se indica bajo el nombre del grupo en el eje horizontal. En todos los casos las barras de error representan la desviación estándar. A1 y B1. Experimento 1. A2 y B2. Experimento 2. *: $p<0,05$.

Adicionalmente, se decidió ensayar en otro grupo de ratones la administración del mismo vector HSVT[VP7/6/2] luego de su inactivación con BEI. En base a resultados previos con vectores amplicón que expresan proteínas heterólogas de otros virus56, 203 y resultados obtenidos con el vector HSVT[VP7/6/2] (no se muestran), pudo detectarse la presencia de las proteínas heterólogas en las preparaciones de stocks de vectores amplicón. Es por ello que la inoculación de ratones con preparaciones inactivadas de estos vectores permite determinar si la respuesta inmune inducida se debe a la expresión in vivo de las proteínas codificadas o a la presencia de estas proteínas luego de su expresión in vitro y su incorporación a las partículas del vector durante el ensamblado en la línea celular Vero 2-2.

Resultados del experimento 3

Se inmunizaron grupos de 4 ratones con 1x106 TU/dosis de HSVT[VP7/6/2] (ORFs de rotavirus, cepa RRV), 1x106 TU/dosis de iHSVT[VP7/6/2] (ORFs de rotavirus, cepa RRV) inactivado con BEI, 1x106 TU/dosis de HSVS[VP6] (ORF de rotavirus, cepa RRV), 1x106 TU/dosis de HSV[EGFP], o PBS de acuerdo a un cronograma de dos dosis (días 0 y 21) administradas por vía intramuscular. En la Figura 43 se muestran los resultados obtenidos por ELISA para la detección de IgG anti rotavirus. Los sueros y la materia fecal de los ratones pertenecientes a los grupos control inmunizados con PBS o el vector amplicón HSV[EGFP], resultaron negativos para IgG e IgA anti rotavirus. Así también, los ratones inmunizados con el vector inactivado iHSVT[VP7/6/2] no presentaron anticuerpos detectables anti rotavirus por ELISA ni por Western blot (Figura 44). Estos resultados indican que los anticuerpos anti rotavirus detectados en los ratones inmunizados con HSVT[VP7/6/2] son inducidos a partir de la expresión in situ de estas proteínas y no como un resultado de la presencia de las mismas en los stocks de vector amplicón generadas durante su producción en cultivo celular.

Como se observa en la figura, los niveles de IgG anti VP6 en el suero de los ratones inmunizados con HSVS[VP6] fueron mucho mayores que los determinados en los ratones inmunizados con HSVT[VP7/6/2]. Esto es consistente con el mayor nivel de expresión de VP6 esperado para el primer vector considerando los resultados anteriores (Figura 37). Como se mencionó anteriormente, la expresión de los genes incluidos en los vectores amplicón disminuye al aumentar el número de genes en el policistrón y el tamaño general del cassette transgénico debido a que se incorporan menos copias de cada uno durante el empaquetamiento del virus. Sin embargo la mayor respuesta de IgG en suero no se vió reflejada al medir IgA anti VP6 en la materia fecal ya que no se detectó su presencia por ELISA ni por Western blot (Figura 44).

Los resultados correspondientes al desafío con rotavirus permitieron observar que el único grupo de ratones que presentó protección parcial (46,9 %, $p<0,05$) fue el inmunizado con HSVT[VP7/6/2] (Figura 45). Ni el vector simple HSVS[VP6], ni el vector inactivado iHSVT[VP7/6/2] mostraron una disminución significativa de la excreción de virus con respecto a los ratones inmunizados con PBS. Nuevamente pudo detectarse una correlación entre la protección parcial y la detección de IgA anti rotavirus por Western blot, ya que la misma sólo se detectó en los ratones que resultaron parcialmente protegidos frente al desafío.

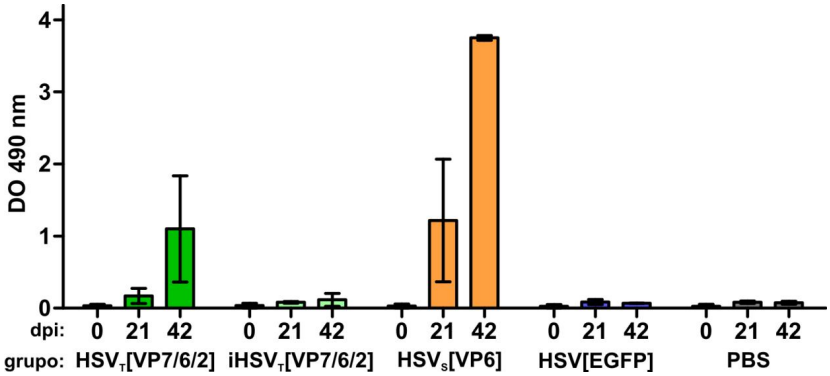


Figura 43. IgG anti rotavirus en ratones inmunizados en el experimento 3.

Los gráficos muestran los niveles de IgG específica anti rotavirus determinados por ELISA en diluciones 1/100 de los sueros de los ratones inmunizados con los vectores amplicón. En el eje horizontal se indican los días post inmunización (dpi) y debajo el vector amplicón administrado a cada grupo de ratones. Las barras representan la DO490 promedio para cada grupo y las barras de error representan la desviación estándar.

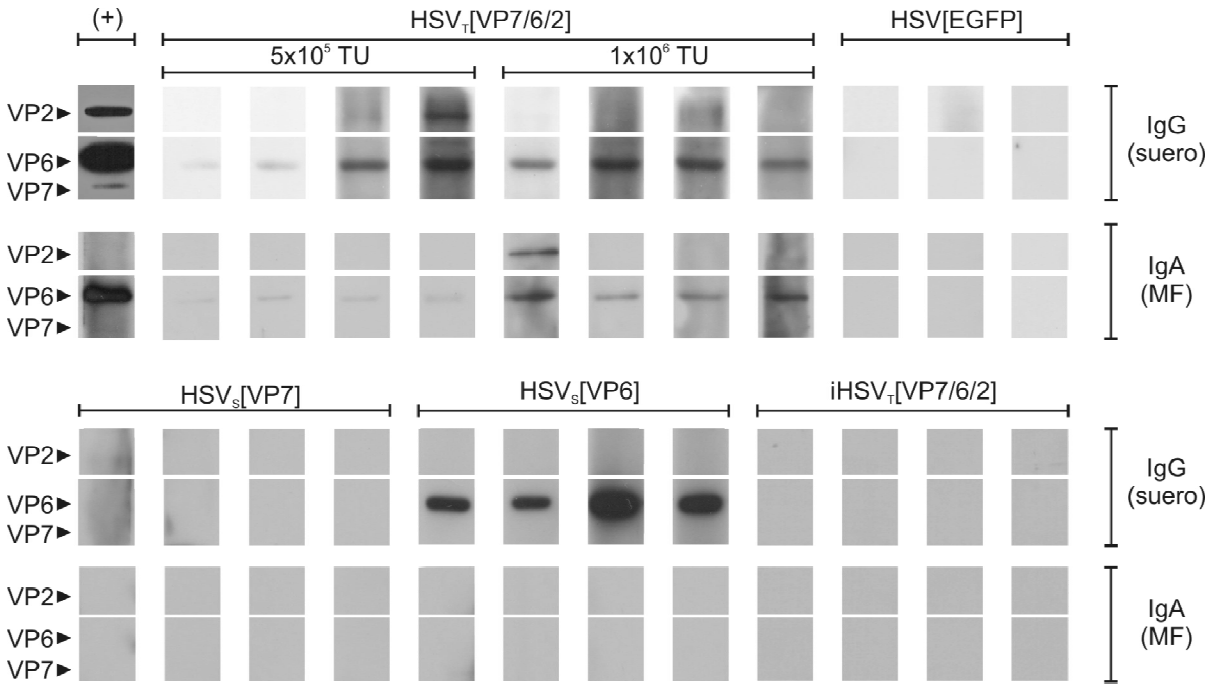


Figura 44. Western blot de las muestras obtenidas en los experimentos 1, 2 y 3.

Las proteínas de rotavirus (cepa RRV) se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas a partir de las que se obtuvieron calles individuales. Éstas se emplearon para analizar las muestras obtenidas de ratones inmunizados con los distintos vectores amplicón que se indican en la parte superior de cada panel. En el caso de HSVT[VP7/6/2] se indica además la dosis ensayada. Cada calle fue incubada con muestras de suero 1/100 o materia fecal (MF) 1/5 para determinación de IgG o IgA anti rotavirus, respectivamente como se indica a la derecha de cada panel. (+): Se empleó suero policlonal anti RRV y materia fecal de ratones infectados con ECwt como controles positivos de IgG e IgA anti rotavirus, respectivamente.

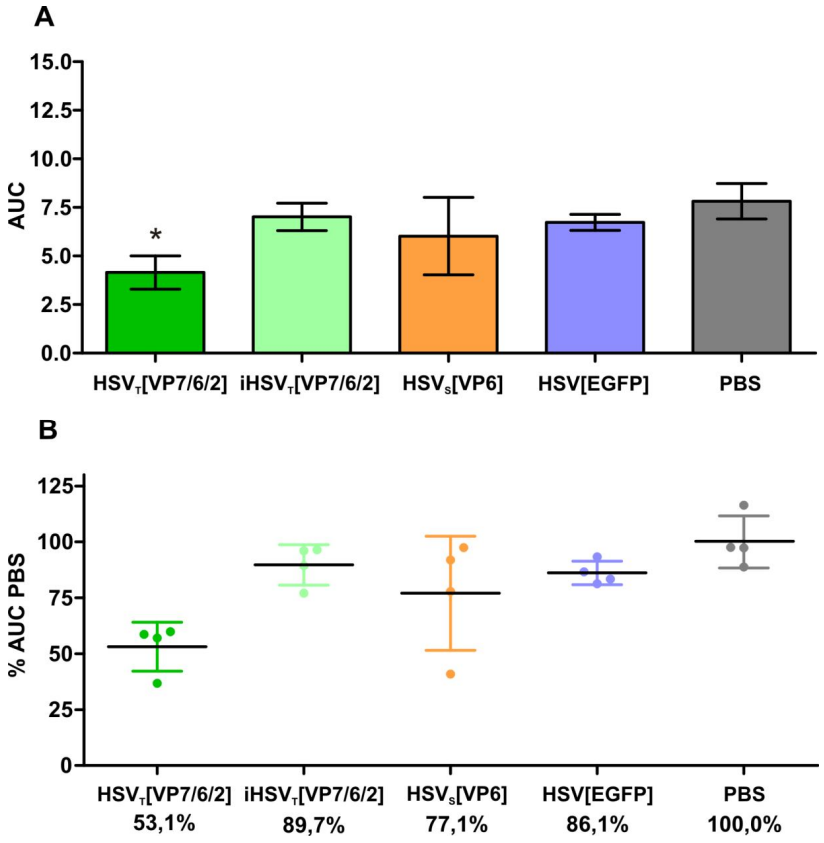


Figura 45. Protección frente al desafío en ratones inmunizados en el experimento 3. A. Área bajo la curva de excreción promedio para cada grupo de ratones. B. Porcentaje del área bajo la curva promedio del grupo control (PBS) para cada grupo de ratones, el valor promedio se indica bajo el nombre del grupo en el eje horizontal. En todos los casos las barras de error representan la desviación estándar. *: $p<0,05$.

Los resultados obtenidos hasta este punto indicarían que es necesaria la coexpresión de más de una proteína de rotavirus (adicionalmente a VP6) y, presumiblemente, la formación de VLPs para obtener una protección parcial. Por este motivo, se incluyó en el siguiente experimento un grupo de ratones inmunizados con el vector amplicón HSVD[VP6/2] que coexpresa VP6 y VP2. Como se indicó previamente, este vector, así como HSVT[VP7/6/2], son capaces de inducir la formación de VLPs de rotavirus por transducción de células de mamífero.

Adicionalmente, se incorporó un nuevo vector al siguiente experimento, basado en las secuencias optimizadas de las proteínas VP2, VP6 y VP7 de la cepa Wa de rotavirus (HSVT[VP2/6/7]). En los resultados presentados antes en cuanto a la expresión de proteínas de rotavirus en células transducidas con estos vectores, pudo observarse que los niveles de expresión fueron mayores y se detectaron VLPs en cortes ultrafinos de las células (Figura 39 I, J). Por estos motivos se decidió evaluar si era capaz de inducir una respuesta protectora mayor a la obtenida en ratones inmunizados con HSVT[VP7/6/2], basado en las secuencias no optimizadas de la cepa RRV de rotavirus.

Resultados del experimento 4

Se inmunizaron grupos de 5 ratones con 1x106 TU/dosis de HSVT[VP7/6/2] (ORFs de rotavirus, cepa RRV), 1x106 TU/dosis de HSVD[VP6/2] (ORFs de rotavirus, cepa RRV), 1x106 TU/dosis de HSVT[VP2/6/7] (ORFs optimizados de rotavirus, cepa Wa), 1x106 TU/dosis de HSV[EGFP], 20 µg de iWa o PBS de acuerdo a un cronograma de dos dosis (días 0 y 21) administradas por vía intramuscular. En la Figura 46 se muestran los resultados obtenidos por ELISA para la detección de IgG anti rotavirus. Los sueros y la materia fecal de los ratones pertenecientes a los grupos control inmunizados con PBS o el vector amplicón HSV[EGFP], resultaron negativos para IgG e IgA anti rotavirus.

Al igual que lo observado en el experimento anterior, los mayores niveles de IgG anti rotavirus en suero se obtuvieron por inmunización con el vector amplicón simple HSVS[VP6] (DO490=3,75) que incluye 20 copias del plásmido amplicón. El número estimado de copias se calculó dividiendo el tamaño del genoma de HSV-1 (150 kpb) por el tamaño del plásmido amplicón. El vector amplicón doble HSVD[VP6/2] (14 copias) evaluado en este experimento indujo niveles menores (DO490=2,63) de IgG anti rotavirus (mayoritariamente anti VP6), pero aún mayores que los inducidos por el vector amplicón triple HSVT[VP7/6/2] (DO490=1,64) que incluye 12 copias. Los anticuerpos específicos alcanzaron niveles mayores cuando se inmunizó con el vector triple HSVT[VP2/6/7] (DO490=2,39), a pesar de que también contiene 12 copias del plásmido amplicón. Esto se corresponde con los mayores niveles de expresión observados in vitro para este vector, probablemente debido a la optimización de codones de las secuencias.

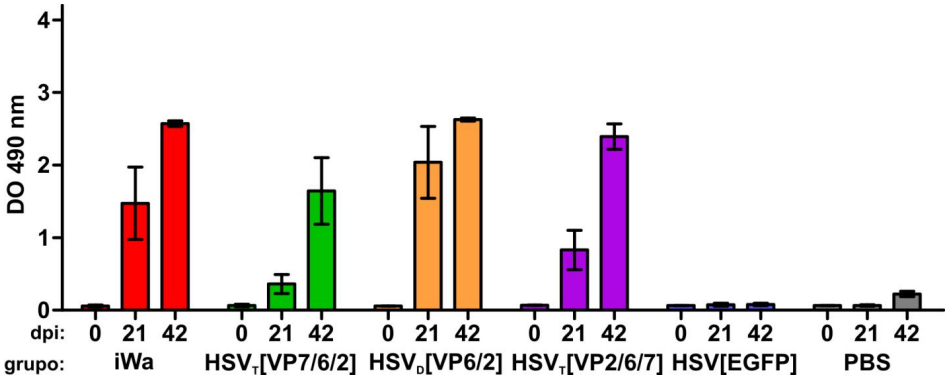


Figura 46. IgG anti rotavirus en ratones inmunizados en el experimento 4.

Los gráficos muestran los niveles de IgG específica anti rotavirus determinados por ELISA en diluciones 1/100 de los sueros de los ratones inmunizados con los vectores amplicón. En el eje horizontal se indican los días post inmunización (dpi) y debajo el vector amplicón administrado a cada grupo de ratones. Las barras representan la DO490 promedio para cada grupo y las barras de error representan la desviación estándar.

Con el objetivo de confirmar estos resultados de manera más confiable, se llevó a cabo la titulación de los anticuerpos por ELISA (Tabla 10). Los títulos alcanzados por el vector simple casi duplicaron los obtenidos con el vector doble y fueron ocho veces mayores que los obtenidos con los vectores triples. También pudo verificarse que el vector HSVT[VP2/6/7] indujo títulos más altos que el otro vector triple HSVT[VP7/6/2].

Tabla 10. Títulos de IgG anti rotavirus determinados por ELISA en los sueros obtenidos al día 42 de los ratones inmunizados con los distintos vectores amplicón.

Vector amplicón	Experimento	Título	Rango
HSVS[VP6]	3	76.800	51.200 – 102.400
HSVD[VP6/2]	4	41.600	12.800 – 102.400
HSVT[VP7/6/2]	2	9.600	3.200 – 12.800
	3	9.600	6.400 – 12.800
	4	8.320	3.200 – 12.800
HSVT[VP2/6/7]	4	11.200	6.400 – 12.800

En la Figura 47 se presentan los resultados obtenidos por medio del análisis por Western blot de las muestras obtenidas durante este experimento. Los sueros de los ratones inmunizados con rotavirus iWa presentaron IgG anti VP6 y anti VP2 pero fueron negativos para IgA anti rotavirus. En el grupo de los ratones inmunizados con el vector HSVT[VP7/6/2], se reprodujeron los resultados de experimentos anteriores. En los sueros de los ratones inmunizados con HSVD[VP6/2] se detectó IgG e IgA anti VP6 en el suero y en la materia fecal, respectivamente. En particular para los grupos de ratones iWa y HSVD[VP6/2] las muestras de suero debieron ser diluídas 1/200 para obtener bandas discretas al revelar las membranas de Western blot, debido a los niveles elevados de anticuerpos específicos presentes. Los sueros de los ratones inmunizados con HSVT[VP2/6/7] presentaron IgG anti VP6 y anti VP2 en dos de los cinco ratones, mientras que los anticuerpos de tipo IgA detectados estuvieron dirigidos sólo contra VP6. En resumen, los tres grupos cuyas muestras de materiafecal fueron positivas para IgA anti rotavirus fueron HSVD[VP6/2], HSVT[VP7/6/2] y HSVT[VP2/6/7].

Los resultados correspondientes al desafío con rotavirus se presentan en la Figura 48 y permitieron observar que los únicos dos grupos protegidos parcialmente fueron los correspondientes a los ratones inmunizados con iWa y con el vector amplicón HSVT[VP2/6/7] (56,3 %, $p<0,01$ y 44,6 %, $p<0,05$, respectivamente). En este experimento, la respuesta protectora inducida por los vectores amplicón HSVT[VP7/6/2] (21,3 %) y HSVD[VP6/2] (18,9 %) no fue significativa al comparar las áreas bajo la curva de excreción con las del grupo de ratones control inoculados con PBS. Sin embargo, la diferencia sí es significativa para ambos vectores ($p<0,05$) al realizar la comparación de las áreas bajo la curva con las del grupo de ratones control inoculados con el vector amplicón HSV[EGFP]. En este experimento la protección parcial inducida por

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

HSVT[VP7/6/2] no alcanzó los porcentajes obtenidos en experimentos previos probablemente debido a que en cada experimento se emplearon diferentes stocks del vector, los cuales procedían de eventos de producción independientes.

