



---

---

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE  
MÉXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y  
RECURSOS NATURALES**

**CARACTERIZACIÓN DE LOS GENOTIPOS DE ROTAVIRUS EN  
CONEJOS EN EL ESTADO DE MÉXICO**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS  
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

**PRESENTA**

**M. en C.A. y R.N. EMMANUEL REYNOSO UTRERA**

**Dra. LINDA GUILIANA BAUTISTA GÓMEZ. DIRECTORA**

**Dr. JOSÉ SIMÓN MARTÍNEZ CASTAÑEDA. CODIRECTOR**

**Dr. SALVADOR FONSECA CORONADO. TUTOR ADJUNTO**

**Amecameca, Estado de México. Noviembre de 2020**

## Resumen

Rotavirus especie A (RVA) es considerado una de las principales causas de gastroenteritis viral aguda en humanos y animales jóvenes en todo el mundo, estando asociado a enfermedad diarreica deshidratante en granjas de producción animal. Son escasas las investigaciones que han centrado su objeto de estudio en caracterizar genéticamente a rotavirus infectante de conejos, o rotavirus cepa lapine (LRV), no obstante, los genotipos asociados a LRV han sido G3 (VP7) y P[14] y P[22] (VP4). En el presente trabajo de investigación, se realizó la caracterización genotípica de RV identificado en conejos con signología entérica procedentes de la principal entidad productora y comercializadora de carne de conejo en México. A través del análisis molecular y filogenético de los genes VP7, VP4 y NSP4 de la cepa de rotavirus detectada en este estudio (C-3/15), se identificaron los genotipos G3 P[8] E2 de RV, sin embargo, ninguno de ellos presentó una relación importante con ningún rotavirus lapine reportado. Los genotipos G3 y P[8] se asociaron estrechamente con rotavirus humanos (HRV), mientras que E2 presentó un alto grado de identidad con una cepa vacunal de rotavirus. Se plantea que C-3/15 posiblemente es resultado de rearrreglos genéticos involucrando cepas de rotavirus humano salvaje y cepas vacunales, quedando por dilucidar su papel en la inducción de signología entérica en conejos, no obstante, los datos sugieren que probablemente se trate de un evento aislado sin representar un riesgo para la población animal y humana. Para confirmar estos resultados, se sugiere la implementación de estudios de vigilancia epidemiológica de RV, cuya información sería de gran importancia para determinar si los genotipos identificados en esta investigación son comunes a una cepa de RV salvaje circulante en la región de estudio, o se trata de un evento aislado sin mayor significancia biológica. El presente trabajo representa el primer informe sobre la presencia de rotavirus humanos en conejos con signología entérica, así como la identificación de un posible rearrreglante entre cepas HRV y cepas vacunales en animales, además, este representa el primer reporte de identificación de los genotipos G3 P[8] E2 de RV en un conejos con enfermedad entérica.

**Palabras clave:** rotavirus, conejo, México, genotipado, rearrreglante genético.

## Índice general

1.	Introducción	1
2.	Revisión de literatura	4
2.1.	Rotavirus	4
2.1.1.	Antecedentes	4
2.1.2.	Clasificación	5
2.1.3.	Estructura	8
2.1.4.	Genoma	11
2.1.5.	Mecanismos de evolución viral	14
2.1.6.	Ciclo de replicación viral	15
2.1.6.1.	Receptores	19
2.1.6.2.	Penetración y descubrimiento	19
2.1.6.3.	Síntesis de la cadena positiva (RNAm)	22
2.1.6.4.	Formación de viroplasmos	23
2.1.6.5.	Empaquetamiento y formación de DLP's	26
2.1.6.6.	Maduración y liberación de viriones	26
2.1.7.	Patogénesis de la infección por rotavirus	27
2.1.8.	Fisiopatología de la enfermedad por rotavirus	29
2.1.9.	Determinación de los genotipos de rotavirus	30
2.2.	Rotavirus en conejos	33
2.2.1.	Identificación genética de rotavirus en conejos	38
2.2.2.	Constelaciones de rotavirus lapine	39
3.	Planteamiento del problema	43

4.	Justificación	44
5.	Hipótesis	45
6.	Objetivos	46
6.1.	Objetivo general	46
6.2.	Objetivos específicos	46
7.	Material y Método	47
7.1.	Diseño de estudio	47
7.2.	Toma de muestra	48
7.3.	Procesamiento de la muestra	49
7.3.1.	Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)	49
7.3.2.	Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Inversa (RT-PCR)	52
7.3.3.	Cultivo celular	53
7.4.	Análisis de resultados	56
8.	Resultados	57
9.	Productos	69
10.	Conclusiones generales	72
11.	Referencias bibliográficas	74

## 1. Introducción

En el Estado de México, las actividades de carácter agropecuario tienen un papel fundamental en el engranaje de la economía local, regional y estatal. En el año 2018, se registró una producción de 429,786 litros de leche, 172,659 toneladas de carne en canal y 95,330 toneladas de ave de engorda, representando las principales actividades ganaderas de la entidad (SAGARPA, 2018).

Otra actividad pecuaria que paulatinamente está cobrando importancia y se encuentra en constante crecimiento, es la producción cunícola. La Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, estimó que en el año 2016, la producción nacional de carne de conejo superó las 15 mil toneladas, siendo las entidades de mayor producción Puebla, Tlaxcala, Morelos, Michoacán, Querétaro y el Estado de México, siendo este último el principal productor y consumidor de carne de conejo (SAGARPA, 2016).

Si bien la cunicultura en el Estado de México se encuentra en constante crecimiento, sigue siendo en su mayoría una actividad de traspatio y de subsistencia alimentaria (Comité Nacional Sistema Producto Cunícola, 2017). Uno de los mayores problemas que enfrenta la producción cunícola de traspatio, es la falta de información respecto a las buenas prácticas de producción pecuaria, especialmente las relacionadas a los temas de sanidad, bioseguridad y bienestar animal. Dicha situación puede favorecer la presentación y replicación de agentes patógenos causales de diversas enfermedades, entre ellas, las de carácter entérico, mismas que tienen una gran importancia dentro de las producciones debido a su impacto productivo y económico (Lavazza *et al.*, 2008; Papp *et al.*, 2013<sup>a</sup>).

Uno de los agentes patógenos que pueden causar signología entérica en la población cunícola, es Rotavirus (RV) (Lavazza *et al.*, 2008; Kerr y Donnelly, 2013). Rotavirus especie A (RVA). Rotavirus son agentes virales pertenecientes al reino Riboviria, familia *Reoviridae*, subfamilia *Sedoreovirinae*, género Rotavirus (ICTV, 2018), los cuales son considerados una de las principales causas de diarrea viral aguda en humanos y en diversas especies animales en todo el mundo (Estes y Greenberg, 2013; Troeger *et al.*, 2017).

Rotavirus presenta un genoma constituido por once segmentos de RNA de cadena doble (dsRNA), los cuales codifican para seis proteínas estructurales (VP1-VP4, VP6 y VP7) y seis proteínas no estructurales (NSP1-NSP6) (Pesavento *et al.*, 2006). Dicha estructura genética (dividida o segmentada), incrementa la posibilidad de generación de recombinaciones (duplicaciones, deleciones, inserciones) y rearrreglantes genéticos (parciales o verdaderos), involucrando uno o varios segmentos de dsRNA (Kojima *et al.*, 2000; Parra *et al.*, 2004; Luchs y Timenetsky, 2014).

Dichas características facultan a RV para cruzar barreras interespecies e infectar distintas poblaciones animales y humanas, de modo que pueden generarse infecciones heterólogas, incluyendo eventos de zoonosis y antropozoonosis, lo cual ha sido ampliamente reportado en circunstancias naturales y experimentales (De-Leener *et al.*, 2004; Matthijssens *et al.*, 2006; Bonica *et al.*, 2015; Komoto *et al.*, 2016).

Las proteínas de la cápside externa VP7 y VP4, representan los principales determinantes antigénicos, ya que provocan de forma independiente respuestas de anticuerpos neutralizantes, y es a partir de su variabilidad genética que se determinan los genotipos G y P respectivamente de RV (Estes y Greenberg, 2013). Actualmente, han sido reconocidos 36 genotipos G y 51 genotipos P (RCWG, 2019).

Rotavirus cepa Lapine ha sido identificado en Canadá (Petric *et al.*, 1978), Japón (Sato *et al.*, 1982), Italia (Castrucci *et al.*, 1985; Matthijssens *et al.*, 2006; Martella *et al.*, 2003), Estados Unidos (Conner *et al.*, 1988; Ciarlet *et al.*, 1997), Hungría (Bányai *et al.*, 2005), China (Guo *et al.*, 2012), Países Bajos (Schoondermark-van de Ven *et al.*, 2013) y Corea (Kim *et al.*, 2013; Oem *et al.*, 2019), y los que han sido caracterizados pertenecen en su mayoría al genotipo G3 de VP7 y al genotipo P[14] y P[22] de VP4.

La caracterización genotípica de RV se ha basado en un sistema de clasificación binario, motivo por el que se ha determinado que dicha información podría no ser suficiente para obtener datos concluyentes acerca de la composición genética

general de RV. Por lo anterior, Matthijssens *et al.*, (2008), en colaboración con el Grupo de Trabajo de Clasificación de Rotavirus y el Comité Internacional de Taxonomía Viral, establecieron un nuevo sistema de clasificación, basado en la secuencia de nucleótidos de todos los segmentos del genoma de RV (constelación) para su uso en la designación de nuevos genotipos. De esta manera, todos los genes están identificados y diferenciados de acuerdo con determinados puntos de corte de las identidades de secuencia de nucleótidos.

Actualmente, sólo han sido caracterizadas cuatro constelaciones de LRV: la cepa 30/96 en Italia (Martella *et al.*, 2003; Matthijssens *et al.*, 2006), la cepa N-5 en China (Guo *et al.*, 2012), la cepa K1130027 en los Países Bajos (Schoondermark-van de Ven *et al.*, 2013) y la cepa Rab1404 en Corea (Oem *et al.*, 2019).

Si bien se recomienda el estudio y análisis de las constelaciones de RV, el criterio de selección de los genes bajo estudio puede determinarse en función del objetivo de investigación, tales como los segmentos 3 (VP3), 4 (VP4), 5 (NSP1), 9 (VP7) y 10 (NSP4), mismos que han sido asociados a la virulencia viral (Hoshino *et al.*, 1995; Greenberg y Estes, 2009; Tsugawa *et al.*, 2014).

La investigación acerca de las características moleculares de rotavirus, es fundamental para comprender aspectos de gran importancia como la dinámica epidemiológica del virus; para analizar sus complejos patrones evolutivos; identificar y rastrear eventos de recombinación y rearrreglos genéticos que posibilitan la transmisión interespecies; diseño de vacunas; generar predicciones sustentadas sobre el comportamiento de RV a través de las poblaciones, orientadas a la preservación de la salud humana y animal.

Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación es caracterizar los genes de rotavirus asociados a virulencia, aislado a partir de conejos (*Oryctolagus cuniculus*) con signología entérica, procedentes de la principal entidad productora de México.

## 2. Revisión de literatura

### 2.1. Rotavirus

Los Rotavirus (RV) son virus RNA de doble cadena (dsRNA), miembros del reino *Riboviria*, familia *Reoviridae*, subfamilia *Sedoreovirinae*, género *Rotavirus* (ICTV, 2018; Estes y Kapikian, 2007), causan enfermedad diarreica severa en diversas especies de mamíferos (Bishop, 2009; Estes y Greenberg, 2013) y representan una de las principales causas de diarrea asociada a la hospitalización infantil en niños menores de 5 años en todo el mundo (Troeger *et al.*, 2017).

#### 2.1.1. Antecedentes

Durante los últimos 40 años, han sido descubiertos y estudiados diversos virus como principales agentes causales de gastroenteritis, entre los que se encuentran Adenovirus, Minireovirus, Agente Norwalk, Astrovirus, Calicivirus, Coronavirus y Rotavirus, siendo estos últimos los mayormente identificados en infecciones en niños, y animales jóvenes. Rotavirus ha cubierto los requisitos necesarios para ser definido como un agente patógeno causante de gastroenteritis en humanos y animales, tales como el hallazgo y cultivo del virus a partir del intestino del caso clínico, generación de una respuesta inmune específica y transmisibilidad natural y experimental de la enfermedad (Bastardo y Maldonado, 2012).

En humanos, RV fue inicialmente descrito en 1973 por Ruth Bishop y colaboradores en Melbourne, Australia (Bishop *et al.*, 1973; Flewett *et al.*, 1973), identificado en células del epitelio de la mucosa duodenal de niños con gastroenteritis, posteriormente detectado en heces de niños con gastroenteritis aguda (Vizzi, 2009).

Al siguiente año, mediante microscopía electrónica y tinción negativa, fueron reconocidas partículas virales de 65 - 75 nanómetros (nm) de diámetro en heces de diferentes niños con gastroenteritis aguda en Canadá, Estados Unidos de Norteamérica, Australia e Inglaterra (Bastardo y Maldonado, 2012).