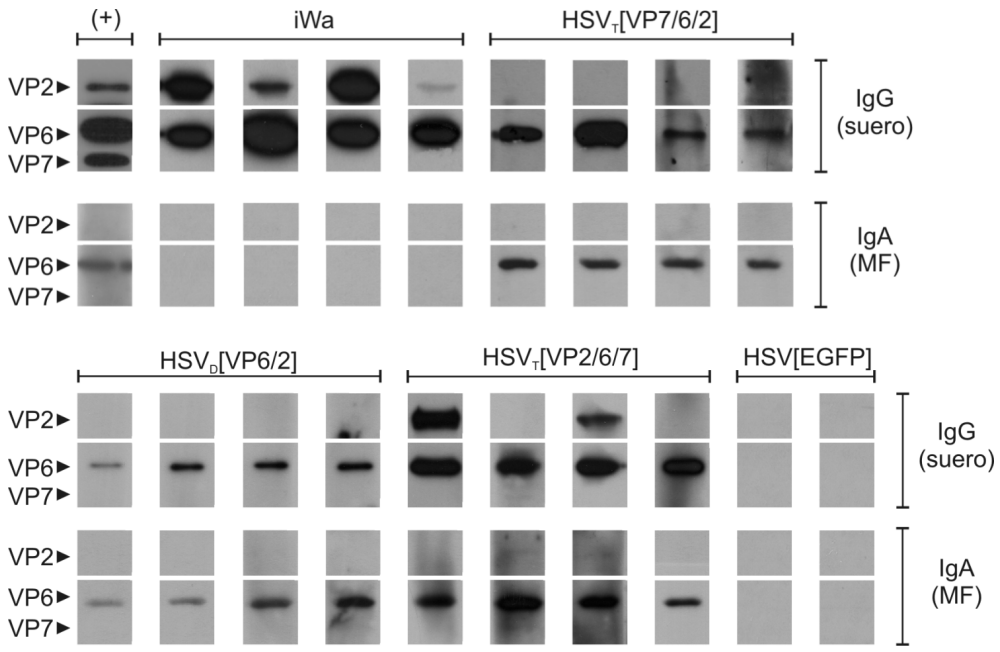


Figura 47. Análisis por Western blot de las muestras obtenidas en el experimento 4. Las proteínas de rotavirus cepa RRV se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas a partir de las que se obtuvieron calles individuales. Éstas se emplearon para analizar las muestras obtenidas de ratones inmunizados los distintos vectores amplicón que se indican en la parte superior de cada panel. Cada calle fue incubada con muestras de suero 1/100 (1/200 para los grupos iWa y HSVD[VP6/2]) o materia fecal (MF) 1/5 para la determinación de IgG o IgA anti rotavirus, respectivamente, como se indica a la derecha de cada panel. (+): Se empleó suero policlonal anti RRV y la materia fecal de ratones infectados con EC wt como controles positivos de IgG e IgA anti rotavirus, respectivamente.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

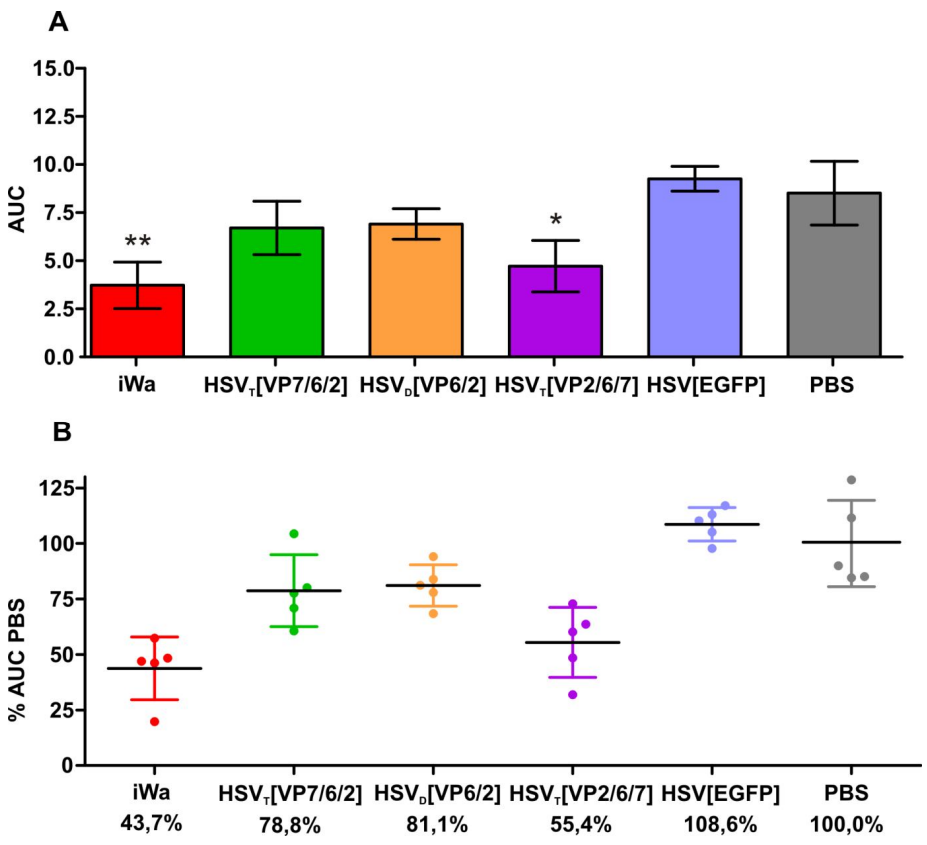


Figura 48. Protección frente al desafío en ratones inmunizados en el experimento 4. A. Área bajo la curva de excreción promedio para cada grupo de ratones. B. Porcentaje del área bajo la curva promedio del grupo PBS para cada grupo de ratones, el valor promedio se indica bajo el nombre del grupo en el eje horizontal. En todos los casos las barras de error representan la desviación estándar. *: p<0,05, **: p<0,01.

La plataforma de producción de vectores amplicón basados en HSV-1, inicialmente desarrollada para terapia génica, presenta una serie de características que la hacen atractiva como para la generación de vectores destinados a la inmunización73, 170. Los vectores amplicón tienen una gran capacidad transgénica de aproximadamente 150 kpb, lo que permite el delivery de genes de gran tamaño o incluso de múltiples genes, lo que permitiría la expresión de antígenos múltiples56, 216, 228. Adicionalmente, debido a que estos vectores no requieren del empleo de un virus helper durante su producción, carecen de la capacidad de replicación y no expresan genes inmunosupresores (como ICP27) se presentan como seguros.

En base a los resultados obtenidos en esta tesis, se ha demostrado la expresión eficiente de hasta cuatro transgenes diferentes a partir de un mismo vector amplicón policistrónico. Asimismo, los vectores amplicón que codifican las proteínas estructurales de rotavirus VP6 y VP2, permitieron la formación de VLPs en las células infectadas con estos vectores y, al inyectarlos a ratones, indujeron una respuesta inmune específica anti rotavirus así como una respuesta protectora frente a un desafío con rotavirus wild type. A pesar de que otros vectores virales se

han empleado anteriormente para coexpresar las proteínas de rotavirus VP6 y VP2, no se ha investigado su potencial como vacunas96, 164.

El uso de un sistema de delivery, como lo son los vectores amplicón, que permita la producción de VLPs heterólogas, provee la ventaja adicional de no requerir los pasos de purificación de las VLPs producidas. También es importante remarcar que, a diferencia de la inoculación con las VLPs purificadas, el delivery de los genes que codifican sus componentes resulta en la producción intracelular de los antígenos en las células del hospedador. Esta situación se asemeja al evento en el que las células sostienen la replicación del patógeno y, razonablemente, deben ser más eficientes induciendo distintos tipos de respuestas inmunes celulares. A pesar de que los vectores amplicón no expresan ningún gen de HSV-1, pueden estimular el sistema inmune al proveer funciones adyuvantes a través de las proteínas estructurales de HSV-1 que forman la partícula del vector32.

La administración intramuscular en ratones de dos dosis de 1x106 TU de vectores amplicón que codifican la proteína VP6 o la proteína VP6 en conjunto con VP2 y VP7, indujo una respuesta inmune específica. Esta respuesta se detectó como IgG sistémica e IgA en materia fecal. En ninguno de los experimentos realizados se encontraron anticuerpos anti rotavirus de tipo IgA en muestras de suero o de tipo IgG en muestras de materia fecal. Los anticuerpos específicos de tipo IgA en la materia fecal sólo pudieron detectarse por Western blot empleando un sustrato quimioluminiscente para su revelado, una técnica mucho más sensible que el ELISA colorimétrico. Los anticuerpos estuvieron dirigidos principalmente contra VP6 y en algunos ratones también se detectaron anticuerpos anti VP2. En ningún caso se detectó anticuerpos anti VP7. Estos resultados podrían estar relacionados con el hecho de que los vectores que codifican VP6, VP2 y VP7 permitieron la formación de VLPs compuestas exclusivamente por VP6 y VP2. Adicionalmente, el vector simple que sólo expresa la proteína VP7 no resultó inmunogénico. Debido a que los únicos vectores que fueron capaces de inducir una respuesta protectora luego de su administración in vivo fueron aquellos que demostraron producir VLPs de rotavirus in vitro, podría afirmarse que este es un requisito necesario para la generación de este tipo de respuesta.

En base a la hipótesis recién expuesta, se estudió el tejido muscular de los ratones inmunizados por microscopía electrónica y Western blot, pero no pudieron detectarse VLPs ni antígenos de rotavirus (los resultados no se muestran). Sin embargo, tampoco pudieron detectarse partículas virales 24 horas después de la inoculación de hasta 109 partículas inactivadas de rotavirus. Esto sugeriría que las partículas podrían ser degradadas rápidamente o ser transportadas desde el músculo hasta los ganglios linfáticos regionales203, 204. Los vectores amplicón son capaces de infectar eficientemente células presentadoras de antígeno, incluyendo células dendríticas204 que podrían migrar desde el tejido muscular y dificultarían la detección de los antígenos expresados in situ. Por otro lado, los vectores amplicón no infectan células musculares de ratón eficientemente230. Esta ineficiencia se ha atribuído a la lámina basal ya que se cree que actúa como una barrera física para virus grandes, tales como HSV-1 y adenovirus, impidiendo el

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

contacto con la membrana celular107. La elección de la vía intramuscular para la inoculación de los ratones se basó en estudios previos que demostraron que esta vía permitió obtener los niveles más altos de anticuerpos específicos.

A pesar de que no se detectaron VLPs in vivo, los resultados sugieren fuertemente que las respuestas inmune y protectora obtenidas se deben a la síntesis de novo de múltiples transgenes de rotavirus en una misma célula, una situación que, al menos en cultivo celular, condujo al ensamblado de VLPs de rotavirus. En otros estudios en los que se han ensayado como inmunógenos partículas de rotavirus inactivadas, VLPs o DNA que codifica para VP617, 151, 239, la vía parenteral de inmunización resultó eficiente para inducir protección parcial contra rotavirus. Es importante destacar que en algunos de estos casos fue necesaria la coadministración de adyuvantes mientras que en el presente caso, los vectores amplicón fueron administrados sin aditivos.

Conclusiones

Muchos estudios han destacado el potencial de los vectores basados en HSV-1 que codifican genes heterólogos como inmunógenos potenciales. A pesar de que estos vectores tienen mucho en común con otros vectores virales en desarrollo, también presentan características únicas que los vuelven candidatos atractivos como vacunas. Al igual que los sistemas basados en adenovirus, son capaces de expresar cantidades importantes de los transgenes que codifican. Sin embargo, a diferencia de muchos vectores virales (incluyendo los vectores basados en HSV-1 recombinantes), los vectores basados en HSV-1 de tipo amplicón en particular, no codifican ninguna proteína viral. Esta característica es particularmente importante para la expresión de proteínas moderadamente inmunogénicas. Adicionalmente, los stocks de vectores amplicón del tipo utilizado en este trabajo no se encuentran contaminados con virus helper, lo cual es beneficioso en términos de seguridad. Finalmente, la característica más importante de estos vectores es su gran capacidad para incorporar hasta 150 kpb de plásmido amplicón. Como resultado, puede ser empleado para el delivery de múltiples genes.

En esta tercera parte de la tesis, se evaluó la inmunogenicidad y la capacidad protectora inducida por la administración de vectores amplicón que codifican una o más proteínas estructurales de rotavirus. La expresión de los genes incorporados en cada vector, se confirmó por transducción de líneas celulares y análisis por Western blot; y su localización intracelular, por inmunofluorescencia. Lo que es más importante, pudo demostrarse que estos vectores permitieron el ensamblado de VLPs de rotavirus en cultivo celular.

La inmunización de ratones con estos vectores no sólo permitió inducir una respuesta inmune humoral sistémica y de mucosas, sino también protección parcial frente al desafío con una cepa de rotavirus wild type. Los vectores responsables de esta inmunidad protectora fueron aquellos para los que se observó formación de VLPs en cultivo celular y que lograron inducir anticuerpos de tipo IgA específicos para la proteína VP6 en la mucosa intestinal.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Estos resultados son alentadores para el desarrollo de prototipos de vacunas empleando esta plataforma de producción de vectores virales que expresen genes de rotavirus o de otros patógenos. Adicionalmente estos vectores ya han sido empleados como herramientas en estudios de las funciones e interacciones entre proteínas de rotavirus69.

* Los resultados correspondientes a la construcción y producción de los vectores amplicón basados en HSV-1 y los análisis de expresión por Western blot, inmunofluorescencia y microscopía electrónica fueron realizados por la Dra. Andrea Laimbacher (Institute of Virology, University of Zurich, Suiza) como parte de la colaboración con el Laboratorio de Inmunología y Virología, Universidad Nacional de Quilmes en el marco del proyecto HEVAR (HErpes based Vaccines Against Rotavirus) financiado por la Comunidad Europea.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

PARTE IV

EVALUACIÓ DE LA RESPUESTA I MU E Y DE LA PROTECCIÓ I DUCIDA POR LACTOCOCCUS LACTIS QUE EXPRESA PROTEÍ AS DE ROTAVIRUS

Introducción

Bacterias del ácido láctico

Las bacterias del ácido láctico (BAL) comprenden un grupo heterogéneo de bacterias que incluyen especies de Lactococcus, Streptococcus, Pediococcus, Leuconostoc y Lactobacillus. Aunque diverso, los integrantes de este grupo comparten características comunes: a) son Gram-positivos, b) anaerobios facultativos, c) no son productores de catalasa, d) son inmóviles y principalmente e) convierten azúcares en ácido láctico. Estas bacterias ocupan un rango amplio de nichos que incluyen la leche, la superficie de plantas y superficies mucosas de vertebrados88.

Las BAL tienen una larga historia en la elaboración de productos fermentados y como biopreservantes de alimentos. Por lo tanto, se las denomina organismos seguros o GRAS (Generally Recognized as Safe) de acuerdo a la Agencia de Drogas y Alimentos (FDA) de Estados Unidos. Asimismo cumplen los criterios de QPS (Qualified Presumption of Safety) de la Autoridad Europea de Seguridad de Alimentos (EFSA). Algunas cepas de BAL tienen un rol importante en el mantenimiento de la homeostasis intestinal y ofrecen efectos beneficiosos por los que son consumidas como probióticos. Estas características, sumadas a la capacidad de las BAL de sobrevivir durante el pasaje a lo largo del tracto gastrointestinal, hacen de estas bacterias excelentes candidatos para el delivery de moléculas terapéuticas a mucosas88.

El interés en el uso de BAL como vehículos de delivery se enfocó inicialmente en el desarrollo de vacunas de mucosas. Esta aplicación deriva de una serie de investigaciones que han demostrado que es necesario un sistema de delivery que evite la degradación y promueva la captación del antígeno en el tracto gastrointestinal, a la vez que estimule respuestas adaptativas en lugar de inducir tolerancia, como sucede cuando se administran antígenos solubles por vía oral120, 163. Una de las principales ventajas de las BAL como vehículos vacunales es su potencial para inducir la producción de IgA secretoria antígeno-específica. Actualmente se acepta que las vacunas de mucosas capaces de inducir la producción tanto de IgA secretoria como respuestas inmunes sistémicas efectivas podrían tener ventajas sobre muchas vacunas existentes. Algunas vacunas basadas en BAL han inducido la producción de IgA antígeno-específica en materia fecal, saliva, lavados broncoalveolares y lavados intestinales, así como células secretoras de IgA antígeno-específicas en los pulmones y los ganglios linfáticos mesentéricos234.

Interacciones hospedador-BAL en las superficies mucosas

Siempre que sobrevivan al tránsito a través del estómago, la mayoría de las bacterias que se introducen en el tracto intestinal terminan en el lúmen o atrapadas en la capa de mucus secretada

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

por las células caliciformes del epitelio del intestino delgado y grueso. Así, las proteínas provenientes de bacterias lisadas o secretadas por bacterias vivas pueden entrar en contacto con el epitelio de la mucosa. Los anticuerpos IgA poliméricos (pIgA) secretados por las células plasmáticas maduras de la lámina propia alcanzan el lumen intestinal mediante el mecanismo de transcitosis llevado a cabo por los enterocitos por medio del receptor de pIgA y podrían ser un factor controlador de la persistencia de las bacterias y su captación.

Las bacterias que entran en contacto con la superficie apical del epitelio podrían ser muestreadas por células dendríticas cuyas protrusiones, ubicadas entre los enterocitos, alcanzan el lumen intestinal. Estos eventos aumentan durante la inflamación, debido al reclutamiento quimiotáctico de las células dendríticas y podrían ocurrir también en los folículos linfoides aislados en el epitelio del colon137, 234.

Sin embargo, el principal punto de entrada de las bacterias u otros antígenos particulados son generalmente las células M localizadas en las placas de Peyer y, posiblemente, en los folículos linfoides aislados más pequeños. Sin embargo, aún es controversial el requisito de las placas de Peyer para la inducción de la inmunidad y la tolerancia oral. Las células dendríticas de las placas de Peyer pueden fagocitar bacterias y trasladarse a los ganglios linfáticos mesentéricos donde pueden iniciar una respuesta de células T contra antígenos derivados de las bacterias (Figura 49)137, 234.

Producción de proteínas heterólogas en Lactococcus lactis

Lactococcus lactis es una bacteria no invasiva, heterofermentativa y mesófila (su temperatura óptima de crecimiento es alrededor de los 30 °C) y es el miembro mejor caracterizado de las BAL, considerado el organismo modelo de este grupo. Esto se debe no sólo a su importancia económica, sino también a las siguientes características: a) su genoma se encuentra secuenciado completamente, b) es fácil de manipular genéticamente y c) ya se han desarrollado numerosas herramientas genéticas para esta especie60, 183. A diferencia de otras BAL, L. lactis no coloniza el tracto digestivo. En ratones, el tiempo de persistencia es menor a las 24 horas y, en humanos, L. lactis atraviesa el tracto gastrointestinal dentro de los tres días de su ingestión155. Existen muy pocas proteínas secretadas naturalmente por L. lactis y las cepas libres de plásmido no producen la proteasa extracitoplasmática PrtP. Estas son características que facilitan la expresión, purificación y análisis de diversas proteínas de interés biotecnológico158.

Si bien se han desarrollado numerosos sistemas de expresión para L. lactis, el más utilizado es el de la expresión controlada por nisina o .isin Controlled Expression (NICE), que se basa en la combinación del promotor PnisA y los genes reguladores nisR y nisK (involucrados en la biosíntesis y la expresión de nisina) (Figura 50). La nisina es un péptido de 34 aminoácidos que posee actividad antimicrobiana y es ampliamente utilizado en la industria alimentaria como conservante natural de alimentos. Para explotar el mecanismo de autoinducción de la nisina para la expresión

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

de genes heterólogos se aislaron las secuencias de los genes involucrados nisK y nisR y se insertaron en el cromosoma de L. lactis cremoris MG1363 (nisina negativa), creando la cepa NZ9000128. Cuando se inserta un gen de interés detrás del promotor PnisA en un plásmido puede inducirse la expresión del mismo por agregado de cantidades sub-inhibitorias de nisina (0,1 - 10 ng/ml) al medio de cultivo59.

Existe una gran variedad de vectores de expresión que contienen el promotor PnisA seguido de múltiples sitios de clonado (MCS) que permiten la inserción de genes heterólogos. Este sistema ha demostrado ser muy versátil y se ha empleado ampliamente para la sobreproducción de varias proteínas heterólogas167.

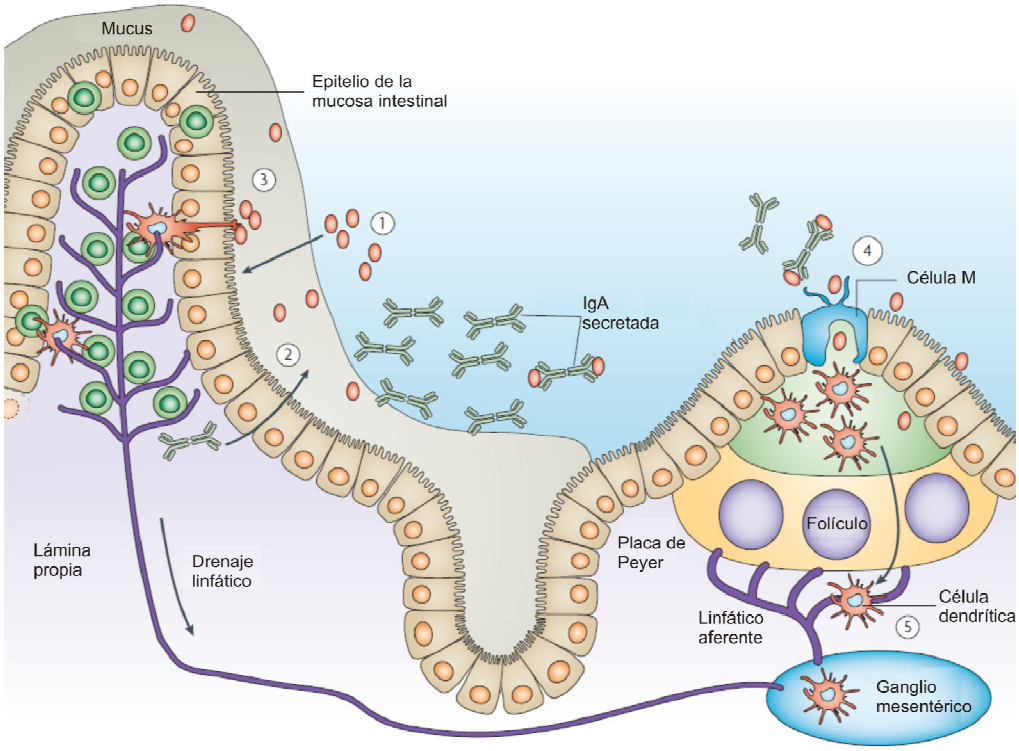


Figura 49. Destino de las BAL en el tracto gastrointestinal.

1. Las bacterias pueden estar presentes en el lumen intestinal o en la capa de mucus. 2.

Las inmunoglobulinas A pueden alcanzar el lumen transportadas por el receptor de IgA polimérica y unirse a bacterias o antígenos solubles. 3. Las bacterias pueden ser endocitadas por protrusiones de las células dendríticas que atraviesan el epitelio de la mucosa. 4. Las bacterias pueden atravesar el epitelio de la mucosa a través de células M en las placas de Peyer. 5. Las células dendríticas pueden fagocitar bacterias o sus proteínas y trasladarse a los ganglios mesentéricos iniciando una respuesta inmune. Adaptado de Wells et al, 2008234.