Sin embargo, antes de 1973, RV ya había sido descubierto en ratones diarreicos (Adams y Kraft, 1963), monos (Malherbe y Harwin, 1963) y ganado (Mebus *et al.*, 1969). Desde entonces RV ha sido identificado en animales jóvenes de muchas especies de mamíferos y aves (Desselberger, 2014).

El nombre rotavirus fue derivado del latín “*rota*” que significa rueda, porque al microscopio electrónico las partículas virales completas o viriones se asemejan a las ruedas de una carreta antigua, por tal aspecto se denominó Rotavirus a éste género (Flewett *et al.*, 1974; López *et al.*, 2007).

Al inicio, estos virus fueron nombrados Orbivirus (1973), Rotavirus (1974), Duovirus (1975), Virus de la Gastroenteritis Infantil (1975), agentes parecidos a los Reovirus (Kapikian en 1976 y Konno en 1977), sin embargo, rotavirus se eligió como nombre genérico oficial en 1979 (Bastardo y Maldonado, 2012).

### 2.1.2. Clasificación

De acuerdo con Comité Internacional de Taxonomía Viral, rotavirus es clasificado como un género dentro del reino *Riboviria*, familia *Reoviridae*, subfamilia *Sedoreovirinae*, sin orden asignado (ICTV, 2018), además, pertenecen al grupo III de la Clasificación de Baltimore.

Hasta hoy en día, de acuerdo con la reactividad serológica y la variabilidad genética de la proteína de la capa intermedia de la cápside VP6, se han diferenciado nueve especies de Rotavirus (A, B, C, D, E, F, G, H e I), los cuales difieren en sus características genéticas, antigénicas, epidemiológicas, la especie animal y los grupos de edades más susceptibles (Matthijnssens *et al.*, 2011<sup>a</sup>; Patton, 2012; Mihalov-Kovács *et al.*, 2015).

Los Rotavirus pertenecientes a las especies A, B y C (RVA, RVB y RVC, respectivamente), son conocidos por infectar humanos y diversos animales (principalmente los de la especie A), mientras que las especies D, E, F, G y H (RVD, RVE, RVF, RVG y RVH) hasta el momento sólo se han identificado en animales, (cuadro 1) (Matthijnssens *et al.*, 2012). Por otro lado, la especie I fue identificada en

perros en Hungría por Mihalov-Kovács *et al.*, (2015), cuyas secuencias mostraban una limitada homología con secuencias representantes de las 8 especies de RV (A-H), motivo por el cual la propuesta fue revisada y aceptada por el Comité Internacional de Taxonomía Viral y el Grupo de Trabajo de Clasificación de Rotavirus.

Actualmente se encuentra bajo revisión la propuesta de integración de RV especie J (Bányai *et al.*, 2017), identificado en murciélagos en Serbia.

Cuadro 1. Especies de Rotavirus detectados en diferentes especies de mamíferos y/o aves. (Ghosh y Kobayashi, 2014; Bányai *et al.*, 2017).

<b>Especie de Rotavirus</b>	<b>Especies hospedadoras</b>
A	Amplia variedad de especies de mamíferos y aves
B	Humanos, ganado, cabras, cerdos, ratas y ovejas
C	Humanos, ganado, perros, cabras, hurones y cerdos
D	Pavos y pollos
E	Cerdos
F	Pollos
G	Pollos
H	Humanos y cerdos
I	Perros
J*	Murciélagos

\*Bajo revisión

Con base a la especificidad antigénica de la proteína VP6, dentro de la especie A se han distinguido 4 subgrupos (I, II, I+II y no I/no II) los cuales se asignan de acuerdo a la presencia o ausencia de dos distintos epítopes reactivos con uno, ambos o ninguno de los anticuerpos monoclonales (Solberg *et al.*, 2009; Bastardo y Maldonado, 2012).

VP7 (glicoproteína) y VP4 (sensible a la acción de proteasas), son proteínas de la capa externa de la cápside que representan los principales determinantes antigénicos, ya que provocan de forma independiente respuestas de anticuerpos neutralizantes, y es a partir de su variabilidad genética que se determinan los genotipos G y P respectivamente (Estes y Cohen, 1989; Estes y Kapikian, 2007). Al

menos 36 genotipos G y 51 genotipos P (figura 1) se han reconocido hasta la fecha (Matthijssens *et al.*, 2011<sup>a</sup>; Trojnar *et al.*, 2013; ICTV, 2018; RCWG, 2019).

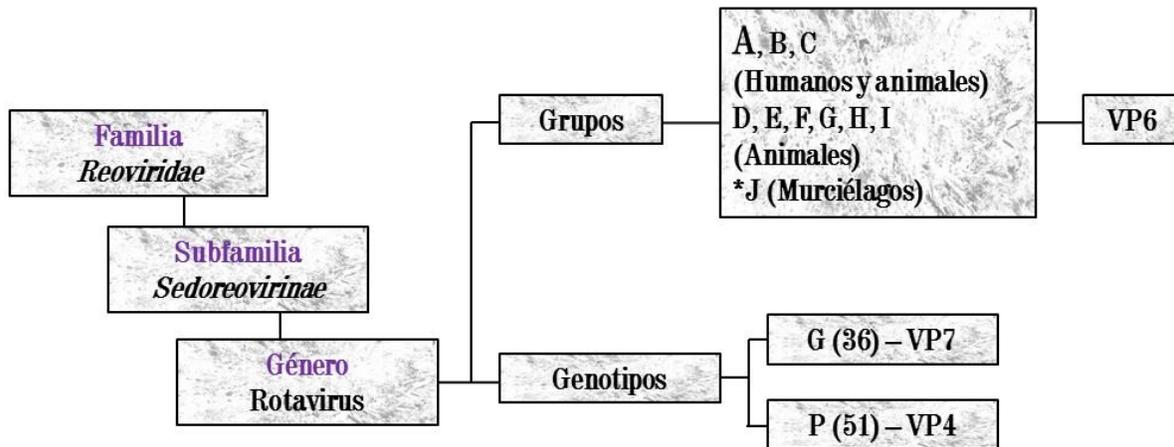


Figura 1. Clasificación de los Rotavirus (Matthijssens *et al.*, 2011<sup>a</sup>; ICTV, 2018; RCWG, 2019).

El sistema clásico de clasificación de serotipo ha sido reemplazado casi por completo por un sistema de clasificación de genotipo basado en diferencias de secuencia de los respectivos segmentos de genes. Para los tipos G, serotipos y genotipos son sinónimos, por ejemplo, G1, G2, G3, etc. Para los tipos P, hay muchos más genotipos P que sueros de referencia que determinen los serotipos P, por lo tanto, se ha adoptado una doble nomenclatura, por ejemplo, P1A[8] que designa el serotipo P1A y el genotipo P8 (Estes y Greenberg, 2013), de esta manera, los genotipos P son denominados por un número entre corchetes. Los genotipos P[4] y P[8] corresponden a dos subtipos de serotipo P (P1A y P1B) (López *et al.*, 2007).

### 2.1.3. Estructura

El virión de RV mide de 70 - 100 nanómetros de diámetro aproximadamente, no presenta envoltura lipídica y posee una cápside proteica constituida por tres capas concéntricas (figura 2). Cada partícula contiene una RNA-Polimerasa dependiente

de RNA (Estes y Cohen, 1989). En total, las proteínas codificadas por RV son seis proteínas estructurales (VP1-VP4, VP6 y VP7) y seis proteínas no estructurales (NSP1-NSP6) (Pesavento *et al.*, 2006; Estes y Greenberg, 2013).

Como se ha mencionado, el virión de las diferentes especies de rotavirus está compuesto por tres capas concéntricas de proteínas que engloban el genoma viral. La capa externa se encuentra conformada por la glicoproteína VP7 y la proteína sensible a proteasas VP4; la capa intermedia se conforma por la proteína VP6, misma que constituye aproximadamente el 50% de la proteína total del virión. Esta proteína, que es la más abundante, rodea la capa interna del virus, la cual está formada por las proteínas VP1, VP2 y VP3 (Estes y Kapikian, 2007).

El triple estrato proteico que forma al virión está constituido por una capa interna (núcleo o core) compuesta por 120 moléculas (60 dímeros) de la proteína VP2, que rodea al genoma viral, así como la RNA polimerasa dependiente de RNA viral (RdRp) VP1 y la proteína VP3 (McClain *et al.*, 2010). Las proteínas VP1 y VP3 se encuentran involucradas en el proceso de transcripción del RNA viral, y se unen a la superficie interna de la proteína VP2, formando de esta manera un complejo trimérico. Doscientos sesenta trímeros de VP6 constituyen la capa intermedia, que junto a la capa interna forma las partículas de doble cápside o DLP (por sus siglas en inglés: double-layer particle). La superficie lisa del virus está compuesta por 780 moléculas de VP7 (doscientos sesenta trímeros), que interactúan con VP6, mientras que 60 espículas de trímeros de VP4 (180 moléculas), se proyectan hacia el exterior de la superficie viral. VP4 y VP7 encierran las DLP formando una partícula de triple capa (TLP [triple-layer particle]) o virión (figura 3) (Estes y Kapikian, 2007; citados en Vizzi, 2009).

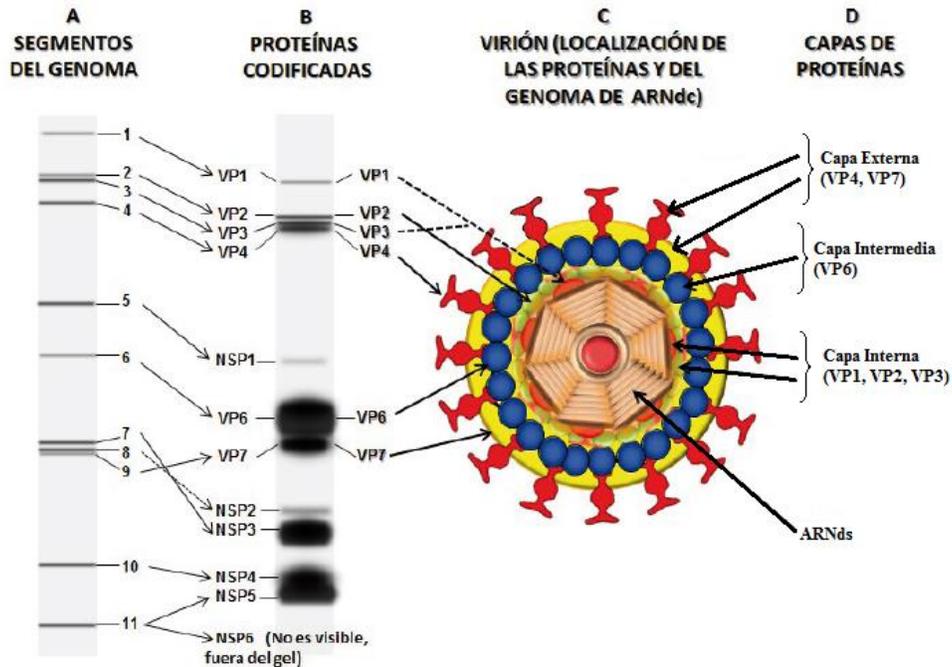


Figura 2. Representación de la estructura de rotavirus: A) los once segmentos de dsRNA que conforma el genoma de RV, como se observan por Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (PAGE); B) proteínas codificadas por los once segmentos genómicos; C) disposición de las proteínas y el genoma de dsRNA para formar el virión o partícula viral completa; D) las tres capas proteicas que engloban el genoma viral y las proteínas que integran cada capa. Tomado de Bastardo y Maldonado, (2012).

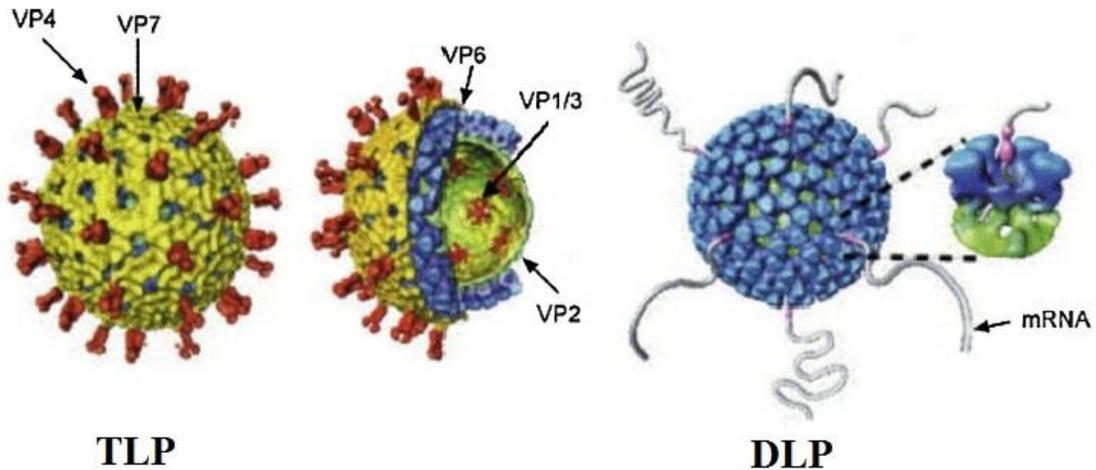


Figura 3. Modelo de reconstrucción a través de Cryo-EM de partículas de triple capa (TLP) y partículas de doble capa (DLP) de Rotavirus. Tomado de Jayaram *et al.*, (2004).