Direccionamiento de proteínas en Lactococcus lactis

El antígeno heterólogo expresado en L. lactis puede ser dirigido a distintos compartimientos celulares: el citoplasma, el medio extracelular o la pared bacteriana (Figura 50). Las proteínas destinadas a ser exportadas fuera de la célula son sintetizadas como precursores formados por la proteína madura y un péptido señal localizado en el extremo N- terminal. Este péptido posee un centro hidrofóbico, mientras que ambos extremos se encuentran cargados. Es reconocido y clivado por la maquinaria involucrada en la vía secretoria de las proteínas lo que permite la transferencia de la proteína a través de la membrana y la liberación al medio extracelular. Numerosas proteínas eucariotas, procariotas y virales han sido producidas y secretadas en L. lactis. En la gran mayoría se utilizó el péptido señal (PS) perteneciente a la proteína Usp45 de L. lactis MG1363123, 157.

La estrategia más utilizada para exponer proteínas en la superficie de las BAL implica el direccionamiento a través de un dominio de anclaje a la pared celular (CWA, cell wall anchor) que consiste en un pentapéptido conservado (LPXTG). Cuando este dominio se fusiona al extremo C-terminal de una proteína secretada, ésta es reconocida por la sortasa unida a la membrana. Esta enzima cataliza una reacción de transpeptidación que forma un enlace covalente entre la proteína y el peptidoglucano en la pared celular67. Las proteínas de anclado a la pared celular de bacterias Gram positivas mejor caracterizadas son la proteína A de Staphylococcus aureus y la proteína M6 de Streptococcus pyogenes por lo que sus dominios de anclaje son los más empleados en estas estrategias de direccionamiento a pared celular167.

Lactococcus lactis como vehículo de antígenos heterólogos

En los últimos años ha comenzado a vislumbrarse una potencial aplicación de las BAL en el área de la salud a partir de la posibilidad de obtener cepas recombinantes capaces de expresar proteínas de microorganismos patogénicos con el objetivo de utilizarlas como vectores vacunales vivos. Los mismos revisten una gran importancia desde el punto de vista de la salud pública ya que poseen bajos costos de producción, son muy fáciles de administrar y poseen un elevado margen de seguridad15. Así, las BAL podrían actuar como un sistema de producción y transporte de antígenos a las superficies mucosas facilitando su interacción con las células del sistema inmune.

Se han expresado un gran número de antígenos heterólogos en L. lactis con elevados niveles de producción (hasta un 60 % de las proteínas solubles totales)59. Sin embargo, el estudio inmunológico más completo se llevó a cabo con L. lactis recombinante expresando el fragmento C de la toxina tetánica (TTFC).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

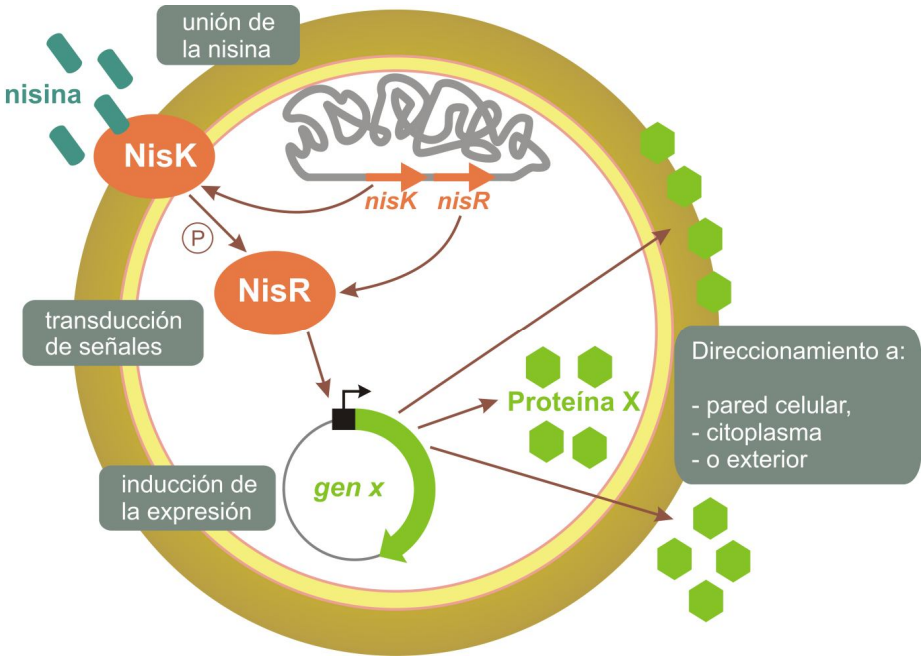


Figura 50. Representación esquemática del sistema de expresión ICE.

La expresión de genes en respuesta a la inducción con nisina involucra una proteína de membrana (Nis K) que funciona como sensor y detecta nisina extracelular. La señal es transferida a NisR a través de un proceso de fosforilación que la activa. Esta proteína citoplasmática reguladora controla la activación de la transcripción a partir del promotor PnisA. El mecanis mo de autoinducción de nisina se emplea como sistema de expresión de genes heterólogos en L. lactis. Dependiendo de la presencia o ausencia de señales de direccionamiento, la proteína se expresa en el citoplas ma, se secreta al medio exterior o es anclada en la pared celular.

Inicialmente se estudió su administración en ratones, sin adyuvante y por vía subcutánea, empleando las tres variantes posibles del sistema (expresión intracelular, anclada a la pared o secretada). Los resultados obtenidos por Robinson et. al.194 mostraron que las tres variantes eran capaces de generar anticuerpos protectores frente al desafío letal con la toxina, y que la dosis de L. lactis requerida para obtener esta respuesta dependía principalmente de la cantidad de antígeno expresada en cada caso. Sin embargo, cuando se expresaba una cantidad limitada de TTFC los anticuerpos protectores inducidos alcanzaban mayores niveles si dicho antígeno se hallaba anclado a la pared. En otros experimentos, se ensayó su administración por las vías oral e intranasal. La inmunización por ambas vías permitió detectar anticuerpos IgG específicos en el suero así como anticuerpos IgA específicos en la materia fecal, y en ambos casos se obtuvo inmunidad protectora. Es importante destacar que los títulos de anticuerpos fueron similares cuando se emplearon L. lactis vivos o inactivados mediante métodos químicos165, 166, 194, 195.

En cuanto a los antígenos virales expresados en L. lactis, el más estudiado fue la proteína E7 de HPV-16. Los primeros resultados obtenidos demostraron que la proteína es muy lábil y se degrada rápidamente en el citoplasma de L. lactis16. En contraste, las variantes secretada y

anclada a la pared evitaron la proteólisis y resultaron en mayor producción, sugiriendo que estas dos opciones son alternativas válidas para estabilizar y obtener mayores niveles de expresión de proteínas heterólogas en L. lactis. Cuando se inmunizaron ratones por vía intranasal con los lactococos recombinantes que expresan E7 se indujo tanto una respuesta humoral (anticuerpos anti E7) como celular (secreción de las citoquinas IL-2 e IFNγ). Estas respuestas fueron mayores en los ratones inmunizados con la variante anclada a la pared14. La co-administración de estos lactococos recombinantes que expresan E7 con lactococos que secretan IL-12 se evaluó en un modelo de ratón en el que se inducen tumores por HP V-16. Los ratones inmunizados resultaron completamente protegidos frente al desafío en este modelo. La inmunización terapéutica con estos lactococos, una semana después de la inducción del tumor, resultó en la remisión de los tumores palpables13.

En resumen, aunque la mayoría de los estudios inmunológicos se han llevado a cabo con L. lactis que producen los antígenos TTFC o E7, los estudios que avalan el uso de lactococos recombinantes como vacunas de mucosas para el delivery de proteínas terapéuticas aumentan continuamente con un promedio de 20 publicaciones por año. Se han descripto cepas recombinantes de L. lactis como vacunas de mucosas que expresan un gran número de antígenos distintos derivados de bacterias, virus y parásitos13, 155, 156, 183, 234.

En particular, la expresión de proteínas de rotavirus en L. lactis se reportó anteriormente por Enouf et. al.71 (proteína NSP4), Perez et. al.179 (proteína VP7), Li et. al.127 (proteína VP4), Marelli et. al.139 y Rodriguez-Díaz et. al.196 (proteína VP8*). En todos los casos se demostró la inducción de anticuerpos específicos luego de la administración a ratones pero no se realizaron desafíos con rotavirus para evaluar la existencia de protección.

Características particulares de la proteína VP6 de rotavirus

La proteína VP6 de rotavirus es la más abundante ya que constituye el 51 % de la masa molecular de la partícula viral. Las cepas de rotavirus se clasifican en especies definidas en base a la inmunogenicidad de la proteína VP6, también conocida como antígeno de grupo, de las cuales la más prevalente en humanos es la especie A75. Se encuentra altamente conservada, con menos de 13 % de divergencia aminoacídica entre cepas de rotavirus que infectan mamíferos. Probablemente debido a estas características, la mayoría de los anticuerpos inducidos en individuos infectados son específicos para VP6108, 217.

Cuando el rotavirus ingresa a las células se remueven las proteínas VP7 y VP4 de la capa externa creando una partícula de doble capa recubierta de VP6. A pesar de que VP6 no es la transcriptasa viral, la integridad de estas partículas es necesaria para este proceso, convirtiendo así a la VP6 en una proteína esencial para el ciclo de replicación viral. Estas propiedades combinadas con un posible rol en la inmunidad frente a la infección demuestran la importancia de esta proteína55, 75, 153.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Se ha demostrado que la inmunización con la proteína VP6 (cómo único antígeno viral) en presencia de un adyuvante, puede inducir una respuesta inmune protectora, al menos en el modelo murino de infección. También se comprobó que la protección inducida se mantuvo intacta durante al menos un año y no dependía de la cepa de ratón utilizada ni de la cepa murina de rotavirus empleada para el desafío. Por otra parte, la evaluación de la protección cruzada, inducida por dos proteínas VP6 divergentes, permite especular, sobre bases experimentales, que una vacuna que incluya VP6 de cualquier rotavirus que infecte mamíferos podría proteger contra la infección ocasionada por cualquier otra cepa55, 153, 219.

Objetivo general

Evaluar la bacteria del ácido láctico Lactococcus lactis como vehículo de delivery antigénico a mucosas en un modelo de rotavirus

Objetivos particulares

-Generar una cepa de Lactococcus lactis recombinante que exprese la proteína VP6 de rotavirus anclada a la pared celular empleando el sistema NICE.

-Optimizar la expresión de la proteína VP6 y confirmar su localización en la pared bacteriana.

-Evaluar la capacidad de Lactococcus lactis de inducir anticuerpos específicos para rotavirus en ratones inmunizados.

-Evaluar la capacidad de Lactococcus lactis de inducir protección frente al desafío con rotavirus en ratones inmunizados.

Materiales y métodos

Cepas bacterianas y manipulación del D A. La cepa L. lactis NZ9000 fue cedida gentilmente por el Dr. Christian Magni (Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario, Argentina) y fue crecida en medio de cultivo M17 (Biokar Diagnostics, Beuvais, Francia) suplementado con glucosa 0,5 % a 30 °C sin agitación. La cepa Escherichia coli TOP10 fue crecida en medio de cultivo Luria-Bertani a 37 °C con agitación. Los clones fueron seleccionados por adición de antibióticos: para L. lactis, cloranfenicol 10 µg/ml y para E. coli, ampicilina 100 µg/ml. Las técnicas de extracción de DNA plasmídico y otras técnicas generales de manipulación del DNA se llevaron a cabo como se describió previamente136, 192.

La reacción de transcripción reversa (RT) se llevó a cabo empleando AMV RT (Promega, Madison, WI, Estados Unidos) y las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se llevaron a cabo empleando Pfu o Taq (Promega, Madison, WI, Estados Unidos) en un termociclador PTC-200 (MJ Research, Waltham, MA, Estados Unidos). Los plásmidos se enviaron a Macrogen Sequencing Service (Seoul, Corea) para su secuenciamiento.

Virus. Se emplearon las cepas de rotavirus ECcc y ECwt, así como la preparación de RRV concentrado, propagadas y obtenidas como se indicó en la sección “Materiales y métodos” de la Parte II de esta tesis.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Construcción del plásmido para expresión de VP6 en L. lactis. Se obtuvo el cDNA de la proteína VP6 a partir de la cepa de rotavirus ECcc por medio de reacciones de RT-PCR a partir de RNA viral extraído como se describió en la sección “Materiales y métodos” de la Parte I de esta tesis. Las secuencias de los primers fueron: 5’ ATGGATGTGCTGTACTCC 3’ y 5’ CTTTACCAGCATGCTTCTA 3’. El producto de PCR fue clonado en el sistema pGEM- T Easy Vector (Promega, Madison, WI, Estados Unidos) y el plásmido resultante pGEM-VP6 se empleó para transformar bacterias E. coli TOP10 electrocompetentes.

Para direccionar la proteína VP6 a la superficie de L. lactis, su secuencia se clonó en el plásmido pCWA:Nuc67, 122 cedido gentilmente por el Dr. Christian Magni (Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario, Argentina). Para ello, se amplificó por PCR la secuencia de VP6 a partir de pGEM-VP6 empleando los primers: 5’ CCA ATGCATCAATGGATGTGCTGTACTCC 3’ y 5’ CCGATATCCCCTTTACCAGCATGC

TTCTA 3’ que contienen los sitios de restricción NsiI y EcoRV respectivamente (subrayados). Tanto el producto de PCR (1.212 pb) como el plásmido pCWA:Nuc fueron digeridos con las mismas enzimas de restricción, ligados para obtener pCWA:VP6 y transformado en L. lactis NZ9000 electrocompetentes (NZ9000/pCWA:VP6)192. En este plásmido, la transcripción de la proteína VP6 se encuentra bajo el control del promotor PnisA, en marco con el péptido señal SP (de la proteína Usp45 de L. lactis MG1363) y el fragmento de anclado a pared CWA (de la proteína M6 de S. pyogenes). Para realizar el screening de los clones obtenidos se llevó a cabo una PCR empleando los primers VP6F: 5’ GACGGVGCRACTACATGGT 3’ y VP6-R: 5’ GTCCAATTCATNCCTGGTG 3’ que generan un amplicón de 379 pb.

Condiciones de inducción. Para evaluar el efecto de distintas concentraciones de nisina sobre el crecimiento bacteriano y la expresión de VP6, se emplearon cultivos saturados crecidos overnight para inocular medio fresco en una dilución 1/20. Luego de alcanzar distintas densidades ópticas a 600 nm (DO600) (0,2; 0,5 o 0,8) los cultivos se indujeron con nisina (Danisco, Grindsted, Dinamarca) a distintas concentraciones (0, 1, 10, 50, 100, 200, y 500 ng/ml). A intervalos de una hora durante seis horas, se obtuvieron extractos proteicos correspondientes a los protoplastos y a la pared celular como se describe debajo. Adicionalmente, se ensayaron incubaciones overnight (ON)192.

Análisis de la expresión y la localización de VP6-CWA. Para obtener extractos proteicos correspondientes a los protoplastos o a la pared celular bacteriana192, un volumen de cultivo inducido o no inducido correspondiente a 3 DO600 se centrifugó a 10.000 g durante 3 minutos. El pellet celular se lavó una vez con buffer TES (Tris-HCl 10 mM pH 5.8, EDTA 1 mM, sacarosa 25 %) y luego la pared celular se digirió con 200 µl de TES-LLP (buffer TES suplementado con lisozima 10 mg/ml, lisostafina 100 µg/ml y PMSF 1 mM). Luego de una hora de incubación a 37 °C, se recuperaron los protoplastos por centrifugación a 2.000 g durante 10 minutos. El pellet se lavó con buffer TES y se resuspendió en 100 µl de buffer TES:buffer de siembra 1:1. El sobrenadante (fracción correspondiente a la pared celular) se combinó con 50 µl de buffer de siembra (Tris-HCl 0,25 M, pH 6,8; SDS 2 %; glicerol 10 %; β-mercaptoetanol 5 % y azul de bromofenol 0,2 %). Para la

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

obtención de extractos proteicos totales, se agregaron 50 µl de SDS 20 % luego de la digestión de la pared celular y se diluyó la preparación 1:1 con buffer de siembra. En todos los casos las muestras se incubaron durante 5 minutos a 100 °C.

Los extractos proteicos bacterianos se analizaron por SDS-PAGE 10 % y Western blot como se describió en la sección “Materiales y métodos” de la Parte II de esta tesis. Para ello, se sembraron 10 µl de cada muestra de extractos totales o protoplastos y 25 µl de cada muestra de extractos de pared celular. Como marcador de peso molecular se sembraron 3 µl de PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, Lafayette, CO, Estados Unidos) y como control positivo se sembró 1 µl de una dilución 1/20 en buffer de siembra de rotavirus RRV concentrado. Los geles se tiñeron con el colorante Coomasie brilliant blue R-250 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) o se transfirieron a membranas de PVDF.

Luego de bloquear las membranas con PBS-TC (PBS, Tween-20 0,2 %, caseína 1 %), se incubaron con una dilución 1/3.000 en PBS-TC de suero policlonal de ratón anti-RRV (obtenido como se describió en la sección “Materiales y métodos” de la Parte II de esta tesis). Luego de tres lavados de 10 minutos con PBS-T (PBS, Tween-20 0,2 %), se incubaron con una dilución 1/1.000 en PBS-TC de anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugados con peroxidasa (Pierce, Rockford, IL, Estados Unidos). A continuación se realizaron dos lavados con PBS-T y un lavado con PBS. El revelado se llevó a cabo por incubación con el reactivo quimioluminiscente Biolumina (PB-L, Bernal, Argentina) según las indicaciones provistas por el fabricante y colocando luego una placa radiográfica sobre la membrana, que a continuación fue revelada y fijada.

Para confirmar la localización de la fusión VP6-CWA en la superficie de L. lactis, se analizaron cultivos inducidos de L. lactis NZ9000/pCWA:VP6 por citometría de flujo. Para ello, las células se centrifugaron, se lavaron con PBS y se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti-VP6 (obtenido como se indica abajo) diluído 1/20 en PBS-TC durante 30 minutos a 37 °C. Luego de lavar con PBS-T, las células se incubaron con anticuerpos de conejo anti-IgG de ratón conjugados con fluoresceína (Caltag Laboratories, Burlingame, CA, Estados Unidos). Para cada muestra se adquirieron 100.000 eventos en un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson, Immunocytometry Systems, San Jose, CA, Estados Unidos) dentro de una región diseñada en función de los valores FSC-H y SSC-H correspondientes a L. lactis. Para cada evento se registraron los valores de fluorescencia en el canal FL1 (filtro band-pass 530/30 nm) detectando la emisión del fluoróforo FITC. Para determinar los valores negativos de fluorescencia se utilizaron cultivos de L. lactis NZ9000/pCWA:VP6 sin inducir marcados del mismo modo.

Producción de anticuerpos monoclonales de ratón anti rotavirus. Se inocularon ratones Balb/c por vía subcutánea con 50 µg de RRV purificado por dosis combinado con adyuvante completo o incompleto de Freund (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) en los días 0 y 14, respectivamente. Durante el protocolo de inmunización se tomaron muestras de sangre realizando un pequeño corte en el extremo de la cola de los ratones. Tres días después de la segunda inmunización, se sacrificaron los ratones y se extrajeron los bazos para obtener esplenocitos

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

empleando protocolos descriptos previamente115. Tanto los esplenocitos como las células de mieloma SP2/0 Ag14 (ATCC, Manassas, VA, Estados Unidos) se lavaron tres veces con DMEM por separado y luego se combinaron en un mismo tubo en una relación 2:1 respectivamente. Se centrifugaron, se descartó el sobrenadante, las células se resuspendieron y se mantuvieron a 37 °C durante el resto del protocolo. Se les agregó 1 ml de Polietilenglicol 1500 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) a lo largo de un minuto con agitación y luego se continuó agregando un total de 20 ml de DMEM a lo largo de 5 minutos. Las células se centrifugaron durante 10 minutos a 1.000 g, se incubaron durante 5 minutos a 37 °C, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en DMEM suplementado con suero fetal bovino 10 %, BM Condimed H1 10 % (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) y HAT 1X (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos). Las células se distribuyeron en placas de 96 wells y se incubaron a 37 °C durante alrededor de 10 días hasta la aparición de hibridomas94, 104, 148, 154.

Los sobrenadantes de los wells se analizaron por ELISA para detectar IgG anti rotavirus, añadiendo un paso de bloqueo con PBS-TC durante 1 hora a 37 °C previo a la incubación con los sobrenadantes sin diluir. Los wells que resultaron positivos por ELISA, se expandieron transfiriéndolos a placas de 12 wells y se clonaron dos veces por dilución limitante. Los clones seleccionados fueron expandidos inicialmente en DMEM suplementado con suero fetal bovino 10 %, BM Condimed H1 10 % (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) y HT 1X (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) y gradualmente adaptados a DMEM suplementado con suero fetal bovino 10 %.

Luego fueron inoculados por vía intraperitoneal a ratones Balb/c (tratados 15 días antes con 500 µl de adyuvante incompleto de Freund) en una concentración de 5 x 106 células/ratón49, 94, 104, 148, 154. El fluído ascítico se colectó a los 15 días, se ensayó por ELISA y se sometió a purificación de IgG.

Purificación de IgG. La purificación de IgG a partir de líquido ascítico se llevó a cabo empleando una resina de proteína G Fast Flow (GE Healthcare Biosciences, Pittsburg, PA, Estados Unidos) que se empaquetó en una columna de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La muestra se preparó diluyendo 3 ml de líquido ascítico con 1 ml de buffer fosfato, se la incorporó al lecho de la columna y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se eluyó con buffer fosfato, recolectando fracciones de 1 ml y se determinó al mismo tiempo la concentración de proteínas por el método de Bradford (se combinaron 10 µl de muestra con 200 µl de una dilución 1/5 del reactivo concentrado de Bradford (Bio-Rad Protein Assay, Hercules, CA, Estados Unidos)). Una vez que no se detectó proteína en tres fracciones consecutivas, se retiró el excedente de buffer fosfato y se eluyó la IgG con buffer glicina 100 mM pH 2,7, recolectando fracciones de 1 ml y determinando al mismo tiempo la concentración de proteínas por el método de Bradford. A cada fracción se le adicionaron 75 µl de buffer Tris 1 M pH 9. Luego de eluida la IgG retenida, se procedió a lavar y regenerar la columna de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Se determinó la concentración de proteínas para cada fracción recolectada midiendo la DO a 495 nm y se combinaron las fracciones de mayor señal luego de la elución con buffer glicina. Estas

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

fracciones se ultrafiltraron en tubos Amicon Ultra-15 100K (Millipore, Billerica, MA, Estados Unidos), lavando dos veces con PBS por centrifugación a 4.000 g durante 10 minutos y resuspendiendo la IgG en PBS, la cual se alicuotó y almacenó a -20 °C. La concentración de proteína se calculó midiendo la densidad óptica a 280 nm en un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, Estados Unidos) y empleando el coeficiente de extinción correspondiente a IgG para calcular la concentración de proteína en la muestra5.

Preparación de las bacterias para inmunizar. Los cultivos de L. lactis NZ9000/pCWA:VP6 inducidos en condiciones óptimas o L. lactis NZ9000 (libre de plásmido) se lavaron tres veces con PBS y se resuspendieron en PBS para obtener 1010 unidades formadoras de colonias/ml (CFU/ml).

Inmunización de ratones con L. lactis Z9000/pCWA:VP6. Se inmunizaron grupos de ratones por vía oral (con un volumen de 100 µl), subcutánea (con un volumen de 200 µl) o intranasal (con un volumen de 20 µl) con L. lactis NZ9000/pCWA:VP6 inducidos o sin inducir. Como control se inmunizaron ratones con L. lactis NZ9000 (libre de plásmido) o PBS. A continuación se detallan las inmunizaciones realizadas en tres experimentos:

Experimento 1: Se inmunizaron grupos de 6 ratones con, i) 109 CFU de L. lactis NZ9000/pCWA:VP6 inducido, ii) 109 CFU de L. lactis NZ9000/pCWA:VP6 sin inducir, iii) 109 CFU de L. lactis NZ9000 libre de plásmido o iv) PBS. Las inmunizaciones se realizaron por vía oral empleando una sonda intragástrica durante 3 días consecutivos en 3 series separadas por 2 semanas (Figura 51A).

Experimento 2: Se inmunizaron grupos de 4 ratones con i) 1010 CFU de L. lactis NZ9000/pCWA:VP6 inducido por vía intragástrica, ii) 109 CFU de L. lactis NZ9000/pCWA:VP6 inducido por vía intranasal o iii) PBS. Las inmunizaciones por vía oral se realizaron de igual manera que en el experimento 1 (Figura 51A) y las inmunizaciones por vía intranasal o subcutánea se administraron en los días 0, 14 y 28 (Figura 51B).

Experimento 3: Se inmunizaron grupos de 10 ratones con i) 109 CFU de L. lactis NZ9000/pCWA:VP6 inducido, ii) 109 CFU de L. lactis NZ9000 libre de plásmido o iii) PBS. Las inmunizaciones se realizaron por vía subcutánea en los días 0, 14 y 28 (Figura 51B).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

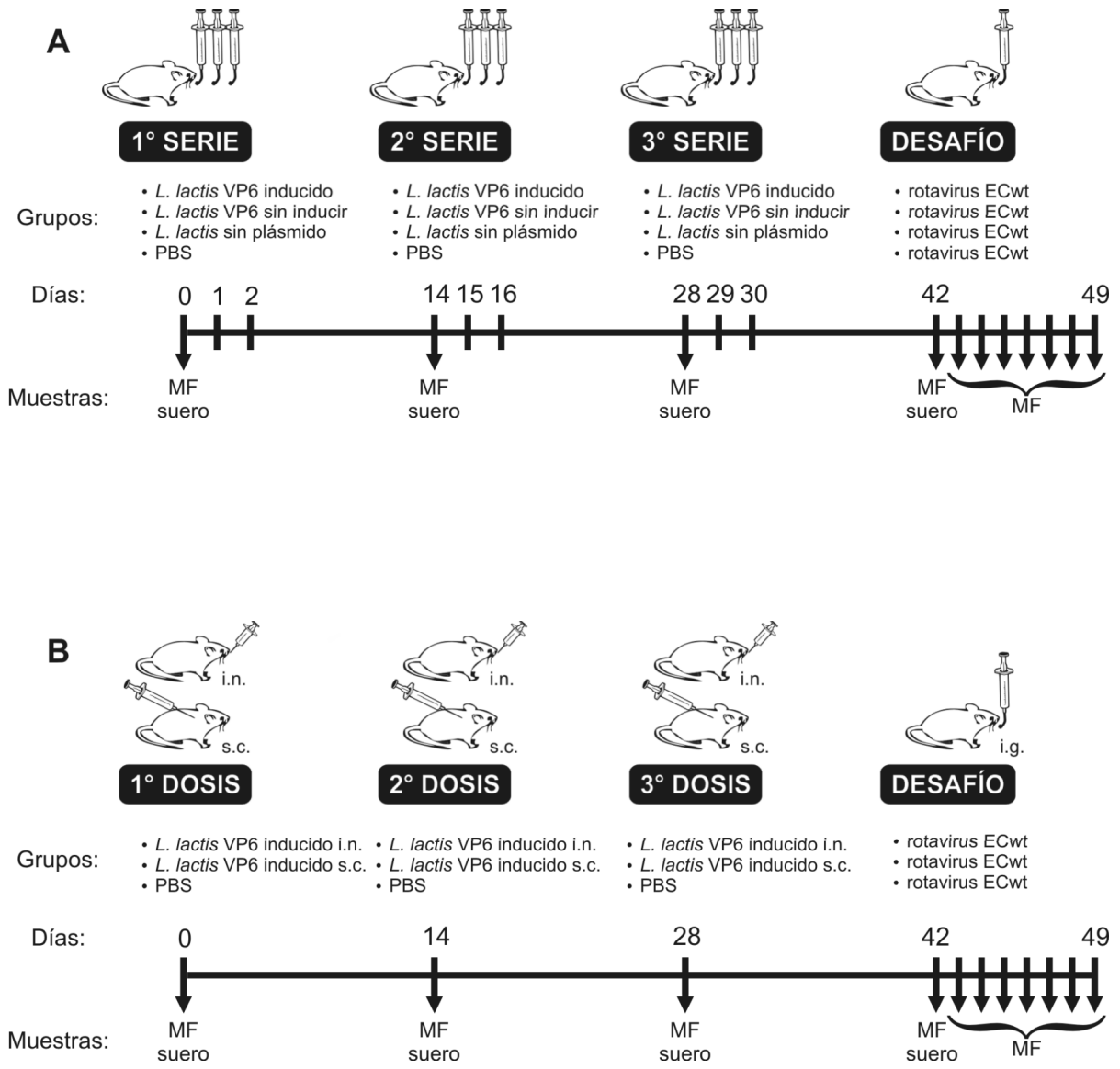


Figura 51. Cronogramas de inmunización con L. lactis Z9000/pCWA:VP6.

El diagrama muestra el tratamiento recibido por cada grupo de ratones (parte superior) a lo largo del cronograma de inmunización y desafío, así como las muestras recolectadas individualmente (parte inferior). A. Las inmunizaciones por vía oral se realizaron en 3 series cada dos semanas, cada una consistió en 3 dosis administradas en días consecutivos. B. Las inmunizaciones por vía intranasal o subcutánea se realizaron en 3 dosis administradas cada dos semanas. i.n.: intranasal, s.c.: subcutáneo, i.g.: intragástrico

Recolección de muestras de suero y materia fecal. Ver sección “Materiales y métodos” de la Parte III de esta tesis.

Desafío de los ratones con rotavirus ECwt. Ver sección “Materiales y métodos” de la Parte III de esta tesis.

ELISA para detección de rotavirus. Ver sección “Materiales y métodos” de la Parte III de esta tesis.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

ELISA y Western blot para detección de IgG e IgA anti rotavirus. Ver sección “Materiales y métodos” de la Parte III de esta tesis.

Resultados y discusión

Expresión de VP6-CWA en L. lactis

La secuencia nucleotídica que codifica para la proteína VP6 de la cepa de rotavirus murino EC se amplificó por RT-PCR y se clonó en el plásmido pGEM-T para obtener pGEM- VP6. Empleando este plásmido como molde, se amplificó la secuencia de VP6 incluyendo dos sitios de restricción en sus extremos que permitieron el clonado en el plásmido pCWA:Nuc para la obtención de pCWA:VP6 (Figura 52). El secuenciamiento de este plásmido permitió confirmar que la secuencia de VP6 era idéntica a la original y que se encontraba en marco con las secuencias codificantes de SP y CWA. Este plásmido se empleó para transformar L. lactis NZ9000 y obtener L. lactis NZ9000/pCWA:VP6.

Para determinar si este sistema permitía la expresión de la proteína de fusión VP6- CWA, se obtuvieron extractos proteicos totales de cultivos inducidos y se los analizó por SDS-PAGE. Como puede observarse en la Figura 53A, luego de sólo una hora de inducción se detectó una banda con el tamaño esperado de VP6-CWA (62,9 kDa). Es importante notar que esta proteína no se detectó en el extracto proteico realizado a partir de un cultivo no inducido (Figura 53A, calle 0 hora). La identidad de esta banda se confirmó por Western blot, dado que reaccionó con un suero policlonal anti rotavirus (Figura 53B). Se detectó una banda principal correspondiente al tamaño esperado de la fusión VP6-CWA y también se detectaron productos de degradación de menor masa molecular en las muestras de cultivos inducidos. Sin embargo, ninguno de ellos correspondió al tamaño de la proteína VP6. Adicionalmente no se encontraron bandas inmunoreactivas en el extracto obtenido a partir del cultivo no inducido (Figura 53B, calle 0 hora). Estos resultados demuestran que VP6 puede ser expresada en L. lactis y que es reconocida por anticuerpos específicos anti rotavirus.

Optimización de la expresión y determinación de la localización celular de VP6-CWA

Para determinar si la proteína de fusión VP6-CWA se encontraba anclada a la pared celular, se llevó a cabo el fraccionamiento celular de cultivos de L. lactis NZ9000/pCWA:VP6 y su evaluación por Western blot. El análisis del contenido proteico de la fracción correspondiente a la pared celular (PC) reveló la presencia de la banda correspondiente a VP6-CWA, que como se esperaba, también fue detectada en la fracción celular correspondiente a los protoplastos (PP)67 (Figura 54A). En ambas fracciones se observó el patrón de bandas múltiples detectado en los extractos proteicos totales (Figura 53B). No se detectó VP6 en la fracción correspondiente al sobrenadante de cultivo, aún después de concentrarlo con ácido tricloroacético (no se muestra)192.

Para determinar las condiciones óptimas de expresión, se llevó a cabo el fraccionamiento celular y el análisis por Western blot de cultivos inducidos durante distintos tiempos (entre 0 y 6 horas, y overnight), a distintas DO600 de inicio (0,2; 0,5 y 0,8) y con distintas concentraciones de nisina (0, 1, 10, 50, 100, 200, y 500 ng/ml). La Figura 54AyB muestra ejemplos de membranas obtenidas durante la optimización de la expresión y la Figura 54C muestra las curvas de crecimiento obtenidas para cada concentración de nisina.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

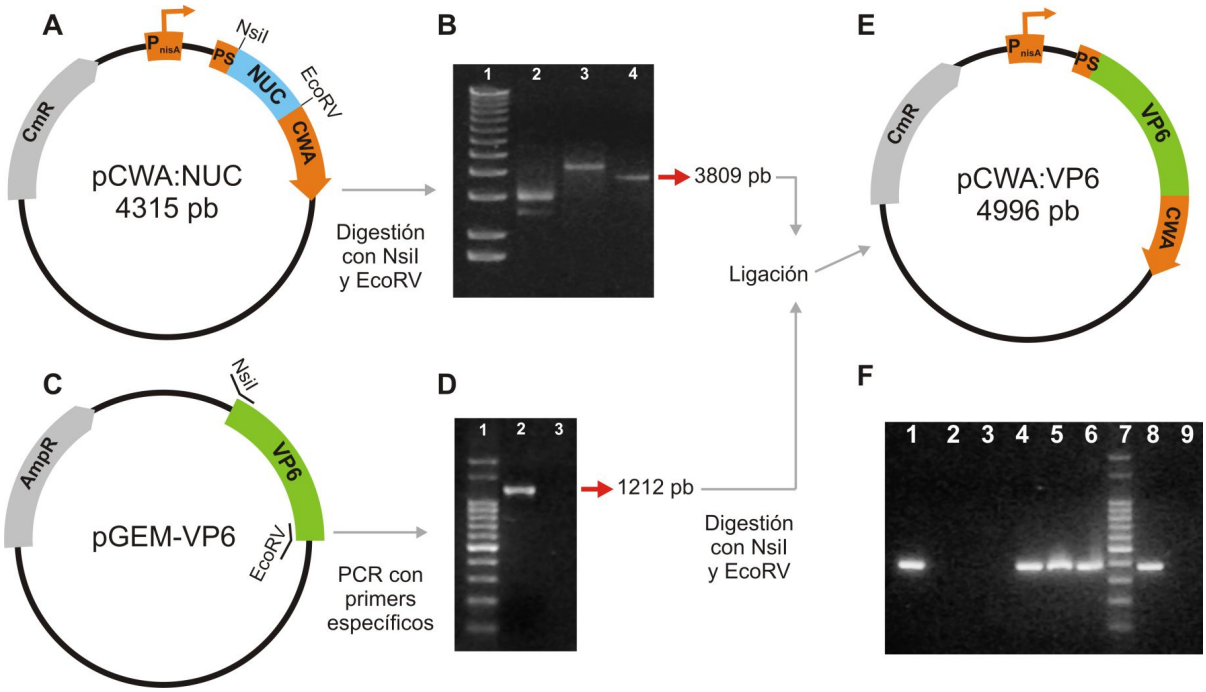


Figura 52. Clonado de VP6 para la obtención de pCWA:VP6.

El diagrama resume los pasos realizados para la obtención del plásmido pCWA:VP6. Éste resultó de la ligación del plás mido pC WA:Nuc digerido con las enzimas de restricción NsiI y EcoRV y el fragmento correspondiente a la secuencia de VP6 digerido con las mis mas enzimas. A. Esquema del plásmido pCWA:Nuc que codifica para el precursor SP-Nuc-CWA que permite la expresión de una nucleasa de Staphylococcus aureus (Nuc) anclada a la pared celular controlada por un promotor inducible por nisina (PnisA). CmR: gen de resistencia a cloranfenicol. B. Fotografía del gel de agarosa 0,8 % en el que fue resuelto el producto de la digestión de pCWA:NuC. Calle 1, ladder 1 Kb (PB-L) tamaños:

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 Kb. Calle 2, plásmido pCWA:Nuc sin digerir. Calle 3, plásmido pCWA:Nuc digerido con EcoRV. Calle 4, plásmido pCWA:Nuc digerido con EcoRV y NsiI. La flecha roja indica el fragmento aislado para su purificación. C. Esquema del plásmido pGEM-VP6 que contiene la secuencia de la proteína VP6 de la cepa de rotavirus EC. AmpR: gen de resistencia a ampicilina. D. Fotografía del gel de agarosa 1% en el que fue resuelto el producto de la PCR sobre pGEM-VP6. Calle 1, ladder 100 pb (PB-L) tamaños: 100, 200, 300, 400, 500 (más intensa), 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.500, 2.080 pb. Calle 2, producto obtenido. Calle 3, control negativo. La flecha roja indica el fragmento aislado para su purificación. E. Esquema del plásmido obtenido pCWA:VP6.

F. Fotografía del gel de agarosa 1 % en el que fueron resueltos los productos de la PCR para realizar un s creening sobre plásmidos extraídos a partir de distintas colonias de L. lactis transformados con pCWA:VP6. Calles 1 a 6, colonias 1 a 6; calle 7, ladder 100 pb; calle 8, control positivo; calle 9, control negativo.

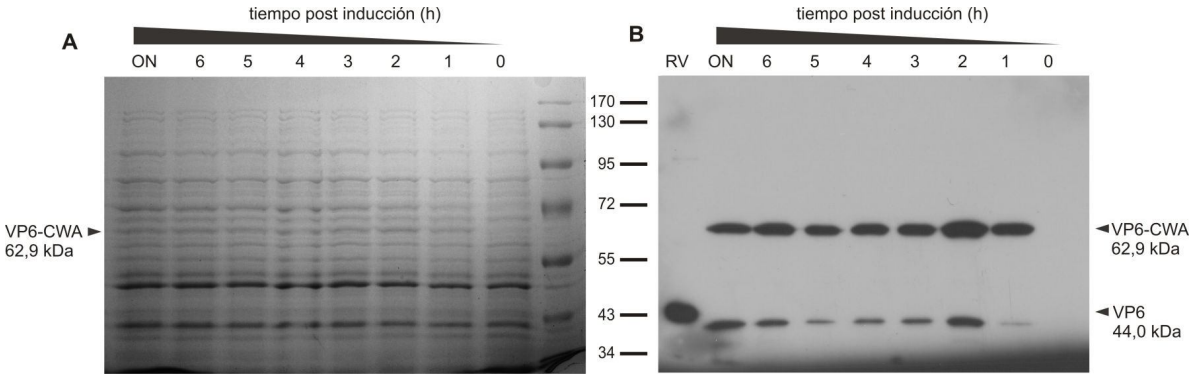


Figura 53. Análisis de la expresión de la fusión VP6-CWA.
A. Gel de poliacrilamida teñido con Coomasie Blue de extractos proteicos totales de L. lactis NZ9000/pC WA:VP6 a distintos tiempos luego de la inducción. B. Análisis por Western blot de extractos proteicos totales de L. lactis NZ9000/pCWA:VP6 a distintos tiempos luego de la inducción para detectar VP6 con un suero policlonal anti rotavirus. Como control positivo (RV) se sembró rotavirus RRV concentrado. El tamaño de las bandas del marcador de peso molecular se indica entre el gel (A) y la membrana (B) y los tamaños de las proteínas VP6-CWA y VP6 se indican a la izquierda del gel y a la derecha de la membrana. ON: incubación overnight.

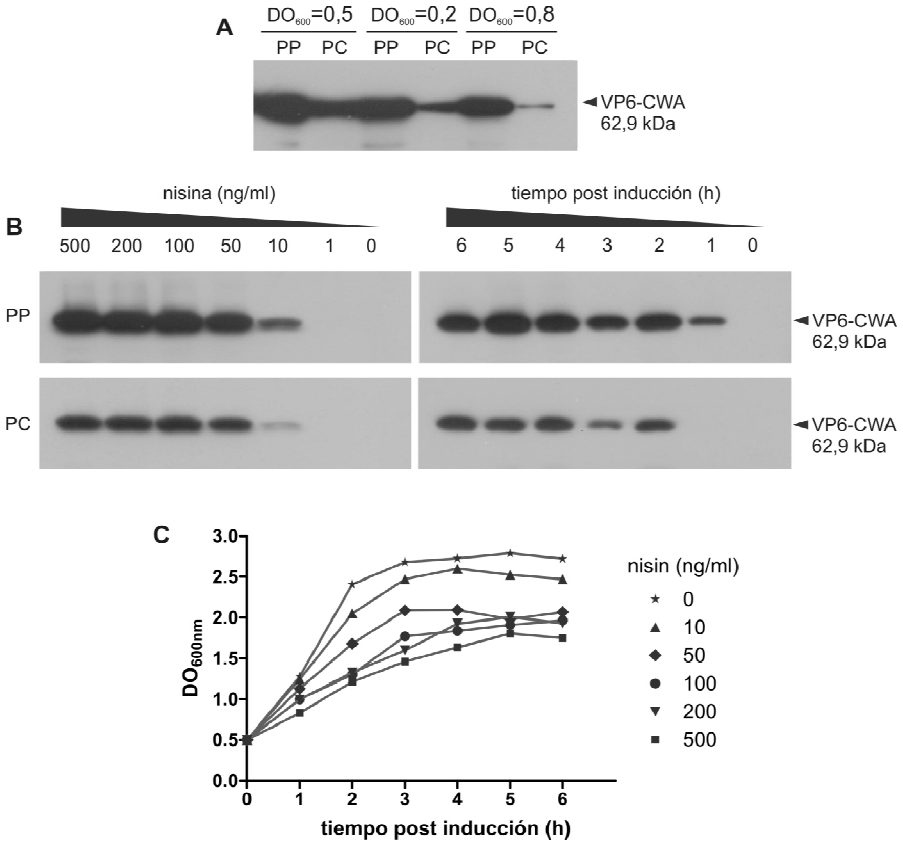


Figura 54. Optimización de la expresión de VP6-CWA y determinación de la localización celular.
Análisis por Western blot de: A. Extractos proteicos de las fracciones correspondientes a los protoplastos (PP) y a la pared celular (PC) de cultivos de L. lactis NZ9000/pC WA:VP6 obtenidos luego de dos horas de inducción con 100 ng/ml de nisina a partir de distintas DO600. B. Extractos proteicos de las fracciones correspondientes a los protoplastos (membranas superiores) y pared celular (membranas inferiores) de cultivos de L. lactis NZ9000/pCWA:VP6 inducidos a una DO600=0,5 durante dos horas con distintas concentraciones de nisina (membranas del lado izquierdo) o inducidos con 100 ng/ml a distintos tiempos post inducción (membranas del lado derecho). C. El gráfico muestra la DO600 alcanzada a distintos tiempos luego de la inducción con distintas concentraciones de nisina (en ng/ml).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

En resumen, la expresión de VP6-CWA fue óptima cuando los cultivos de L. lactis NZ9000/pCWA:VP6 se indujeron a una DO600 inicial de 0,5 durante 2 horas con 100 ng/ml de nisina. Estas condiciones demostraron la mejor eficiencia de expresión y direccionamiento con mínimo impacto en el crecimiento bacteriano y fueron las empleadas en todos los experimentos subsiguientes.