La proteína VP4 posee funciones esenciales en el ciclo de replicación viral, incluyendo la unión al receptor (presenta un sitio de clivaje para la tripsina) y la penetración a la célula infectada, por tanto, las propiedades de VP4 son determinantes del rango de hospedero, virulencia, tropismo, e inducción de inmunidad (Estes y Kapikian, 2007). En diversas cepas, VP4 es una hemoaglutinina que medía el ataque celular, la virulencia y la restricción de crecimiento en condiciones de cultivo *in vitro*. Por su parte, VP7 es una glicoproteína que al igual que VP4, es inmunogénica. Si bien su papel durante las primeras interacciones virus – célula no se encuentra del todo claro, se ha informado que tiene interacciones con la superficie celular en eventos posteriores a la unión inicial (Zárate *et al.*, 2004).

El clivaje de VP4 con tripsina en la célula huésped da como resultado la escisión específica de VP4 para generar los subdominios VP8\* y VP5\* (Crawford *et al.*, 2001). La estructura tridimensional del virión ha sido determinada por criomicroscopía electrónica (cryo-EM) y tomografía de una sola partícula a una resolución alrededor de 4.3° en donde se observa una intensa interacción de VP4 tanto con VP6 (en donde el subdominio VP5\* está semi-enterrado) y VP7 (figura 4) (Settembre *et al.*, 2011).

La estructura y las interacciones de VP4 con otras proteínas estructurales permiten la descripción de un mecanismo de entrada de RV. Se ha demostrado que los trímeros de VP4 únicamente pueden ser observados por cryo-EM en TLP's cultivadas en presencia de tripsina (Crawford *et al.*, 2001).

En el interior de la capa interna se encuentran los once segmentos de dsRNA, constituyendo el genoma de RV. Estos segmentos, según lo revelan estudios de criomicroscopía electrónica, parecen estar ordenados geoméricamente dentro de la partícula viral (Bastardo y Maldonado, 2012).

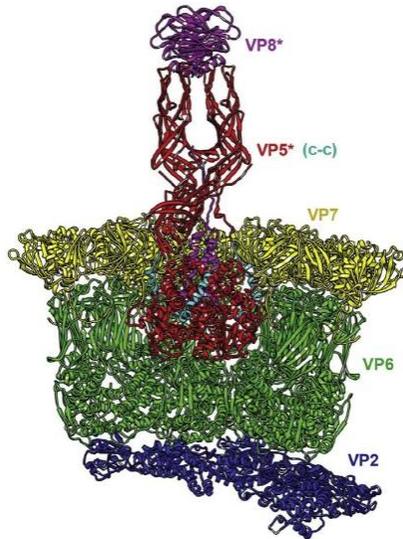


Figura 4. Interacción de las proteínas estructurales de rotavirus. Vista en corte lateral de las interacciones de VP4 en la TLP. El subdominio VP8\* se muestra en morado y VP5\* en rojo. El segmento VP5\* que formará el doble enrollamiento (c-c) en la conformación post-entrada está en azul (cian). Los dominios globulares de VP5\* se encuentran anclados a VP6 (verde). Tomado de Settembre *et al.*, (2011).

#### 2.1.4. Genoma

El genoma viral de rotavirus tiene una longitud aproximada de 18.500 pares de bases (pb), está constituido por 11 segmentos de dsRNA, mismos que codifican seis proteínas estructurales y seis no estructurales (Prasad *et al.*, 1996; Gaunt *et al.*, 2013), (de 667 hasta 3.302 nt). Todos los segmentos genómicos de RV son monocistrónicos, a excepción del 11° segmento, el cual codifica para las proteínas NSP5 o NSP6, dependiendo de la cepa (Estes y Kapikian, 2007; Desselberger, 2014), en el cuadro 2, se muestran las asignaciones gen-proteína y proteína-función determinadas a través del análisis de varias cepas de RVA.

La cadena positiva de cada segmento del genoma de RV, abundante en guanina y uracilo, presenta una secuencia cap m7GpppG(m)GPy en su extremo 5' terminal, una serie de secuencias conservadas en la región 5' no codificante (GGC), un marco de lectura abierto (ORF), un codón de paro y otra serie de secuencias conservadas en la región no codificante 3', que termina siempre en ACC (figura 5).

Cuadro 2. Asignaciones gen-proteína, localización de la proteína y proteína-función adaptadas a Rotavirus de bovino RF cepa (G6P6 [1]). Tomado de Desselberger, (2014).

Segmento del genoma	Medida (pb)	Proteína codificada	Medida (kDa)	Localización en el virión	Moléculas / virión	Función
1	3302	VP1	125	Núcleo	12	RdRp; unión de ssRNA; complejo con VP3
2	2687	VP2	94	Núcleo	120	Envoltura del núcleo; unión de RNA; requerida para la actividad de RdRp
3	2592	VP3	88	Núcleo	12	Guanililtransferasa; metiltransferasa; 2', 5'-fosfodiesterasa; unión a ssRNA; complejo con VP1
4	2362	VP4 <sup>a</sup>	86	Capa externa	180	Homotrímero; Antígeno de neutralización tipo P; proteína de fijación; proteasa que mejora la infectividad; virulencia; fusión con la membrana celular
5	1581	NSP1	58	No estructural	-	Antagonista de interferón; ligasa E3; unión a RNA
6	1356	VP6	44	Capa intermedia	780	Homotrímero, especie-determinante; protección (neutralización intracelular); requerida para la transcripción
7	1062	VP7 <sup>b</sup>	37	Capa externa	780	Homotrímero; glicoproteína; antígeno de neutralización tipo G; dependiente de Ca <sup>2+</sup>
8	1059	NSP2	36	No estructural	-	Octámero; se une a RNA; NTP-asa; quinasa PND; desestabilizadora de hélice; esencial para la formación de viroplasma
9	1074	NSP3	34	No estructural	-	Dímero; se une a la región 3' terminal de ssRNA (+) viral, eIF4G celular, Hsp90; desplaza a PABP; inhibe la traducción

						de proteínas del hospedero
10	751	NSP4	20	No estructural	-	Glicoproteína transmembrana del RER; vioporina; receptor intracelu- lar para DLPs; interactúa con viroplasmas y la vía de la autofagia; modula el Ca <sup>2+</sup> intracelular y la replicación del RNA; enterotoxina (secretada); virulencia
11	666	NSP5	21	No estructural	-	Dímero; proteína fosfo y O-glicosilada; unión de RNA; quinasa; esencial para la formación de viroplasma; interacción con VP2
	-	NSP6 <sup>c</sup>	12	No estructural	-	Interacción con NSP5, localizada en viroplasma

<sup>a</sup> Escindido por tripsina o proteasa celular para generar los subdominios VP5\* y VP8\*.