La eficiencia del direccionamiento (relación entre la cantidad de VP6-CWA detectada en la pared celular y la cantidad total de VP6-CWA detectada) se determinó por densitometría a partir de los resultados obtenidos por Western blot y se estimó en aproximadamente un 40 % bajo las condiciones de expresión óptimas. La banda considerada para estos cálculos fue la correspondiente a VP6-CWA no degradada (62,9 kDa). Estos resultados indican que VP6- CWA se exporta eficientemente a la pared bacteriana, de acuerdo a resultados previos obtenidos con L. lactis NZ9000/pCWA:Nuc67.

Con el objetivo de confirmar la localización y el display de VP6, se analizaron cultivos de L. lactis NZ9000/pCWA:VP6 inducidos en condiciones óptimas por citometría de flujo, empleando anticuerpos monoclonales anti VP6 (Figura 55). El desplazamiento hacia la derecha (hacia mayores valores de intensidad de fluorescencia) de L. lactis NZ9000/pCWA:VP6 inducido con respecto a cultivos sin inducir, no sólo confirmó la presencia de VP6 en la pared celular sino que también refleja que la proteína se encuentra expuesta en la superficie exterior de la pared celular de la bacteria ya que el anticuerpo monoclonal pudo interactuar con la proteína.

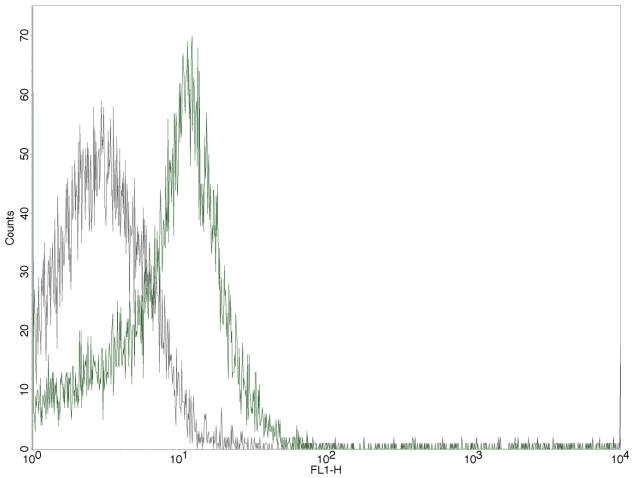


Figura 55. Análisis de VP6-CWA en la superficie de L. lactis por citometría de flujo.

Superposición de histogramas obtenidos por citometría de flujo de cultivos de L. lactis NZ9000/pC WA:VP6 inducidos (línea verde) o sin inducir (línea gris) luego de la marcación con un anticuerpo monoclonal anti VP6 y un anticuerpo secundario marcado con FITC. En el eje vertical se indica el número de eventos (Counts) y en el eje horizontal se indica la intensidad de fluorescencia (FL1-H) correspondiente a FITC.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Inmunogenicidad de L. lactis Z9000/pCWA:VP6 en ratones

Para determinar si la proteína de fusión VP6-CWA expresada en L. lactis podría inducir una respuesta inmune específica anti VP6 o incluso una respuesta protectora frente a un desafío con rotavirus, se inmunizaron grupos de ratones con L. lactis NZ9000/pCWA:VP6.

Resultados del experimento 1

Se inmunizaron grupos de 6 ratones con L. lactis NZ9000/pCWA:VP6 inducido, L. lactis NZ9000/pCWA:VP6 sin inducir, L. lactis NZ9000 libre de plásmido o PBS. En este caso las bacterias fueron administradas por vía oral de acuerdo a un cronograma de 3 series cada dos semanas de 3 dosis de 109 CFU cada una. Esta es la vía de inoculación clásica de las BAL de acuerdo a uno de los cronogramas de inmunización más empleados para esta vía192.
Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 56.

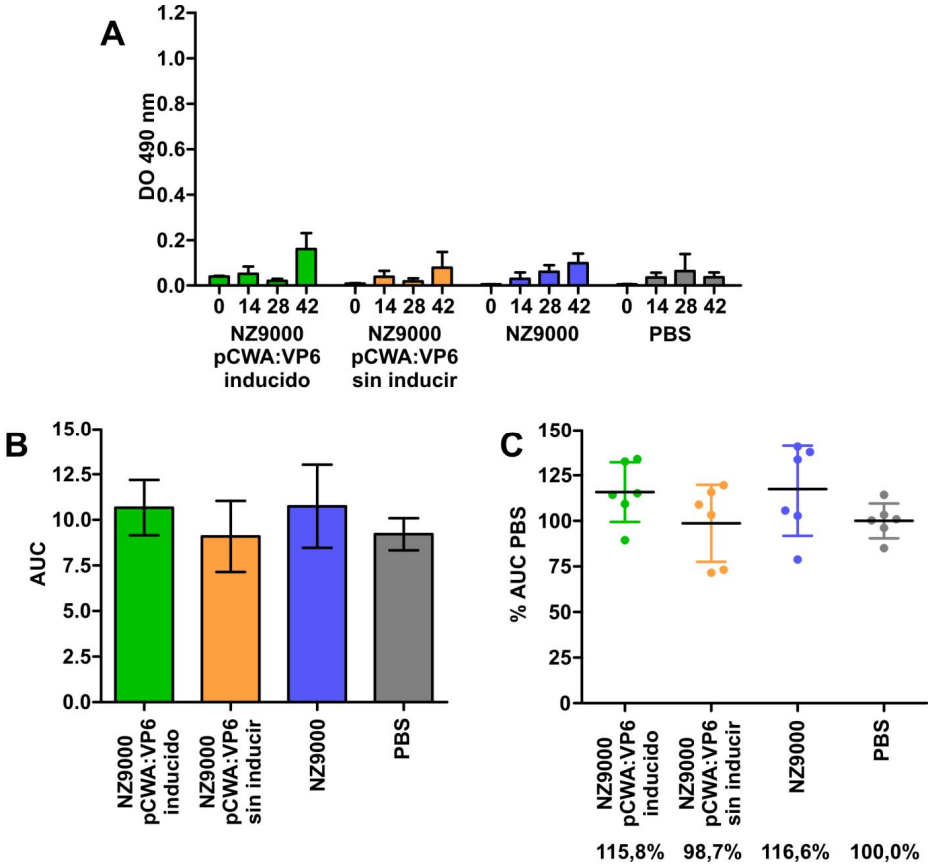


Figura 56. Resultados obtenidos durante el experimento 1.
A. El gráfico muestra los niveles de IgG específica anti rotavirus determinados por ELISA en diluciones 1/100 de los sueros de los ratones inmunizados con L. lactis. En el eje horizontal se indican los días post inmunización (dpi) y debajo el inmunógeno recibido por cada grupo de ratones. Las barras representan la DO490 promedio para cada grupo y las barras de error representan la desviación estándar. B. Área bajo la curva de excreción promedio para cada grupo de ratones. C. Porcentaje del área bajo la curva promedio del grupo PBS para cada grupo de ratones, el valor promedio se indica bajo el nombre del grupo en el eje horizontal. En todos los casos las barras de error representan la desviación estándar.

Los sueros de los ratones pertenecientes a los grupos control inmunizados con L. lactis NZ9000/pCWA:VP6 sin inducir, L. lactis NZ9000 libre de plásmido o PBS resultaron negativos para IgG anti rotavirus por ELISA. Por otro lado, los sueros de los ratones inmunizados con L. lactis NZ9000/pCWA:VP6 inducido presentaron niveles muy bajos de IgG anti rotavirus. Esta respuesta sólo fue detectable en las muestras colectadas el día 42 (2 semanas después de la última serie de dosis) y aunque apenas superaron el valor de corte del ELISA (DO490=0,16) no fueron significativamente diferentes de los valores negativos obtenidos con las muestras de los grupos control. Tampoco se detectó IgA anti rotavirus por ELISA ni Western blot en ninguna de las muestras de suero ni de materia fecal.

Dos semanas luego de la tercera serie de dosis, los ratones fueron desafiados con la cepa de rotavirus wild type murino ECwt. La recolección de muestras de materia fecal a lo largo de una semana para cada ratón en forma individual permitió determinar el área bajo la curva de excreción de rotavirus para cada grupo de ratones y el porcentaje de excreción con respecto al grupo de ratones control inoculados con PBS (Figura 56ByC). Estos datos demostraron que las inmunizaciones realizadas no fueron protectoras frente al desafío ya que no hubo diferencias significativas en las áreas bajo la curva promedio de los grupos de ratones.

En vista de la ausencia de inmunogenicidad y protección inducida por la inoculación por vía oral de 109 CFU de L. lactis NZ9000/pCWA:VP6, en el siguiente experimento se decidió incrementar diez veces la dosis administrada por dicha vía y también ensayar la vía de administración intranasal166 como alternativas para inducir una respuesta inmune específica y protectora.

Resultados del experimento 2

Se inmunizaron grupos de 4 ratones con 1010 CFU de L. lactis NZ9000/pCWA:VP6 inducido por vía oral, 109 CFU de L. lactis NZ9000/pCWA:VP6 inducido por vía intranasal, o PBS. En este caso las bacterias fueron administradas por vía oral de acuerdo a un cronograma de 3 series cada dos semanas que incluía 3 dosis de 109 CFU cada una, mientras que en el caso del grupo al que se administró L. lactis por vía intranasal se realizaron tres dosis de 1010 CFU separadas por dos semanas. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 57.

Los sueros de los ratones pertenecientes a los grupos control inmunizados con PBS resultaron negativos para IgG anti rotavirus por ELISA. Asimismo, tanto el incremento en la dosis administrada por la vía oral como la administración por la vía intranasal no resultaron en una mayor inmunogenicidad con respecto a los resultados obtenidos en el experimento anterior ya que los sueros de ninguno de grupos inmunizados fueron positivos para IgG anti rotavirus por ELISA. Tampoco se detectó IgA específica por ELISA ni

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Western blot. De igual manera, ninguno de los grupos resultó protegido frente al desafío con rotavirus (Figura 57B y C).

En vista de la ausencia de respuesta inmune luego de las inmunizaciones por las vías oral e intranasal con L. lactis NZ9000/pCWA:VP6, se decidió inmunizar ratones por vía subcutánea de manera de verificar la capacidad inmunogénica de VP6-CWA expresada por L. lactis. Adicionalmente, se incrementó el número de ratones por grupo dada la variabilidad observada en los experimentos anteriores.

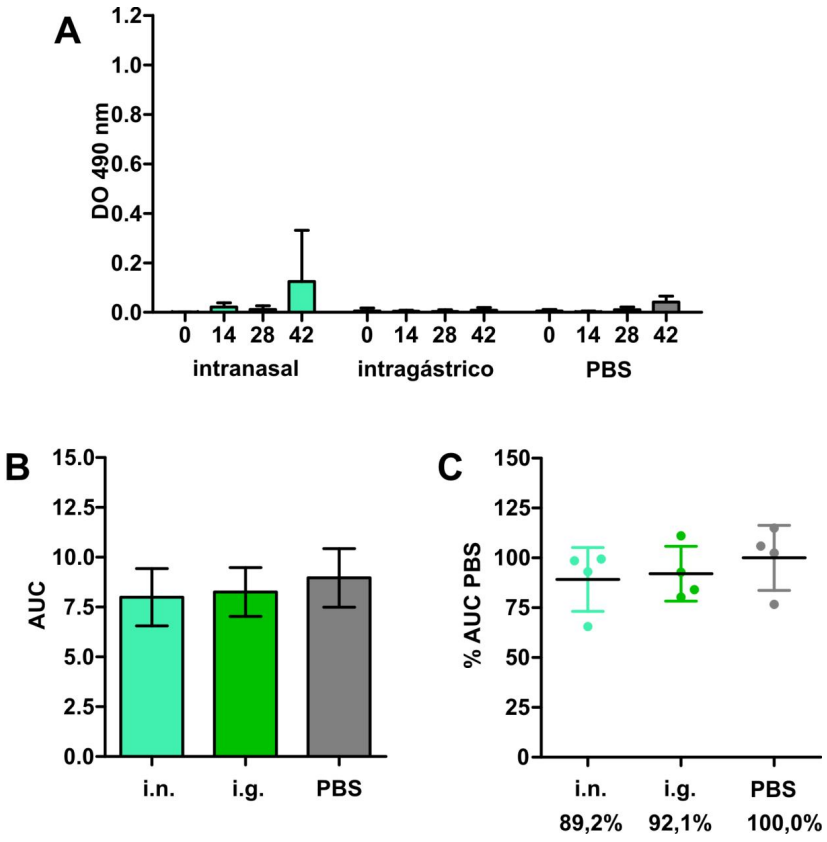


Figura 57. Resultados obtenidos durante el experimento 2.

A. El gráfico muestra los niveles de IgG específica anti rotavirus determinados por ELISA en diluciones 1/100 de los sueros de los ratones inmunizados con L. lactis. En el eje horizontal se indican los días post inmunización (dpi) y debajo el inmunógeno recibido por cada grupo de ratones. Las barras representan la DO490 promedio para cada grupo y las barras de error representan la desviación estándar. B. Área bajo la curva de excreción promedio para cada grupo de ratones. C. Porcentaje del área bajo la curva promedio del grupo PBS para cada grupo de ratones, el valor promedio se indica bajo el nombre del grupo en el eje horizontal. En todos los casos las barras de error representan la desviación estándar.

Resultados del experimento 3

Se inmunizaron grupos de 10 ratones con L. lactis NZ9000/pCWA:VP6 inducido, L. lactis NZ9000 libre de plásmido o PBS. En este caso se administraron 109 CFU por vía

subcutánea de acuerdo a un cronograma de 3 dosis separadas por 2 semanas. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 58.

Los sueros de los ratones pertenecientes a los grupos control inmunizados con L. lactis NZ9000 libre de plásmido o PBS resultaron negativos para IgG anti rotavirus por ELISA. Los niveles de IgG específica anti rotavirus en ratones inmunizados con L. lactis NZ9000/pCWA:VP6 por vía subcutánea demostraron un marcado aumento con respecto a los resultados obtenidos en los experimentos anteriores. En este grupo, las muestras de suero fueron positivas para IgG anti rotavirus a partir del día 28 (Figura 58A). El título más alto se alcanzó luego de la tercera inmunización y fue en promedio, 2.280 (intervalo de confianza 95%: 1.000-3.560). La especificidad de estos anticuerpos se pudo confirmar por Western blot (Figura 58B). Estos resultados indicaron que los anticuerpos específicos anti rotavirus en las muestras de suero de los ratones inmunizados con L. lactis NZ9000/pCWA:VP6 se encontraban dirigidos contra VP6, mientras que los sueros de ratones pertenecientes a los grupos control no reaccionaron con las proteínas de rotavirus. No se detectó IgA anti rotavirus por ELISA ni Western blot en ninguna de las muestras.

Los resultados correspondientes al desafío con rotavirus mostraron que el único grupo de ratones que presentó protección parcial significativa (29,7 %, $p<0,05$) fue el inmunizado con L. lactis NZ9000/pCWA:VP6. En conjunto, estos resultados demuestran que a pesar de que la vía de administración subcutánea no es la ideal para inducir una respuesta inmune de mucosas y que la producción de un antígeno heterólogo anclado a la pared de L. lactis es generalmente menos eficiente en comparación a la producción intracelular165, la cantidad de VP6 producida fue suficiente para inducir una respuesta inmune humoral específica y parcialmente protectora frente al desafío con rotavirus.

En resumen, y como puede deducirse a partir de los bajos niveles de expresión detectados por SDS-PAGE y Western blot (Figura 53A) y la ausencia de inmunogenicidad al administrar a ratones por vía oral hasta 1010 CFU de L. lactis NZ9000/pCWA:VP6 en repetidas dosis (Figura 57), la cantidad de VP6 expresada es insuficiente para inducir una respuesta inmune detectable tanto sistémica como en mucosas. Por estos motivos, podría ser necesario incrementar los niveles expresión de esta proteína para obtener una mejor respuesta inmune y protectora a nivel de la mucosa intestinal163, 211.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

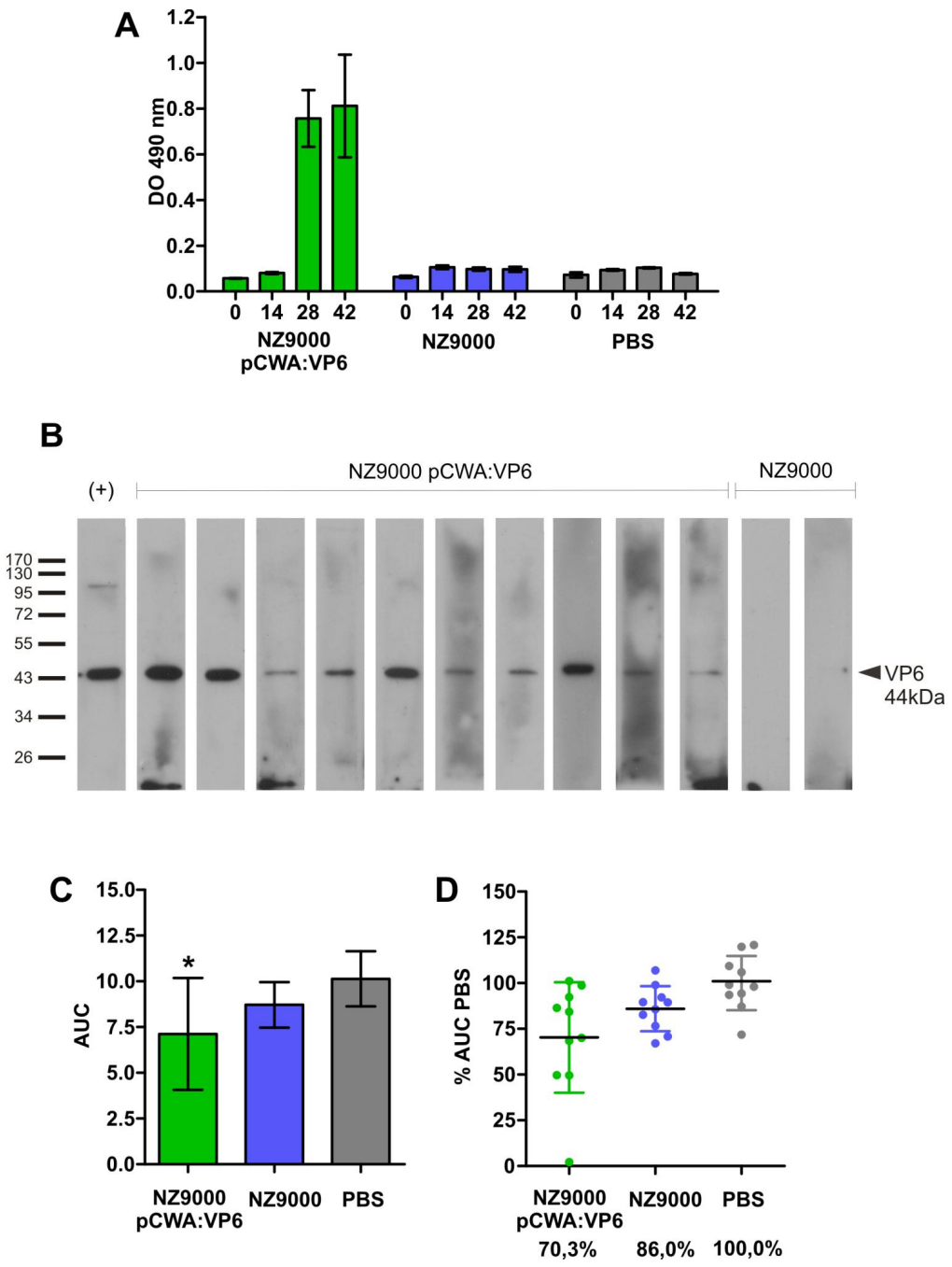


Figura 58. Resultados obtenidos durante el experimento 3.

A. El gráfico muestra los niveles de IgG específica anti rotavirus determinados por ELISA en diluciones 1/100 de los sueros de los ratones inmunizados con L. lactis. En el eje horizontal se indican los días post inmunización (dpi) y debajo el inmunógeno recibido por cada grupo de ratones. Las barras representan la DO490 promedio para cada grupo y las barras de error representan la desviación estándar. B. Las proteínas de rotavirus cepa RRV se separaron por PAGE y se transfirieron a membranas a partir de las que se obtuvieron calles individuales. Éstas se emplearon para analizar las muestras obtenidas de ratones inmunizados los distintos vectores amplicón que se indican en la parte superior de cada panel. Cada calle fue incubada con muestras de suero 1/100 para la determinación de IgG anti rotavirus. (+): Se empleó suero policlonal anti RRV como control positivo de IgG anti rotavirus. C. Área bajo la curva de excreción promedio para cada grupo de ratones. D. Porcentaje del área bajo la curva promedio del grupo PBS para cada grupo de ratones, el valor promedio se indica bajo el nombre del grupo en el eje horizontal. En todos los casos las barras de error representan la desviación estándar. *: $p<0,05$.

Conclusiones

Las bacterias del ácido láctico (BAL) comprenden un grupo importante de microorganismos industriales que se emplean para la fermentación y preservación de un amplio rango de productos alimenticios. El hecho de que ya se haya estudiado en profundidad la fisiología y la genética de estas bacterias explica su potencial utilidad en diversas aplicaciones, entre ellas, su uso como vehículos para el delivery de moléculas biológicamente activas tales como enzimas, antígenos o drogas terapéuticas en humanos y animales. En particular, uno de los campos más investigados y desafiantes es el uso de BAL como vehículos de delivery antigénico para la inmunización vía mucosas. En este sentido, como vectores vacunales para rotavirus, se presentarían como una alternativa más segura y económica a las estrategias actuales basadas en el patógeno viral atenuado.

En esta cuarta parte de la tesis, se desarrolló un vector bacteriano basado en L. lactis que expresa la proteína de rotavirus VP6 con el objetivo de evaluarlo en el modelo de ratón adulto de infección por rotavirus. Los resultados obtenidos hasta el momento con L. lactis NZ9000/pCWA:VP6 indicaron que la proteína de fusión VP6-CWA se expresa eficientemente y se localiza en la pared celular. Pudo demostrarse la inducción de anticuerpos específicos anti VP6 en los sueros de los ratones inmunizados con este vector bacteriano, lo que demuestra la inmunogenicidad de la proteína expresada. Sin embargo, utilizando la versión actual del vector, esta respuesta sólo se obtuvo por administración subcutánea de L. lactis y no por las dos vías de mucosas evaluadas (oral y nasal). De manera lógica, la administración oral sería la adecuada para inducir una respuesta en mucosas frente a este tipo de patógeno. A pesar de esto, los resultados obtenidos sientan las bases para continuar la optimización de la expresión de manera de incrementar la cantidad de VP6 expresada y expuesta en la superficie de L. lactis con el objetivo de inducir una respuesta inmune local y protectora a nivel de la mucosa gastrointestinal.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

La presente tesis fue desarrollada alrededor de dos temas principales relacionados con los rotavirus. El primero de ellos, la epidemiología de las cepas circulantes en el Gran Buenos Aires entre los años 2004 y 2007, contribuyó a la continuación de los trabajos de vigilancia epidemiológica de rotavirus iniciados en el año 1996. Durante el período estudiado, la incidencia de rotavirus fue de 19,7 % y la mayoría de las muestras positivas correspondieron a pacientes menores de 3 años. La tipificación de los genotipos G y P permitió observar fluctuaciones marcadas en la prevalencia de los mismos durante las distintas temporadas estudiadas. En general, los principales tipos G detectados fueron G2 y G9, mientras que los principales tipos P detectados fueron P[8] y P[4]. Estos resultados contribuyen a establecer el patrón natural de fluctuación de las frecuencias de genotipos en una misma área. Asimismo, otro dato importante fue el porcentaje de infecciones mixtas detectadas alcanzó valores promedio de 17,9 %. Para comprender la evolución, detectar la emergencia de variantes inusuales y predecir las posibilidades de reemplazo de los tipos circulantes, es necesario mantener una vigilancia de las cepas de rotavirus circulantes en la población, lo cual se torna particularmente importante ante la posible introducción masiva de una vacuna contra rotavirus. Esta información permite monitorear el impacto de la vacuna en cuanto a presiones de selección y el reemplazo de las cepas circulantes, así como determinar el grado de protección cruzada frente a distintos genotipos de rotavirus.

Analizando los datos de circulación de genotipos en el Gran Buenos Aires obtenidos específicamente para esta tesis en conjunto con los de los 17 años de seguimiento de nuestro laboratorio es posible observar los frecuentes reemplazos de genotipos de este virus a lo largo del tiempo. Teniendo en cuenta esta descripción local que concuerda con otros seguimientos de largo plazo en todo el mundo es importante resaltar que las vacunas actuales representan una limitada cantidad de genotipos. Si bien no está claro hasta qué punto es relevante la capacidad de cada una de estas vacunas para proteger en forma cruzada contra serotipos no incluídos en la formulación, la información más reciente induce a creer que la misma es de alguna manera limitada. La alta incidencia y la inédita persistencia de cepas G2P[4] en nuestra casuística desde 2004 podría estar relacionada con la vacunación masiva con cepas de tipo G1P[8] en la mayoría de los países de Sudamérica incluyendo Brasil desde 2006. Los factores determinantes de este sesgo probablemente anómalo podrían ser que los dos tipos de cepas pertenecen a genogrupos diferentes y que sus proteínas de superficie corresponden a genotipos G y P distintos.

Los datos de tipo epidemiológico con respecto a la circulación natural de genotipos y la influencia de la introducción de vacunas orientan a los investigadores para proponer nuevas aproximaciones profilácticas. En este sentido, un primer paso obligado es la experimentación con modelos animales. Uno de los más versátiles, útiles y económicos para la investigación de vacunas contra rotavirus es el modelo murino adulto de infección. Uno de los objetivos más importantes del presente trabajo fue la puesta a punto de este modelo en nuestro laboratorio, que de ahora en más permitirá la evaluación, no sólo de nuevos modelos de vacunas, sino también nuevos tipos de

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

adyuvantes, alimentos funcionales e incluso algunos aspectos básicos de la respuesta inmune y hasta alternativas terapéuticas. De esta forma, la segunda parte de esta tesis comprende la puesta a punto del modelo murino de infección por rotavirus de manera de disponer de un modelo animal que permita realizar desafíos con rotavirus para determinar el grado de protección y la respuesta inmune específica inducida por distintos inmunógenos.

La puesta a punto del modelo animal involucró la generación de stocks virales adecuados para el desafío, la obtención de preparaciones antigénicas altamente purificadas, la producción de anticuerpos poli y monoclonales y la puesta a punto de los diversos ensayos de ELISA utilizados para la detección de anticuerpos específicos y antígenos de rotavirus. Estos últimos permitieron detectar con alta sensibilidad variaciones significativas de excreción viral post-desafío y la producción de anticuerpos sistémicos y de mucosa de los distintos isotipos. La especificidad de los anticuerpos y las niveles de expresión heteróloga de los distintos vectores fueron analizadas por ensayos de Western blot basados también en las preparaciones de antígenos y anticuerpos antedichas. Para nuestro laboratorio esto abre la posibilidad de implementar o colaborar con cualquier línea de de investigación que abarque al diseño y evaluación de modelos de vacunas contra rotavirus entre otros temas relacionados como se menciona arriba.

En el contexto del trabajo presentado aquí se empleó el modelo murino para evaluar, tanto vectores vacunales virales como bacterianos que expresan proteínas de rotavirus, lo cual se describió en la tercera y cuarta partes de la tesis. En particular se describe su utilización para evaluar la inmunogenicidad y protección inducida por distintos tipo de vectores basados en HSV-1 y Lactococcus lactis.

La capacidad inmunogénica y protectora de vectores basados en HSV-1 de tipo amplicón fueron el objeto principal de estudio de la tercera parte aunque, en el contexto del proyecto internacional que le dio marco, otras construcciones fueron evaluadas y utilizadas. Si bien inicialmente se propuso la prueba de varios tipos de vectores herpéticos, por distintas razones como la aparente toxicidad de la proteína transgénica o la baja producción de ciertos diseños, el tipo amplicón fue el único que pudo ser testeado en varias versiones y dosis. También, en las últimas versiones ensayadas, pudo evaluarse una construcción con mejoras en el nivel de expresión. Varias conclusiones pueden derivarse de estos experimentos: i) en vectores expresando distintas proteínas, los niveles de expresión decaen de acuerdo a su posición proximal a distal del extremo 5'; ii) la inmunogenicidad de la proteína transgénica depende de la expresión y no del antígeno preformado como lo demuestran los experimentos controlados con vector inactivado por BEI; iii) los niveles de expresión se correlacionan con la inmunogenicidad sistémica determinada como IgG sérica; iv) los niveles de protección no se correlacionan con la inmunogenicidad sistémica determinada como IgG sérica; v) los vectores capaces de producir partículas contienen al menos VP2 y VP6; vi) para los vectores capaces de inducir protección fue posible detectar IgA anti VP6 en materia fecal previo al desafío; vii) para los vectores capaces de inducir protección fue posible demostrar la formación de VLPs in vitro.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Entre los resultados de los experimentos de inmunogenicidad y protección inducida por los vectores amplicón fue notable que, de forma consistente, los vectores capaces de formar partículas (VLPs) fueron los que además generaron protección significativa independientemente de la inmunogenicidad. Por ejemplo, los títulos más altos de anticuerpos séricos fueron observados con el vector que expresa sólo VP6 aunque en este caso no fue posible detectar VLPs in vitro ni hubo protección significativa en el modelo murino. Sin embargo, los vectores que codificaron las proteínas VP6 y VP2 de rotavirus fueron capaces de inducir la formación de VLPs de rotavirus en líneas celulares y, al ser administrados por vía intramuscular en ratones, demostraron ser inmunogénicos y parcialmente protectores frente a un desafío con rotavirus. Ambas características también se observaron para las construcciones que incluyeron VP7 aunque la protección parece ser independiente de la inclusión de esa proteína en las VLPs ya que los ensayos in vitro no la detectan en las partículas y porque la protección se manifestó tanto con construcciones basadas en RRV como en Wa (los serotipos G son distintos entre estas cepas y distintos a la cepa de desafío). En forma destacable, la mejora en los niveles de expresión y en la capacidad de formar VLPs de la última versión basada en Wa (con proteínas de rotavirus humano) generó el vector con mayor porcentaje de protección. Tomados en conjunto los resultados podrían interpretarse como que la protección es debida a los anticuerpos IgA anti VP6 a nivel intestinal detectados en MF. La síntesis de estos anticuerpos sería local ya que no fue posible detectar IgA específica en suero. Por otro lado, la aparición de estos anticuerpos y la consiguiente protección sólo se observó con la inoculación de vectores capaces de generar VLPs por lo que se podría especular con que existe alguna célula presentadora que toma este tipo de partículas en el sitio de inoculación o en los ganglios linfoides drenantes y genera presentación y respuesta en estructuras linfoides de mucosa intestinal. Especulaciones similares se han efectuado para explicar respuestas protectoras de este tipo luego de la inmunización con partículas inactivadas en el modelo murino e incluso se han hallado indicios de que el tipo celular presentador corresponde a linfocitos B. La IgA anti VP6 ha sido un correlato importante de protección en muchos experimentos utilizando el modelo murino y aunque la misma se ha detectado y correlacionado con protección en nuestros estudios, es posible que otros mecanismos también contribuyan ya que en este modelo se han observado distintos efectores dependiendo del inmunógeno, adyuvante, la vía de inoculación y aún, la fuente y grado de pureza de las preparaciones. Por ejemplo, mientras que la protección inducida por vacunas a subunidad es dependiente solamente de linfocitos T CD4, lo mismo no se aplica a los experimentos con rotavirus atenuados.

En modelos testeados previamente usando partículas de rotavirus inactivadas, VLPs o DNA para la inmunización, la ruta parenteral probó ser efectiva aunque en todos los casos fue necesario un adyuvante para inducir protección. En este sentido es de resaltar que en nuestra experiencia los vectores amplicón no requirieron aditivos para producir el mismo efecto. En estudios de continuación será importante caracterizar los sitios de inducción de la respuesta y los efectores inmunes involucrados en la protección. Las respuestas locales humorales y celulares mediadas por citoquinas o respuestas citotóxicas y la duración de la memoria inmunológica deberán ser

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

establecidas. Asimismo, nuevos vectores incluyendo sets diferentes de proteínas estructurales y no estructurales y la mejora de codones y posición de genes para optimizar la expresión pueden generar respuestas más eficientes y formar parte de dichos estudios.

En la última parte de este trabajo, se desarrolló un vector basado en L. lactis que expresa la proteína VP6 de rotavirus en su superficie. En este caso en particular se eligió la proteína VP6 como antígeno considerando que a pesar de que los anticuerpos dirigidos contra esta proteína no están asociados con la clásica actividad neutralizante, se han asociado con la inducción de protección en muchos estudios. Los resultados obtenidos indicaron que la proteína VP6 se expresó eficientemente y se presentó correctamente en la superficie bacteriana anclada a la pared. Las primeras inmunizaciones en el modelo murino permitieron demostrar la inmunogenicidad de la proteína expresada al administrar L. lactis por vía subcutánea. A pesar de que la producción de antígenos anclados a la pared celular de L. lactis es, en general, menos eficiente que la producción intracelular, los resultados obtenidos indican que la cantidad de VP6 producida por L. lactis recombinante fue suficiente para inducir una respuesta humoral específica contra rotavirus.

Sin embargo, la inoculación de ratones por la vía oral o intranasal no arrojó los mismos resultados. En este sentido, se considera que el limitante para inducir una respuesta inmune local por administración vía mucosas podría ser la cantidad de antígeno expresada por L. lactis y/o la ausencia de adyuvantes. Estas hipótesis serán el punto de partida de la optimización de este vector bacteriano con el objetivo de inducir protección frente al desafío con rotavirus. Dos alternativas serían la optimización de codones de acuerdo a la frecuencia de uso de L. lactis y la expresión de fragmentos de la proteína VP6, en lugar de la proteína entera. Asimismo, podrían ensayarse otros protocolos de inmunización, como por ejemplo la ingestión ad libitum de L. lactis. Adicionalmente, la coadministración de L. lactis que expresen adyuvantes de mucosas podría contribuir a la inducción de una respuesta inmune protectora local. Este punto parece particularmente relevante si se tiene en cuenta que la mayoría de los estudios que reportaron la inducción de anticuerpos IgA específicos requirieron la ruptura de la tolerancia que impera a nivel de las mucosas. Esto se logra cuando los patógenos colonizan y/o invaden la mucosa intestinal. Los lactococos presentan la ventaja de la seguridad, sin embargo su inocuidad representa un problema cuando se los emplea como delivery de antígenos con el objetivo de inducir una respuesta en la mucosa intestinal. Una estrategia sería incorporar uno o más PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Pattern) de manera de mimetizar las señales producidas durante la infección natural de microorganismos patogénicos y, de esta manera, superar la barrera de la tolerancia y potenciar la inmunogenicidad al estimular la respuesta inmune innata.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

BIBLIOGRAFÍA

1. Aarthi D, Ananda Rao K, Robinson R, Srinivasan VA: Validation of binary ethyleneimine (BEI) used as an inactivant for foot and mouth disease tissue culture vaccine. Biologicals 32(3), 153-156 (2004).
2. Abbaszadegan M, Stewart P, LeChevallier M: A strategy for detection of viruses in groundwater by PCR. Appl Environ Microbiol 65(2), 444-449 (1999).
3. Alfieri AA, Leite JP, Nakagomi O et al.: Characterization of human rotavirus genotype P[8]G5 from Brazil by probe-hybridization and sequence. Arch Virol 141(12), 2353-2364 (1996).
4. Amarilla A, Espinola EE, Galeano ME, Farina N, Russomando G, Parra GI: Rotavirus infection in the Paraguayan population from 2004 to 2005: high incidence of rotavirus strains with short electropherotype in children and adults. Med Sci Monit 13(7), CR333-337 (2007).
5. Andrew SM, Titus JA: Purification and fragmentation of antibodies. Current Protocols in Immunology 21:2.7.1-2.7.12, (1997).
6. Angel J, Franco MA, Greenberg HB: Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations. .at Rev Microbiol 5(7), 529-539 (2007).
7. Ansari SA, Sattar SA, Springthorpe VS, Wells GA, Tostowaryk W: Rotavirus survival on human hands and transfer of infectious virus to animate and nonporous inanimate surfaces. J Clin Microbiol 26(8), 1513-1518 (1988).
8. Araujo IT, Fialho AM, de Assis RM et al.: Rotavirus strain diversity in Rio de Janeiro, Brazil: characterization of VP4 and VP7 genotypes in hospitalized children. J Trop Pediatr 48(4), 214-218 (2002).
9. Argnani R, Lufino M, Manservigi M, Manservigi R: Replication-competent herpes simplex vectors: design and applications. Gene Ther 12 Suppl 1, S170-177 (2005).
10. Argüelles MH, Villegas GA, Castello A et al.: VP7 and VP4 genotyping of human group A rotavirus in Buenos Aires, Argentina. J Clin Microbiol 38(1), 252-259 (2000).
11. Baker TS, Olson NH, Fuller SD: Adding the third dimension to virus life cycles: three-dimensional reconstruction of icosahedral viruses from cryo-electron micrographs. Microbiol Mol Biol Rev 63(4), 862-922, table of contents (1999).
12. Barril PA, Martinez LC, Giordano MO et al.: Detection of group a human rotavirus G9 genotype circulating in Cordoba, Argentina, as early as 1980. J Med Virol 78(8), 1113-1118 (2006).
13. Bermudez-Humaran LG: Lactococcus lactis as a live vector for mucosal delivery of therapeutic proteins. Hum Vaccin 5(4), 264-267 (2009).
14. Bermudez-Humaran LG, Cortes-Perez NG, Le Loir Y et al.: An inducible surface presentation system improves cellular immunity against human papillomavirus type 16 E7 antigen in mice after nasal administration with recombinant lactococci. J Med Microbiol 53(Pt 5), 427-433 (2004).
15. Bermudez-Humaran LG, Kharrat P, Chatel JM, Langella P: Lactococci and lactobacilli as mucosal delivery vectors for therapeutic proteins and DNA vaccines. Microb Cell Fact 10 Suppl 1(2011), S4 (2011).
16. Bermudez-Humaran LG, Langella P, Miyoshi A et al.: Production of human papillomavirus type 16 E7 protein in Lactococcus lactis. Appl Environ Microbiol 68(2), 917-922 (2002).
17. Bertolotti-Ciarlet A, Ciarlet M, Crawford SE, Conner ME, Estes MK: Immunogenicity and protective efficacy of rotavirus 2/6-virus-like particles produced by a dual baculovirus expression vector and administered intramuscularly, intranasally, or orally to mice. Vaccine 21(25-26), 3885-3900 (2003).
18. Bhandari N, Sharma P, Taneja S et al.: A dose-escalation safety and immunogenicity study of live attenuated oral rotavirus vaccine 116E in infants: a randomized, double- blind, placebo-controlled trial. J Infect Dis 200(3), 421-429 (2009).
19. Bishop RF: Natural history of human rotavirus infection. Arch Virol Suppl 12, 119- 128 (1996).
20. Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ: Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. Lancet 2(7841), 1281-1283 (1973).
21. Bishop RF, Unicomb LE, Barnes GL: Epidemiology of rotavirus serotypes in Melbourne, Australia, from 1973 to 1989. J Clin Microbiol 29(5), 862-868 (1991).
22. Black RE, Cousens S, Johnson HL et al.: Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. Lancet 375(9730), 1969-1987 (2010).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