<sup>b</sup> Péptido señal de escisión terminada.

<sup>c</sup> Segundo ORF del segmento 11 de RNA.

No poseen señal de poliadenilación en el extremo 3' terminal, en su lugar, presentan una secuencia consenso corta (GACC), altamente conservada en todos los segmentos del genoma viral. La condición segmentada del genoma de RV constituye una base importante para el estudio y caracterización de sus características antigénicas y replicativas, así como su mecanismo de evolución más común, denominado rearreglo génico (rearreglante) o "shift" (intercambio de genes entre cepas) (Estes y Kapikian, 2007; citados en Vizzi, 2009).

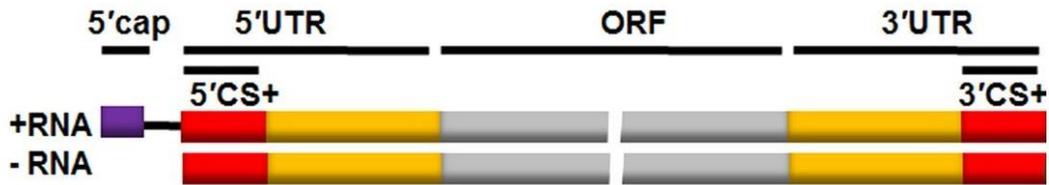


Figura 5. Representación de la estructura común a los once segmentos del genoma de Rotavirus. Cada segmento posee un marco de lectura abierto (ORF) que se muestra en gris, los extremos 5' y 3' regiones no codificantes (UTRs), que se muestran en amarillo, y las secuencias de consenso (CS) altamente conservadas se muestran en rojo. Tomado de Hu *et al.*, (2012).

Las regiones no codificantes (UTR) de los segmentos de RNA de sentido positivo son pequeñas: de 9 a 48 nt en el extremo 5' terminal y de 17 a 182 nt en el extremo 3' terminal (Li *et al.*, 2010).

### 2.1.5. Mecanismos de evolución viral

Los mecanismos de evolución de RV se sustentan mayormente en la naturaleza segmentada de su genoma. Su evolución ha sido estudiada a través del análisis de todo el genoma mediante diferentes técnicas de biología molecular (Matthijnssens y Van Ranst, 2012). De esta manera, se han identificado varios mecanismos evolutivos:

1. Mutaciones puntuales frecuentes en todos los segmentos de RNA, ya sea que ocurran esporádicamente o se acumulen secuencialmente (De Grazia *et al.*, 2014).
2. Rearreglantes genéticos parciales que ocurren en células individuales infectadas simultáneamente por dos Rotavirus distintos, a menudo implicadas en transmisiones zoonóticas (Luchs y Timenetsky, 2014).
3. Recombinaciones del genoma, que consta de duplicaciones o deleciones parciales de secuencias de nucleótidos de segmentos individuales (Kojima *et al.*, 2000).

4. Rearreglantes genéticos verdaderas, la cual implica varios segmentos (Parra *et al.*, 2004).
5. Varios mecanismos anteriores actuando simultáneamente.

A pesar de tener diversos mecanismos de evolución, los principales parecen ser las mutaciones puntuales que se producen de forma continua debido a la alta tasa de error de la RdRp (Blackhall *et al.*, 1996) y recombinaciones del genoma.

Una característica compartida de los virus con genomas RNA segmentados es su capacidad de sufrir un reordenamiento durante la coinfección de una célula hospedera; cuando dos o más cepas virales coinfectan la misma célula, pueden intercambiar sus segmentos genómicos (McDonald *et al.*, 2016). Este proceso da como resultado una progenie reordenada o rearreglante con genes derivados de múltiples cepas parentales. En algunos casos, la nueva combinación de genes confiere una ventaja selectiva al virus, como permitirle evadir la respuesta inmune del hospedero o infectar una nueva especie (Ghosh y Kobashi, 2014; Li y Chen, 2014).

Debido a su fuerte impacto en la evolución viral, se tiene la hipótesis que los reordenamientos ocurren frecuentemente en los virus de RNA segmentados, no obstante, la prevalencia de los reordenamientos en la mayoría de las poblaciones virales tiende a ser mucho más baja de lo que se espera, y algunas cepas son incapaces de reordenar segmentos del genoma entre sí, incluso durante la coinfección experimental de células cultivadas o animales. Dichas observaciones sugieren que el reordenamiento requiere compatibilidad genética y bioquímica, por lo que las diferencias de nucleótidos y/o aminoácidos entre las cepas parentales (coinfectantes), pueden funcionar como determinantes de la restricción de reordenamiento (McDonald *et al.*, 2016; Mingo *et al.*, 2017).

#### 2.1.6. Ciclo de replicación viral

Rotavirus tiene un tropismo muy específico, infectando únicamente a los enterocitos maduros de las puntas de las vellosidades del intestino delgado (Estes y Kapikian, 2007). En ensayos de cultivo *in vitro*, RV también muestra un tropismo restringido, ya

que, si bien puede unirse a la superficie de diferentes líneas celulares, únicamente es capaz de infectar eficientemente aquellas líneas derivadas de epitelio intestinal o renal (López *et al.*, 2007).

Dicho tropismo se debe (al menos parcialmente), a la interacción de RV con sus receptores celulares; la entrada de estos virus a la célula hospedera es un proceso complejo de diversos pasos (figura 6), estando involucrados diferentes dominios de las proteínas de la superficie viral, así como diferentes elementos y receptores celulares (López y Arias, 2004; citados en Rojas *et al.*, 2008). Dichas moléculas se han asociado con microdominios lipídicos de la membrana celular. El requerimiento de diversas moléculas celulares, que podrían necesitar estar presentes y organizadas de una determinada manera, podría explicar el tropismo celular y tisular de RV (López y Arias, 2006).

Rotavirus se fija a la célula a través de receptores que contienen ácido siálico, con integrinas y la proteína Hsc70 actuando como receptores posteriores a la fijación, todos localizados en las balsas lipídicas (Baker y Prasad, 2010). Posteriormente entran en las células por endocitosis; algunas cepas utilizan la endocitosis mediada por clatrina clásica, mientras que otras parecen emplear una vía independiente de ella o de caveolina, la cual aún no ha sido totalmente caracterizada (Díaz-Salinas *et al.*, 2014). Igualmente compleja y coordinada es la participación de la proteína estructural VP4, la cual está implicada en la facilitación de interfaz óptima entre los componentes virales y los del huésped (Baker y Prasad, 2010).