23. Blutt SE, Matson DO, Crawford SE et al.: Rotavirus antigenemia in children is associated with viremia. PLoS Med 4(4), e121 (2007).
24. Bok K, Castagnaro N, Borsa A et al.: Surveillance for rotavirus in Argentina. J Med Virol 65(1), 190-198 (2001).
25. Bomsel M, Alfsen A: Entry of viruses through the epithelial barrier: pathogenic trickery. .at Rev Mol Cell Biol 4(1), 57-68 (2003).
26. Boom JA, Sahni LC, Payne DC et al.: Symptomatic infection and detection of vaccine and vaccine-reassortant rotavirus strains in 5 children: a case series. J Infect Dis 206(8), 1275-1279 (2012).
27. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J: Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J Clin Microbiol 28(3), 495-503 (1990).
28. Borges AM, Dias e Souza M, Fiaccadori FS, Cardoso D: Monitoring the circulation of rotavirus among children after the introduction of the Rotarix vaccine in Goiania, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 106(4), 499-501 (2011).
29. Bowen MD, Payne DC: Rotavirus vaccine-derived shedding and viral reassortants. Expert Rev Vaccines 11(11), 1311-1314 (2012).
30. Bresee JS, Glass RI, Ivanoff B, Gentsch JR: Current status and future priorities for rotavirus vaccine development, evaluation and implementation in developing countries. Vaccine 17(18), 2207-2222 (1999).
31. Brockman MA, Knipe DM: Herpes simplex virus vectors elicit durable immune responses in the presence of preexisting host immunity. J Virol 76(8), 3678-3687 (2002).
32. Brun A, Barcena J, Blanco E et al.: Current strategies for subunit and genetic viral veterinary vaccine development. Virus Res 157(1), 1-12 (2011).
33. Burns JW, Krishnaney AA, Vo PT, Rouse RV, Anderson LJ, Greenberg HB: Analyses of homologous rotavirus infection in the mouse model. Virology 207(1), 143-153 (1995).
34. Burns JW, Siadat-Pajouh M, Krishnaney AA, Greenberg HB: Protective effect of rotavirus VP6-specific IgA monoclonal antibodies that lack neutralizing activity. Science 272(5258), 104-107 (1996).
35. Carmona RC, Timenetsky Mdo C, Morillo SG, Richtzenhain LJ: Human rotavirus serotype G9, Sao Paulo, Brazil, 1996-2003. Emerg Infect Dis 12(6), 963-968 (2006).
36. Carvalho-Costa FA, Araujo IT, Santos de Assis RM et al.: Rotavirus genotype distribution after vaccine introduction, Rio de Janeiro, Brazil. Emerg Infect Dis 15(1), 95-97 (2009).
37. Carvalho-Costa FA, Volotao Ede M, de Assis RM et al.: Laboratory-based rotavirus surveillance during the introduction of a vaccination program, Brazil, 2005-2009. Pediatr Infect Dis J 30(1 Suppl), S35-41 (2011).
38. Castello A, Argüelles MH, Glikmann G: Epidemiological aspects of rotavirus infections in Argentina. In: Genomic diversity and molecular epidemiology of rotaviruses, Kobayashi N (Ed.). Research Signpost, India 25-38 (2003).
39. Castello AA, Arguelles MH, Rota RP et al.: Molecular epidemiology of group A rotavirus diarrhea among children in Buenos Aires, Argentina, from 1999 to 2003 and emergence of the infrequent genotype G12. J Clin Microbiol 44(6), 2046-2050 (2006).
40. Castello AA, Arvay ML, Glass RI, Gentsch J: Rotavirus strain surveillance in Latin America: a review of the last nine years. Pediatr Infect Dis J 23(10 Suppl), S168-172 (2004).
41. Castello AA, Nakagomi T, Nakagomi O et al.: Characterization of genotype P[9]G12 rotavirus strains from Argentina: high similarity with Japanese and Korean G12 strains. J Med Virol 81(2), 371-381 (2009).
42. CDC: Withdrawal of rotavirus vaccine recommendation. Centers for Disease Control.
MMWR Morb Mortal Wkly Rep 48(43), 1007 (1999).
43. Ciarlet M, Conner ME: Evaluation of rotavirus vaccines in small animal models. Methods Mol Med 34, 147-187 (2000).
44. Cilli A, Luchs A, Morillo SG, Costa FF, Carmona Rde C, Timenetsky Mdo C: Characterization of rotavirus and norovirus strains: a 6-year study (2004-2009). J Pediatr (Rio J) 87(5), 445-449 (2011).
45. Clark HF, Hoshino Y, Bell LM et al.: Rotavirus isolate WI61 representing a presumptive new human serotype. J Clin Microbiol 25(9), 1757-1762 (1987).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

46. Coffin SE, Clark SL, Bos NA, Brubaker JO, Offit PA: Migration of antigen-presenting B cells from peripheral to mucosal lymphoid tissues may induce intestinal antigen- specific IgA following parenteral immunization. J Immunol 163(6), 3064-3070 (1999).
47. Coffin SE, Moser CA, Cohen S, Clark HF, Offit PA: Immunologic correlates of protection against rotavirus challenge after intramuscular immunization of mice. J Virol 71(10), 7851-7856 (1997).
48. Contin R, Arnoldi F, Campagna M, Burrone OR: Rotavirus NSP5 orchestrates recruitment of viroplasmic proteins. J Gen Virol 91(Pt 7), 1782-1793 (2010).
49. Cooper HM, Paterson Y: Production of antibodies. Current Protocols in Immunology 13:2.4.1-2.4.9, (1995).
50. Correia JB, Patel MM, Nakagomi O et al.: Effectiveness of monovalent rotavirus vaccine (Rotarix) against severe diarrhea caused by serotypically unrelated G2P[4] strains in Brazil. J Infect Dis 201(3), 363-369 (2010).
51. Corthesy B, Benureau Y, Perrier C et al.: Rotavirus anti-VP6 secretory immunoglobulin A contributes to protection via intracellular neutralization but not via immune exclusion. J Virol 80(21), 10692-10699 (2006).
52. Cuchet D, Potel C, Thomas J, Epstein AL: HSV-1 amplicon vectors: a promising and versatile tool for gene delivery. Expert Opin Biol Ther 7(7), 975-995 (2007).
53. Cunliffe NA, Bresee JS, Gentsch JR, Glass RI, Hart CA: The expanding diversity of rotaviruses. Lancet 359(9307), 640-642 (2002).
54. Cunliffe NA, Dove W, Bunn JE et al.: Expanding global distribution of rotavirus serotype G9: detection in Libya, Kenya, and Cuba. Emerg Infect Dis 7(5), 890-892 (2001).
55. Choi AH, Basu M, McNeal MM, Clements JD, Ward RL: Antibody-independent protection against rotavirus infection of mice stimulated by intranasal immunization with chimeric VP4 or VP6 protein. J Virol 73(9), 7574-7581 (1999).
56. D'Antuono A, Laimbacher AS, La Torre J et al.: HSV-1 amplicon vectors that direct the in situ production of foot-and-mouth disease virus antigens in mammalian cells can be used for genetic immunization. Vaccine 28(46), 7363-7372 (2010).
57. Dang DA, Nguyen VT, Vu DT et al.: A dose-escalation safety and immunogenicity study of a new live attenuated human rotavirus vaccine (Rotavin-M1) in Vietnamese children. Vaccine 30 Suppl 1, A114-121 (2012).
58. Das BK, Gentsch JR, Cicirello HG et al.: Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. J Clin Microbiol 32(7), 1820-1822 (1994).
59. de Ruyter PG, Kuipers OP, de Vos WM: Controlled gene expression systems for Lactococcus lactis with the food-grade inducer nisin. Appl Environ Microbiol 62(10), 3662-3667 (1996).
60. de Vos WM: Gene expression systems for lactic acid bacteria. Curr Opin Microbiol 2(3), 289-295 (1999).
61. Degiuseppe JI, Beltramino JC, Millan A, Stupka JA, Parra GI: Complete genome analyses of G4P[6] rotavirus detected in Argentinean children with diarrhoea provides evidence of interspecies transmission from swine. Clin Microbiol Infect, (2013).
62. Dennehy PH: Transmission of rotavirus and other enteric pathogens in the home. Pediatr Infect Dis J 19(10 Suppl), S103-105 (2000).
63. Dennehy PH: Treatment and prevention of rotavirus infection in children. Curr Infect Dis Rep 15(3), 242-250 (2013).
64. Desselberger U, Huppertz HI: Immune responses to rotavirus infection and vaccination and associated correlates of protection. J Infect Dis 203(2), 188-195 (2011).
65. Desselberger U, Manktelow E, Li W, Cheung W, Iturriza-Gomara M, Gray J: Rotaviruses and rotavirus vaccines. Br Med Bull 90, 37-51 (2009).
66. Desselberger U, Wolleswinkel-van den Bosch J, Mrukowicz J, Rodrigo C, Giaquinto C, Vesikari T: Rotavirus types in Europe and their significance for vaccination. Pediatr Infect Dis J 25(1 Suppl), S30-41 (2006).
67. Dieye Y, Usai S, Clier F, Gruss A, Piard JC: Design of a protein-targeting system for lactic acid bacteria. J Bacteriol 183(14), 4157-4166 (2001).
68. DiStefano DJ, Kraiouchkine N, Mallette L et al.: Novel rotavirus VP7 typing assay using a one-step reverse transcriptase PCR protocol and product sequencing and utility of the assay for epidemiological studies and strain characterization, including serotype subgroup analysis. J Clin Microbiol 43(12), 5876-5880 (2005).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

69. Eichwald C, Arnoldi F, Laimbacher AS et al.: Rotavirus viroplasm fusion and perinuclear localization are dynamic processes requiring stabilized microtubules. PLoS One 7(10), e47947 (2012).
70. Endara P, Trueba G, Solberg OD et al.: Symptomatic and subclinical infection with rotavirus P[8]G9, rural Ecuador. Emerg Infect Dis 13(4), 574-580 (2007).
71. Enouf V, Langella P, Commissaire J, Cohen J, Corthier G: Bovine rotavirus nonstructural protein 4 produced by Lactococcus lactis is antigenic and immunogenic. Appl Environ Microbiol 67(4), 1423-1428 (2001).
72. Epstein AL: Progress and prospects: biological properties and technological advances of herpes simplex virus type 1-based amplicon vectors. Gene Ther 16(6), 709-715 (2009).
73. Epstein AL, Marconi P, Argnani R, Manservigi R: HSV-1-derived recombinant and amplicon vectors for gene transfer and gene therapy. Curr Gene Ther 5(5), 445-458 (2005).
74. Estes MK, Cohen J: Rotavirus gene structure and function. Microbiol Rev 53(4), 410-449 (1989).
75. Estes MK, Kapikian AZ: Rotaviruses. In: Fields Virology, Fields BN, Knipe DM, Howley PM (Ed.). Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2007).
76. Fenaux M, Cuadras MA, Feng N, Jaimes M, Greenberg HB: Extraintestinal spread and replication of a homologous EC rotavirus strain and a heterologous rhesus rotavirus in BALB/c mice. J Virol 80(11), 5219-5232 (2006).
77. Feng N, Burns JW, Bracy L, Greenberg HB: Comparison of mucosal and systemic humoral immune responses and subsequent protection in mice orally inoculated with a homologous or a heterologous rotavirus. J Virol 68(12), 7766-7773 (1994).
78. Feng N, Vo PT, Chung D, Vo TV, Hoshino Y, Greenberg HB: Heterotypic protection following oral immunization with live heterologous rotaviruses in a mouse model. J Infect Dis 175(2), 330-341 (1997).
79. Fischer Walker CL, Black RE: Rotavirus vaccine and diarrhea mortality: quantifying regional variation in effect size. BMC Public Health 11 Suppl 3, S16 (2011).
80. Flewett TH, Bryden AS, Davies H: Letter: Virus particles in gastroenteritis. Lancet 2(7844), 1497 (1973).
81. Flint JS, Racaniello VR, Krug R: Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control. American Society Microbiology, Washington, USA. (1999).
82. Fraefel C, Marconi P, Epstein AL: Herpes simplex virus type 1-derived recombinant and amplicon vectors. Methods Mol Biol 737, 303-343 (2011).
83. Fraefel C, Song S, Lim F et al.: Helper virus-free transfer of herpes simplex virus type 1 plasmid vectors into neural cells. J Virol 70(10), 7190-7197 (1996).
84. Franco MA, Angel J, Greenberg HB: Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines. Vaccine 24(15), 2718-2731 (2006).
85. Franco MA, Greenberg HB: Role of B cells and cytotoxic T lymphocytes in clearance of and immunity to rotavirus infection in mice. J Virol 69(12), 7800-7806 (1995).
86. Fumian TM, Leite JP, Rose TL, Prado T, Miagostovich MP: One year environmental surveillance of rotavirus specie A (RVA) genotypes in circulation after the introduction of the Rotarix(R) vaccine in Rio de Janeiro, Brazil. Water Res 45(17), 5755-5763 (2011).
87. Fussenegger M, Moser S, Bailey JE: pQuattro vectors allow one-step multigene metabolic engineering and auto-selection of quattrocistronic artificial mammalian operons. Cytotechnology 28(1-3), 229-235 (1998).
88. Gareau MG, Sherman PM, Walker WA: Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. .at Rev Gastroenterol Hepatol 7(9), 503-514 (2010).
89. Geller AI, Keyomarsi K, Bryan J, Pardee AB: An efficient deletion mutant packaging system for defective herpes simplex virus vectors: potential applications to human gene therapy and neuronal physiology. Proc .atl Acad Sci U S A 87(22), 8950-8954 (1990).
90. Gentsch JR, Glass RI, Woods P et al.: Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 30(6), 1365-1373 (1992).
91. Gentsch JR, Laird AR, Bielfelt B et al.: Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. J Infect Dis 192 Suppl 1, S146-159 (2005).
92. Gentsch JR, Woods PA, Ramachandran M et al.: Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: implications for vaccine development. J Infect Dis 174 Suppl 1, S30-36 (1996).

93. Glass RI, Bresee J, Jiang B, Parashar U, Yee E, Gentsch J: Rotavirus and rotavirus vaccines. Adv Exp Med Biol 582, 45-54 (2006).
94. Goding JW: Introduction to Monoclonal Antibodies y Production of monoclonal antibodies en Monoclonal antibodies: principles and practice. Academic Press, (1996).
95. Gomez MM, de Mendonca MC, Volotao Ede M et al.: Rotavirus A genotype P[4]G2: genetic diversity and reassortment events among strains circulating in Brazil between 2005 and 2009. J Med Virol 83(6), 1093-1106 (2011).
96. Gonzalez SA, Affranchino JL: Assembly of double-layered virus-like particles in mammalian cells by coexpression of human rotavirus VP2 and VP6. J Gen Virol 76 (Pt 9), 2357-2360 (1995).
97. Gorantla S, Santos K, Meyer V et al.: Human dendritic cells transduced with herpes simplex virus amplicons encoding human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) gp120 elicit adaptive immune responses from human cells engrafted into NOD/SCID mice and confer partial protection against HIV-1 challenge. J Virol 79(4), 2124-2132 (2005).
98. Gouvea V: PCR detection of rotavirus. In: Diagnostic Molecular Microbiology, Principles and Applications, Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (Ed.). ASM press, Washington DC (1993).
99. Gouvea V, Brantly M: Is rotavirus a population of reassortants? Trends Microbiol 3(4), 159-162 (1995).
100. Gouvea V, de Castro L, Timenetsky MC, Greenberg H, Santos N: Rotavirus serotype G5 associated with diarrhea in Brazilian children. J Clin Microbiol 32(5), 1408-1409 (1994).
101. Gouvea V, Glass RI, Woods P et al.: Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. J Clin Microbiol 28(2), 276-282 (1990).
102. Gouvea V, Santos N, Timenetsky Mdo C: Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. J Clin Microbiol 32(5), 1338-1340 (1994).
103. Gurgel R.Q., Cuevas L.E., Vieira S.C.F. et al.: Predominance of rotavirus P[4]G2 in a vaccinated population, Brazil. Emerg Infect Dis 13(10), 1571-1573 (2007).
104. Harlow E, D. L: Monoclonal Antibodies. Cold Spring Harbor, New York, NY. (1988).
105. Hemming M, Vesikari T: Vaccine-derived human-bovine double reassortant rotavirus in infants with acute gastroenteritis. Pediatr Infect Dis J 31(9), 992-994 (2012).
106. Hocknell PK, Wiley RD, Wang X et al.: Expression of human immunodeficiency virus type 1 gp120 from herpes simplex virus type 1-derived amplicons results in potent, specific, and durable cellular and humoral immune responses. J Virol 76(11), 5565-5580 (2002).
107. Huard J, Feero WG, Watkins SC, Hoffman EP, Rosenblatt DJ, Glorioso JC: The basal lamina is a physical barrier to herpes simplex virus-mediated gene delivery to mature muscle fibers. J Virol 70(11), 8117-8123 (1996).
108. Ishida S, Feng N, Tang B, Gilbert JM, Greenberg HB: Quantification of systemic and local immune responses to individual rotavirus proteins during rotavirus infection in mice. J Clin Microbiol 34(7), 1694-1700 (1996).
109. Ishida SI, Feng N, Gilbert JM, Tang B, Greenberg HB: Immune responses to individual rotavirus proteins following heterologous and homologous rotavirus infection in mice. J Infect Dis 175(6), 1317-1323 (1997).
110. Iturriza Gomara M, Wong C, Blome S, Desselberger U, Gray J: Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. J Virol 76(13), 6596-6601 (2002).
111. Jiang B, Wang Y, Saluzzo JF, Bargeron K, Frachette MJ, Glass RI: Immunogenicity of a thermally inactivated rotavirus vaccine in mice. Hum Vaccin 4(2), 143-147 (2008).
112. Jiang JQ, He XS, Feng N, Greenberg HB: Qualitative and quantitative characteristics of rotavirus-specific CD8 T cells vary depending on the route of infection. J Virol 82(14), 6812-6819 (2008).
113. Justino MC, Linhares AC, Lanzieri TM et al.: Effectiveness of the monovalent G1P[8] human rotavirus vaccine against hospitalization for severe G2P[4] rotavirus gastroenteritis in Belem, Brazil. Pediatr Infect Dis J 30(5), 396-401 (2011).
114. Kobayashi N, Mahub Alam M, Kojima K, Ishino M, Sumi A: Genomic diversity and evolution of rotaviruses: An overview. In: Genomic diversity and molecular epidemiology of rotaviruses, Kobayashi N (Ed.). Research Signpost, India 75-89 (2003).
115. Kruisbeek AM: Isolation and fractionation of mononuclear cell populations. Current Protocols in Immunology 39:3.1.3, (2000).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

116. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. .ature 227(5259), 680-685 (1970).
117. Laimbacher AS, Fraefel C: Gene delivery using helper virus-free HSV-1 amplicon vectors. Curr Protoc .eurosci Chapter 4, Unit 4 14 (2012).
118. Lanata CF, Black RE, del Aguila R et al.: Protection of Peruvian children against rotavirus diarrhea of specific serotypes by one, two, or three doses of the RIT 4237 attenuated bovine rotavirus vaccine. J Infect Dis 159(3), 452-459 (1989).
119. Lauterbach H, Ried C, Epstein AL, Marconi P, Brocker T: Reduced immune responses after vaccination with a recombinant herpes simplex virus type 1 vector in the presence of antiviral immunity. J Gen Virol 86(Pt 9), 2401-2410 (2005).
120. Lavelle EC, O'Hagan DT: Delivery systems and adjuvants for oral vaccines. Expert Opin Drug Deliv 3(6), 747-762 (2006).
121. Lawton JA, Estes MK, Prasad BV: Comparative structural analysis of transcriptionally competent and incompetent rotavirus-antibody complexes. Proc .atl Acad Sci U S A 96(10), 5428-5433 (1999).
122. Le Loir Y, Azevedo V, Oliveira SC et al.: Protein secretion in Lactococcus lactis : an efficient way to increase the overall heterologous protein production. Microb Cell Fact 4(1), 2 (2005).
123. Le Loir Y, Nouaille S, Commissaire J, Bretigny L, Gruss A, Langella P: Signal peptide and propeptide optimization for heterologous protein secretion in Lactococcus lactis. Appl Environ Microbiol 67(9), 4119-4127 (2001).
124. Leite JP, Alfieri AA, Woods PA, Glass RI, Gentsch JR: Rotavirus G and P types circulating in Brazil: characterization by RT-PCR, probe hybridization, and sequence analysis. Arch Virol 141(12), 2365-2374 (1996).
125. Leite JP, Carvalho-Costa FA, Linhares AC: Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience: a review. Mem Inst Oswaldo Cruz 103(8), 745-753 (2008).
126. Lepage P, Vergison A: Impact of rotavirus vaccines on rotavirus disease. Expert Rev Anti Infect Ther 10(5), 547-561 (2012).
127. Li YJ, Ma GP, Li GW et al.: Oral vaccination with the porcine rotavirus VP4 outer capsid protein expressed by Lactococcus lactis induces specific antibody production. J Biomed Biotechnol 2010, 708460 (2010).
128. Linares DM, Kok J, Poolman B: Genome sequences of Lactococcus lactis MG1363 (revised) and NZ9000 and comparative physiological studies. J Bacteriol 192(21), 5806-5812 (2010).
129. Linhares AC, Gabbay YB, Mascarenhas JD et al.: Immunogenicity, safety and efficacy of tetravalent rhesus-human, reassortant rotavirus vaccine in Belem, Brazil. Bull World Health Organ 74(5), 491-500 (1996).
130. Linhares AC, Stupka JA, Ciapponi A et al.: Burden and typing of rotavirus group A in Latin America and the Caribbean: systematic review and meta-analysis. Rev Med Virol, (2011).
131. Linhares AC, Verstraeten T, Wolleswinkel-van den Bosch J, Clemens R, Breuer T: Rotavirus serotype G9 is associated with more-severe disease in Latin America. Clin Infect Dis 43(3), 312-314 (2006).
132. Logvinoff C, Epstein AL: A novel approach for herpes simplex virus type 1 amplicon vector production, using the Cre-loxP recombination system to remove helper virus. Hum Gene Ther 12(2), 161-167 (2001).
133. Lopez T, Camacho M, Zayas M et al.: Silencing the morphogenesis of rotavirus. J Virol 79(1), 184-192 (2005).
134. Luchs A, Morillo SG, Ribeiro CD et al.: Gastroenteritis outbreak due to G2P[4] rotavirus and GII norovirus at two correctional facilities in Brazil, 2010. J Clin Virol 51(3), 213-214 (2011).
135. Mandile MG, Esteban LE, Mistchenko A, Argüelles MH, Glikmann G, Castello AA: Surveillance of group A Rotavirus in Buenos Aires 2008-2011, long lasting circulation of G2P[4] strains possibly linked to massive monovalent vaccination in the region. (no publicado).
136. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J: Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1982).
137. Mantis NJ, Bry L: The intestinal epithelium: the interface between host and pathogen. In: Immunity against mucosal pathogens, Vajdy M (Ed.). Springer, Davis, CA, United States (2008).
138. Marconi P, Argnani R, Epstein AL, Manservigi R: HSV as a vector in vaccine development and gene therapy. Adv Exp Med Biol 655, 118-144 (2009).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

139. Marelli B, Perez AR, Banchio C, de Mendoza D, Magni C: Oral immunization with live Lactococcus lactis expressing rotavirus VP8 subunit induces specific immune response in mice. J Virol Methods 175(1), 28-37 (2011).
140. Martinez M, Amarilla AA, Galeano ME et al.: Predominance of rotavirus G2P[4] and emergence of G12P[9] strains in Asuncion, Paraguay, 2006-2007. Arch Virol 155(4), 525-533 (2010).
141. Mascarenhas JD, Lima CS, de Oliveira DS et al.: Identification of two sublineages of genotype G2 rotavirus among diarrheic children in Parauapebas, Southern Para State, Brazil. J Med Virol 82(4), 712-719 (2010).
142. Matthijnssens J, Bilcke J, Ciarlet M et al.: Rotavirus disease and vaccination: impact on genotype diversity. Future Microbiol 4(10), 1303-1316 (2009).
143. Matthijnssens J, Ciarlet M, Heiman E et al.: 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(7), 3204-3219 (2008).
144. Matthijnssens J, Ciarlet M, McDonald SM et al.: Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). Arch Virol 156(8), 1397-1413 (2011).
145. Matthijnssens J, Heylen E, Zeller M, Rahman M, Lemey P, Van Ranst M: Phylodynamic analyses of rotavirus genotypes G9 and G12 underscore their potential for swift global spread. Mol Biol Evol 27(10), 2431-2436 (2010).
146. Matthijnssens J, Nakagomi O, Kirkwood CD, Ciarlet M, Desselberger U, Van Ranst M: Group A rotavirus universal mass vaccination: how and to what extent will selective pressure influence prevalence of rotavirus genotypes? Expert Rev Vaccines 11(11), 1347-1354 (2012).
147. Matthijnssens J, Van Ranst M: Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans. Curr Opin Virol 2(4), 426-433 (2012).
148. Mc Cullough KC, Spier RE: Making hybridomas (hybridoma technology) en Monoclonal antibodies in biology and biotechnology: theoretical and practical aspects. Cambridge University Press, Cambridge. (1990).
149. McNeal MM, Barone KS, Rae MN, Ward RL: Effector functions of antibody and CD8+ cells in resolution of rotavirus infection and protection against reinfection in mice. Virology 214(2), 387-397 (1995).
150. McNeal MM, Broome RL, Ward RL: Active immunity against rotavirus infection in mice is correlated with viral replication and titers of serum rotavirus IgA following vaccination. Virology 204(2), 642-650 (1994).
151. McNeal MM, Rae MN, Conner ME, Ward RL: Stimulation of local immunity and protection in mice by intramuscular immunization with triple- or double-layered rotavirus particles and QS-21. Virology 243(1), 158-166 (1998).
152. McNeal MM, Rae MN, Ward RL: Evidence that resolution of rotavirus infection in mice is due to both CD4 and CD8 cell-dependent activities. J Virol 71(11), 8735-8742 (1997).
153. McNeal MM, Stone SC, Basu M et al.: Protection against rotavirus shedding after intranasal immunization of mice with a chimeric VP6 protein does not require intestinal IgA. Virology 346(2), 338-347 (2006).
154. Mechetner E: Development and characterization of mouse hybridomas. In: Methods in Molecular Biology, vol. 378: Monoclonal antibodies: methods and protocols, Albitar M (Ed.). Humana Press Inc., Totowa, NJ (1992).
155. Mercenier A, Muller-Alouf H, Grangette C: Lactic acid bacteria as live vaccines. Curr Issues Mol Biol 2(1), 17-25 (2000).
156. Mierau I, Kleerebezem M: 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in Lactococcus lactis. Appl Microbiol Biotechnol 68(6), 705-717 (2005).
157. Miyoshi A, Poquet I, Azevedo V et al.: Controlled production of stable heterologous proteins in Lactococcus lactis. Appl Environ Microbiol 68(6), 3141-3146 (2002).
158. Morello E, Bermudez-Humaran LG, Llull D et al.: Lactococcus lactis, an efficient cell factory for recombinant protein production and secretion. J Mol Microbiol Biotechnol 14(1-3), 48-58 (2008).
159. Moser CA, Cookinham S, Coffin SE, Clark HF, Offit PA: Relative importance of rotavirus-specific effector and memory B cells in protection against challenge. J Virol 72(2), 1108-1114 (1998).
160. Nakagomi O, Cunliffe NA: Rotavirus vaccines: entering a new stage of deployment. Curr Opin Infect Dis 20(5), 501-507 (2007).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

161. Nakagomi O, Nakagomi T, Akatani K, Ikegami N: Identification of rotavirus genogroups by RNA-RNA hybridization. Mol Cell Probes 3(3), 251-261 (1989).
162. Nakagomi T, Cuevas LE, Gurgel RG et al.: Apparent extinction of non-G2 rotavirus strains from circulation in Recife, Brazil, after the introduction of rotavirus vaccine. Arch Virol 153(3), 591-593 (2008).
163. Neutra MR, Kozlowski PA: Mucosal vaccines: the promise and the challenge. .at Rev Immunol 6(2), 148-158 (2006).
164. Nilsson M, von Bonsdorff CH, Weclewicz K, Cohen J, Svensson L: Assembly of viroplasm and virus-like particles of rotavirus by a Semliki Forest virus replicon. Virology 242(2), 255-265 (1998).
165. Norton PM, Brown HW, Wells JM, Macpherson AM, Wilson PW, Le Page RW: Factors affecting the immunogenicity of tetanus toxin fragment C expressed in Lactococcus lactis. FEMS Immunol Med Microbiol 14(2-3), 167-177 (1996).
166. Norton PM, Wells JM, Brown HW, Macpherson AM, Le Page RW: Protection against tetanus toxin in mice nasally immunized with recombinant Lactococcus lactis expressing tetanus toxin fragment C. Vaccine 15(6-7), 616-619 (1997).
167. Nouaille S, Ribeiro LA, Miyoshi A et al.: Heterologous protein production and delivery systems for Lactococcus lactis. Genet Mol Res 2(1), 102-111 (2003).
168. Nunez R, Fraefel C, Suter M, Nunez-Liman A, Liou HC, Ackerman M: Assessment of a cellular vaccination approach consisting of crawling dendritic cells (CDCs) transduced with HSV-1-Deltapac vectors. Immunol Res 30(1), 105-124 (2004).
169. O'Neal CM, Harriman GR, Conner ME: Protection of the villus epithelial cells of the small intestine from rotavirus infection does not require immunoglobulin A. J Virol 74(9), 4102-4109 (2000).
170. Oehmig A, Fraefel C, Breakefield XO: Update on herpesvirus amplicon vectors. Mol Ther 10(4), 630-643 (2004).
171. Palombo EA: Genetic analysis of Group A rotaviruses: evidence for interspecies transmission of rotavirus genes. Virus Genes 24(1), 11-20 (2002).
172. Parashar U, Steele D, Neuzil K et al.: Progress with rotavirus vaccines: summary of the Tenth International Rotavirus Symposium. Expert Rev Vaccines 12(2), 113-117 (2013).
173. Parashar UD, Gibson CJ, Bresse JS, Glass RI: Rotavirus and severe childhood diarrhea. Emerg Infect Dis 12(2), 304-306 (2006).
174. Parra GI, Espinola EE, Amarilla AA et al.: Diversity of group A rotavirus strains circulating in Paraguay from 2002 to 2005: detection of an atypical G1 in South America. J Clin Virol 40(2), 135-141 (2007).
175. Patel M, Glass RI, Jiang B, Santosham M, Lopman B, Parashar U: A Systematic Review of Anti-Rotavirus Serum IgA Antibody Titer as a Potential Correlate of Rotavirus Vaccine Efficacy. J Infect Dis, (2013).
176. Patel MM, de Oliveira LH, Bispo AM, Gentsch J, Parashar UD: Rotavirus P[4]G2 in a vaccinated population, Brazil. Emerg Infect Dis 14(5), 863-865 (2008).
177. Patton JT: Structure and function of the rotavirus RNA-binding proteins. J Gen Virol 76 (Pt 11), 2633-2644 (1995).
178. Pellet PE, Roizman B: The Family: Herpesviridae A Brief Introduction. In: Fields Virology, Fields BN, Knipe DM, Howley PM (Ed.). Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2007).
179. Perez CA, Eichwald C, Burrone O, Mendoza D: Rotavirus vp7 antigen produced by Lactococcus lactis induces neutralizing antibodies in mice. J Appl Microbiol 99(5),1158-1164 (2005).
180. Pesavento JB, Crawford SE, Estes MK, Prasad BV: Rotavirus proteins: structure and assembly. Curr Top Microbiol Immunol 309, 189-219 (2006).
181. Phan TG, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H: Genetic heterogeneity, evolution and recombination in emerging G9 rotaviruses. Infect Genet Evol 7(5), 656-663 (2007).
182. Pietruchinski E, Benati F, Lauretti F et al.: Rotavirus diarrhea in children and adults in a southern city of Brazil in 2003: distribution of G/P types and finding of a rare G12 strain. J Med Virol 78(9), 1241-1249 (2006).
183. Pontes DS, de Azevedo MS, Chatel JM, Langella P, Azevedo V, Miyoshi A: Lactococcus lactis as a live vector: heterologous protein production and DNA delivery systems. Protein Expr Purif 79(2), 165-175 (2011).
184. Prasad BV, Wang GJ, Clerx JP, Chiu W: Three-dimensional structure of rotavirus. J Mol Biol 199(2), 269-275 (1988).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

185. Rahman M: Molecular epidemiology of human group A rotaviruses. Faculteit Geneeskunde PhD, (2008).
186. Rahman M, Matthijnssens J, Yang X et al.: Evolutionary history and global spread of the emerging g12 human rotaviruses. J Virol 81(5), 2382-2390 (2007).
187.Rahman M, Sultana R, Podder G et al.: Typing of human rotaviruses: nucleotide mismatches between the VP7 gene and primer are associated with genotyping failure. Virol J 2, 24 (2005).
188. Rasband WS: ImageJ, United States National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, http://imagej.nih.gov/ij/. (1997-2012).
189. Reed LJ, Muench H: A simple method of estimating fifty percent endpoints. Am. J. Hygiene 27, 493-497 (1938).
190. Reimerink JH, Boshuizen JA, Einerhand AW et al.: Systemic immune response after rotavirus inoculation of neonatal mice depends on source and level of purification of the virus: implications for the use of heterologous vaccine candidates. J Gen Virol
88(Pt 2), 604-612 (2007).
191. Rennels MB, Glass RI, Dennehy PH et al.: Safety and efficacy of high-dose rhesus- human reassortant rotavirus vaccines--report of the National Multicenter Trial. United States Rotavirus Vaccine Efficacy Group. Pediatrics 97(1), 7-13 (1996).
192. Reuter MA, Hanniffy S, Wells JM: Expression and delivery of heterologous antigens using lactic acid bacteria. In: Methods in Molecular Medicine: Vaccine Protocols, Robinson A, Hudson MJ, Cranage MP (Ed.). Humana Press Inc., Totowa, NJ (2003).
193. Richardson V, Hernandez-Pichardo J, Quintanar-Solares M et al.: Effect of rotavirus vaccination on death from childhood diarrhea in Mexico. . Engl J Med 362(4), 299-
305 (2010).
194. Robinson K, Chamberlain LM, Lopez MC et al.: Mucosal and cellular immune responses elicited by recombinant Lactococcus lactis strains expressing tetanus toxin fragment C. Infect Immun 72(5), 2753-2761 (2004).
195. Robinson K, Chamberlain LM, Schofield KM, Wells JM, Le Page RW: Oral vaccination of mice against tetanus with recombinant Lactococcus lactis. .at
Biotechnol 15(7), 653-657 (1997).
196. Rodriguez-Diaz J, Montava R, Viana R, Buesa J, Perez-Martinez G, Monedero V: Oral immunization of mice with Lactococcus lactis expressing the rotavirus VP8* protein. Biotechnol Lett 33(6), 1169-1175 (2011).
197. Roizman B, Knipe DM, Whitley RJ: Herpes Simplex Viruses. In: Fields Virology, Fields BN, Knipe DM, Howley PM (Ed.). Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2007).
198. Ruiz-Palacios GM, Perez-Schael I, Velazquez FR et al.: Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. . Engl J Med 354(1), 11-22 (2006).
199. Saeki Y, Breakefield XO, Chiocca EA: Improved HSV-1 amplicon packaging system
using ICP27-deleted, oversized HSV-1 BAC DNA. Methods Mol Med 76, 51-60 (2003).
200. Saeki Y, Fraefel C, Ichikawa T, Breakefield XO, Chiocca EA: Improved helper virus-free packaging system for HSV amplicon vectors using an ICP27-deleted, oversized
HSV-1 DNA in a bacterial artificial chromosome. Mol Ther 3(4), 591-601 (2001).
201. Saeki Y, Ichikawa T, Saeki A et al.: Herpes simplex virus type 1 DNA amplified as bacterial artificial chromosome in Escherichia coli: rescue of replication-competent virus progeny and packaging of amplicon vectors. Hum Gene Ther 9(18), 2787-2794 (1998).
202. Samajdar S, Varghese V, Barman P et al.: Changing pattern of human group A rotaviruses: emergence of G12 as an important pathogen among children in eastern
India. J Clin Virol 36(3), 183-188 (2006).
203. Santos K, Duke CM, Rodriguez-Colon SM et al.: Effect of promoter strength on protein expression and immunogenicity of an HSV-1 amplicon vector encoding HIV-1 Gag. Vaccine 25(9), 1634-1646 (2007).

204. Santos K, Simon DA, Conway E et al.: Spatial and temporal expression of herpes simplex virus type 1 amplicon-encoded genes: implications for their use as immunization vectors. Hum Gene Ther 18(2), 93-105 (2007).
205. Santos N, Hoshino Y: Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. Rev Med Virol 15(1), 29-56 (2005).
206. Santos N, Volotao EM, Soares CC et al.: VP7 gene polymorphism of serotype G9 rotavirus strains and its impact on G genotype determination by PCR. Virus Res 93(1), 127-138 (2003).
207. Santos N, Volotao EM, Soares CC et al.: Rotavirus strains bearing genotype G9 or P[9] recovered from Brazilian children with diarrhea from 1997 to 1999. J Clin Microbiol 39(3), 1157-1160 (2001).
208. Santos N, Volotao EM, Soares CC, Campos GS, Sardi SI, Hoshino Y: Predominance of rotavirus genotype G9 during the 1999, 2000, and 2002 seasons among hospitalized children in the city of Salvador, Bahia, Brazil: implications for future vaccine strategies. J Clin Microbiol 43(8), 4064-4069 (2005).
209. Sena-Esteves M, Saeki Y, Fraefel C, Breakefield XO: HSV-1 amplicon vectors-- simplicity and versatility. Mol Ther 2(1), 9-15 (2000).
210. Smith IL, Hardwicke MA, Sandri-Goldin RM: Evidence that the herpes simplex virus immediate early protein ICP27 acts post-transcriptionally during infection to regulate gene expression. Virology 186(1), 74-86 (1992).
211. Society_for_Mucosal_Immunology: Principles of Mucosal Immunology Garland Science, New York. (2012).
212. Spaete RR, Frenkel N: The herpes simplex virus amplicon: a new eucaryotic defective-virus cloning-amplifying vector. Cell 30(1), 295-304 (1982).
213. Spaete RR, Frenkel N: The herpes simplex virus amplicon: analyses of cis-acting replication functions. Proc .atl Acad Sci U S A 82(3), 694-698 (1985).
214. Steele AD, Peenze I, de Beer MC et al.: Anticipating rotavirus vaccines: epidemiology and surveillance of rotavirus in South Africa. Vaccine 21(5-6), 354-360 (2003).
215. Strugnell RA, Wijburg OL: The role of secretory antibodies in infection immunity. .at Rev Microbiol 8(9), 656-667 (2010).
216. Sun M, Kong L, Wang X et al.: Coexpression of tyrosine hydroxylase, GTP cyclohydrolase I, aromatic amino acid decarboxylase, and vesicular monoamine transporter 2 from a helper virus-free herpes simplex virus type 1 vector supports high-level, long-term biochemical and behavioral correction of a rat model of Parkinson's disease. Hum Gene Ther 15(12), 1177-1196 (2004).
217. Svensson L, Sheshberadaran H, Vene S, Norrby E, Grandien M, Wadell G: Serum antibody responses to individual viral polypeptides in human rotavirus infections. J Gen Virol 68 (Pt 3), 643-651 (1987).
218. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S: MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol 24(8), 1596-1599 (2007).
219. Tang B, Gilbert JM, Matsui SM, Greenberg HB: Comparison of the rotavirus gene 6 from different species by sequence analysis and localization of subgroup-specific epitopes using site-directed mutagenesis. Virology 237(1), 89-96 (1997).
220. Taniguchi K, Urasawa S: Diversity in rotavirus genomes. Virology 6, 123-131 (1995).
221. Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Steele AD, Duque J, Parashar UD: 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis 12(2), 136-141 (2012).
222. Trask SD, McDonald SM, Patton JT: Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. .at Rev Microbiol 10(3), 165-177 (2012).
223. Trojnar E, Sachsenroder J, Twardziok S, Reetz J, Otto PH, Johne R: Identification of an avian group A rotavirus containing a novel VP4 gene with a close relationship to those of mammalian rotaviruses. J Gen Virol 94(Pt 1), 136-142 (2013).
224. Velazquez FR, Matson DO, Calva JJ et al.: Rotavirus infections in infants as protection against subsequent infections. . Engl J Med 335(14), 1022-1028 (1996).
225. Vesikari T, Joensuu J: Review of rotavirus vaccine trials in Finland. J Infect Dis 174 Suppl 1, S81-87 (1996).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

226. Vesikari T, Matson DO, Dennehy P et al.: Safety and efficacy of a pentavalent human- bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. . Engl J Med 354(1), 23-33 (2006).
227. Vesikari T, Ruuska T, Delem A, Andre FE, Beards GM, Flewett TH: Efficacy of two doses of RIT 4237 bovine rotavirus vaccine for prevention of rotavirus diarrhoea. Acta Paediatr Scand 80(2), 173-180 (1991).
228. Wade-Martins R, Smith ER, Tyminski E, Chiocca EA, Saeki Y: An infectious transfer and expression system for genomic DNA loci in human and mouse cells. .at Biotechnol 19(11), 1067-1070 (2001).
229. Wang X, Wiley RD, Evans TG, Bowers WJ, Federoff HJ, Dewhurst S: Cellular immune responses to helper-free HSV-1 amplicon particles encoding HIV-1 gp120 are enhanced by DNA priming. Vaccine 21(19-20), 2288-2297 (2003).
230. Wang Y, Mukherjee S, Fraefel C, Breakefield XO, Allen PD: Herpes simplex virus type 1 amplicon vector-mediated gene transfer to muscle. Hum Gene Ther 13(2), 261-273 (2002).
231. Ward RL: Possible mechanisms of protection elicited by candidate rotavirus vaccines as determined with the adult mouse model. Viral Immunol 16(1), 17-24 (2003).
232. Ward RL, McNeal MM, Sheridan JF: Development of an adult mouse model for studies on protection against rotavirus. J Virol 64(10), 5070-5075 (1990).
233. Ward RL, McNeal MM, Sheridan JF: Evidence that active protection following oral immunization of mice with live rotavirus is not dependent on neutralizing antibody. Virology 188(1), 57-66 (1992).
234. Wells JM, Mercenier A: Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. .at Rev Microbiol 6(5), 349-362 (2008).
235. Whitley RJ, Roizman B: Herpes simplex virus infections. Lancet 357(9267), 1513- 1518 (2001).
236. WHO: Rotavirus vaccines. WHO position paper - January 2013. Wkly Epidemiol Rec 88(5), 49-64 (2013).
237. Williams MB, Rose JR, Rott LS, Franco MA, Greenberg HB, Butcher EC: The memory B cell subset responsible for the secretory IgA response and protective humoral immunity to rotavirus expresses the intestinal homing receptor, alpha4beta7. J Immunol 161(8), 4227-4235 (1998).
238. Willis RA, Bowers WJ, Turner MJ et al.: Dendritic cells transduced with HSV-1 amplicons expressing prostate-specific antigen generate antitumor immunity in mice. Hum Gene Ther 12(15), 1867-1879 (2001).
239. Yang K, Wang S, Chang KO et al.: Immune responses and protection obtained with rotavirus VP6 DNA vaccines given by intramuscular injection. Vaccine 19(23-24), 3285-3291 (2001).
240. Yeager M, Dryden KA, Olson NH, Greenberg HB, Baker TS: Three-dimensional structure of rhesus rotavirus by cryoelectron microscopy and image reconstruction. J Cell Biol 110(6), 2133-2144 (1990).
241. Yuan L, Ward LA, Rosen BI, To TL, Saif LJ: Systematic and intestinal antibody-secreting cell responses and correlates of protective immunity to human rotavirus in a gnotobiotic pig model of disease. J Virol 70(5), 3075-3083 (1996).
242. Zeller M, Rahman M, Heylen E et al.: Rotavirus incidence and genotype distribution before and after national rotavirus vaccine introduction in Belgium. Vaccine 28(47), 7507-7513 (2010).
243. Zhang M, Zeng CQ, Morris AP, Estes MK: A functional NSP4 enterotoxin peptide secreted from rotavirus-infected cells. J Virol 74(24), 11663-11670 (2000).
244. Zheng BJ, Chang RX, Ma GZ et al.: Rotavirus infection of the oropharynx and respiratory tract in young children. J Med Virol 34(1), 29-37 (1991).

Para citar este documento

Esteban, Laura Emilia. (2015). Puesta a punto del modelo murino de infección por rotavirus y la evaluación de modelos de vacunas (Tesis de posgrado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina: Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto. Disponible en: http://ridaa.demo.unq.edu.ar