Poco después de la entrada en la célula, la partícula viral pierde las proteínas de la capa externa de la cápside y tiene lugar la activación de la transcripción, la cual depende de la RNA polimerasa viral (VP1). Los transcritos virales sintetizados poseen dos funciones; por una parte sirven como RNA's mensajeros que dirigen la síntesis de todas las proteínas virales, y por otra parte, funcionan como plantados para la síntesis de la cadena negativa o complementaria, dando lugar al dsRNA que constituye el genoma viral (Estes y Kapikian, 2007).

Las proteínas virales recién sintetizadas son reclutadas en viroplasmatas (Patton *et al.*, 2006), estructuras citoplasmáticas electrodensas donde el genoma viral se replica y donde se ensamblan las partículas de doble capa que posteriormente geman al interior del retículo endoplásmico. Durante este proceso, los DLP adquieren una envoltura lipídica transitoria, la cual posteriormente se perderá para producir TLP maduras e infecciosas (Patton y Spencer, 2000). Después de la entrada del virus, éste se apodera de la maquinaria de síntesis de proteínas de la célula, de tal modo que la mayoría de las proteínas que son sintetizadas durante la infección son las proteínas virales y la síntesis de proteínas celulares se ve abatida casi por completo (Patton *et al.*, 2007). Por último, en las células MA-104, el virus se libera en el medio a través de lisis celular o por gemación. Las proteínas NSP2 y NSP5 son esenciales para la formación de los viroplasmatas, ya que en ausencia de cualquiera de ellas no se forman estas estructuras y el ciclo replicativo del virus se interrumpe (Campagna *et al.*, 2005).

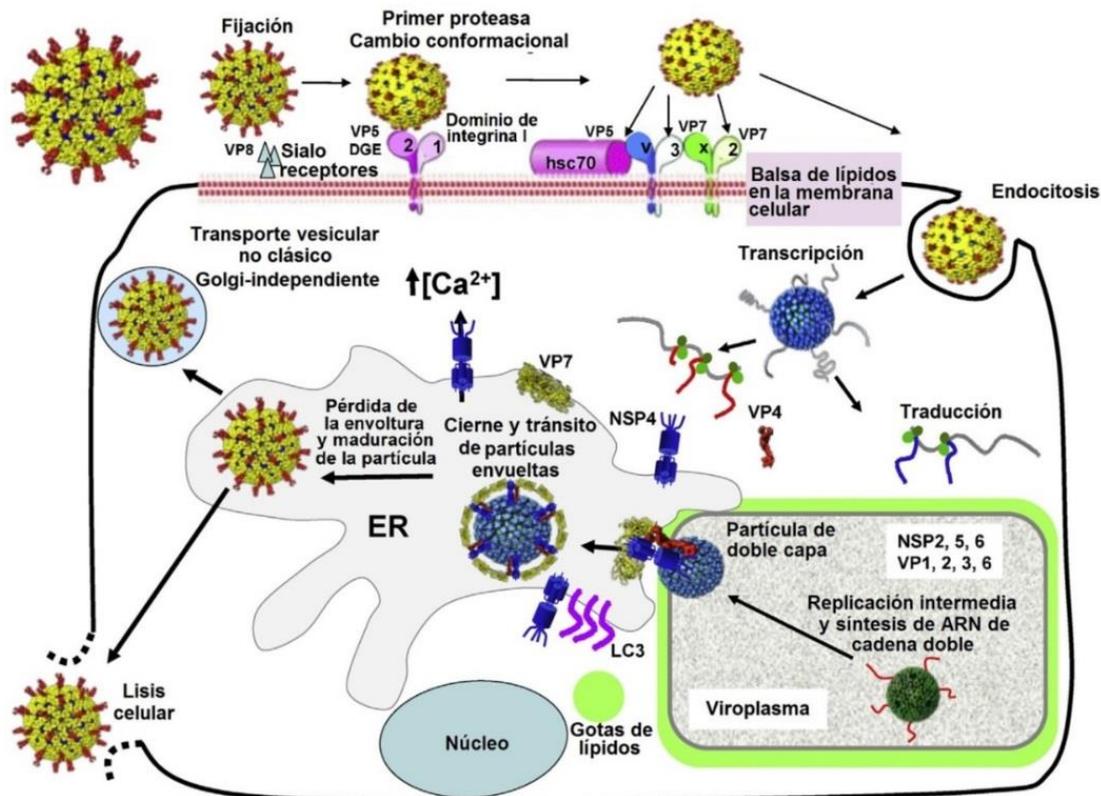


Figura 6. Ciclo de replicación de Rotavirus. Las partículas de triple capa (TLP) de Rotavirus inicialmente se adhieren a receptores con sialo-glicanos (o a grupos de antígenos histo-sangre) en la superficie de la célula huésped, seguido por interacciones con otros receptores celulares, incluyendo integrinas y la proteína Hsc70. Posteriormente el virus se internaliza mediante endocitosis mediada por receptor. La partícula pierde su capa exterior (VP4 Y VP7), provocada por el bajo nivel de calcio en el endosoma, convirtiéndose en partículas de doble capa (DLP) transcripcionalmente activas. Las DLPs comienzan las primeras rondas de transcripción de RNAm, el cual se utiliza para traducir las proteínas virales. Una vez sintetizadas las proteínas virales suficientes, el genoma de RNA se replica y empaqueta en las DLPs recién formadas, dentro de estructuras especializadas llamadas viroplasma, donde interactúan con gotas de lípidos. Las DLPs recién formadas se unen a NSP4, que sirve como un receptor en el retículo endoplásmico (RE), en el cual posteriormente son internadas. NSP4 también actúa como una viroporina al liberar  $Ca^{2+}$  de los almacenes intracelulares. Las partículas adquieren una envoltura al transitar a través del RE, la cual es eliminada al unirse a la partícula las proteínas de la cápside externa VP4 y VP7, convirtiéndose en TLPs maduras. La progenie viral es liberada a través de lisis celular. En células epiteliales polarizadas, las partículas son liberadas a través de un mecanismo no clásico de transporte vesicular. Tomado de Estes y Greenberg, (2013).

### 2.1.6.1. Receptores

La sensibilidad de la infección por rotavirus al tratamiento de la neuraminidasa de la célula anfitriona sugirió que se requerían residuos de ácido siálico (SA) en la superficie celular para que se pudiese llevar a cabo la unión e infectividad eficientes (Willoughby y Yolken, 1990). Sin embargo, el análisis de un mayor número de cepas de rotavirus animales mostró que así como los rotavirus humanos, la mayoría de las cepas son SA independientes (Ciarlet *et al.*, 2001). La unión de las cepas SA - dependientes a las células parece estar mediada inicialmente por VP8 (componente de VP4 ubicada en la punta de las espículas), mientras que las SA - independientes parece estar mediada directamente por VP5 (Zárate *et al.*, 2000). La unión de Rotavirus SA-dependientes y SA-independientes a glicoconjugados (glicoproteínas, glicolípidos y glicoesfingolípidos) ha implicado a varias moléculas como receptores putativos para rotavirus (Ciarlet *et al.*, 2002). La proteína VP4 se une a SA con una amplia especificidad y una baja afinidad. Esto es consistente con una interacción inicial mediante la unión celular antes de las nuevas interacciones que determinarían la gama de huéspedes y especificidad de tipo celular (Dormitzer *et al.*, 2002).

El dominio VP8 de algunas cepas contiene un dominio de unión para el ácido siálico (SA) terminal, el cual se utiliza para la fijación celular del virus (Isa *et al.*, 2006).

Otros tipos de proteínas han sido implicadas en la entrada de rotavirus en la célula y pueden servir como correceptores o factores de entrada (López y Arias, 2004, 2006). Las integrinas celulares  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 7$  y hsc 70 (proteína de choque térmico) han estado involucradas en la interacción con VP5, mientras que las integrinas  $\alpha x\beta 2$  y  $av\beta 3$  pueden unirse a Rotavirus a través de otra proteína externa de VP7 (Coulson *et al.*, 1997; citado en Ruíz *et al.*, 2009).

### 2.1.6.2. Penetración y descubrimiento

Rotavirus presenta tropismos específicos hacia células compatibles con la existencia de receptores de superficie que median la unión del virus y/o su entrada a través de la interacción con sus proteínas externas, VP4 y VP7 (Willoughby y Yolken, 1990). La proteína VP4 es la principal proteína de ataque celular de los rotavirus (además

que determina el tipo de vía de entrada del virus), sin embargo, la identidad del receptor celular sigue siendo algo controversial. La infectividad primaria de algunas cepas de RV de origen animal, denominadas sensibles a neuraminidasa (NS), depende de la presencia de ácido siálico en la superficie celular, no obstante, se ha informado que dicha interacción no es esencial para una infectividad inicial, ya que un elevado número de cepas animales y humanas parecen interactuar con moléculas neuraminidasa-resistentes (NR) (Arias *et al.*, 2001; citado en Vizzi, 2009).

La endocitosis es un proceso celular que implica la formación de una vesícula cuya carga es transportada desde el medio extracelular al interior de la célula. Se han descrito varias vías endocíticas y todas ellas han demostrado ser empleadas por los virus durante la entrada en la célula. Estas vías incluyen endocitosis mediada por clatrina, absorción a través de caveolae, macropinocitosis, fagocitosis, y una vía clatrina-caveolae-independiente que actualmente no está bien caracterizada (Mayor y Pagano, 2007).

Rotavirus es internalizado en células MA104 por endocitosis, empleando diferentes vías endocíticas, dependiendo de la cepa del virus (Díaz-Salinas *et al.*, 2013). De la cepa más estudiada (Rotavirus cepa Rhesus [RRV]), la cual es sensible al tratamiento de las células con neuraminidasa (NA), se sabe que emplea interinas  $\alpha 2\beta 1$  y  $\alpha \nu\beta 3$ , así como la proteína de choque térmico hsc70 como receptores para entrar en las células a través de una vía independiente de clatrina – caveolina, pero que depende de una dinamina funcional (proteína implicada en la escisión de las vesículas endocíticas de la membrana celular) y de la presencia de colesterol en la superficie celular. Por otro lado, se sabe que existen diferencias en el tipo de ruta endocítica que utilizan otras cepas; el rotavirus bovino cepa UK, la cepa porcina TFR-41 y la cepa humana Wa entran a las células a través de un proceso de endocitosis mediada por clatrina. Sin embargo, todas las cepas requieren de la proteína hsc70, colesterol y dinamina para poder entrar en la célula huésped (Gutiérrez *et al.*, 2010).

El clivaje proteolítico de VP4 con tripsina es esencial para la internalización del virus (Estes y Kapikian, 2007), cuyo resultado es la escisión específica de VP4 para

proporcionar los productos de escisión VP8\* y VP5\* (Crawford *et al.*, 2001). El contacto inicial de una partícula viral sensible a neuraminidasa, mediado por un receptor celular que contiene ácido siálico entre el dominio VP8\* (aa 93-208), genera cambios conformacionales en la proteína VP4, lo cual le permite al virus interactuar con la integrina  $\alpha 2\beta 1$  mediante el dominio VP5\* (aa. 308-310) (Arias *et al.*, 2001). Las cepas NR podrían interactuar directamente a través de VP5 con la integrina  $\alpha 2\beta 1$  (López y Arias, 2006).

Posterior a dichas interacciones, otras uniones acontecen entre VP5 y la proteína hsp70, así como la proteína VP7 con las integrinas  $\alpha v\beta 3$  y  $\alpha x\beta 2$  (López y Arias, 2006), mismas que funcionan como co-receptores, y junto a VP6, mediarían la penetración celular (Gualtero *et al.*, 2007).

Adicionalmente, la participación de otros elementos celulares como glicoproteínas, glicolípidos y colesterol en la infección por RV, sugiere que los receptores virales podrían formar parte de microdominios glicosfingolipídicos llamados *rafts* o balsas lipídicas (Arias *et al.*, 2001). Dichas balsas lipídicas servirían como plataforma para facilitar las interacciones entre las moléculas celulares y RV, fungiendo conjuntamente como receptor celular. El requerimiento de diferentes moléculas, que deberían estar presentes y organizadas de forma precisa, podría explicar el tropismo celular y tisular de rotavirus (López y Arias, 2006).

Una vez que el virus se interna en la célula huésped, independientemente de la vía endocítica empleada, la partícula infectante de triple capa (TLP) pierde la capa proteica externa (VP4 y VP7) y se convierte en una partícula de doble capa (DLP), proceso llamado descubrimiento (uncoating). Dentro de la célula, la partícula DLP que es transcripcionalmente activa, comienza a transcribir ssRNAs de polaridad positiva, que se liberan en el citoplasma, donde serán traducidas (Lawton *et al.*, 1997; citado en Contin *et al.*, 2011).

### 2.1.6.3. Síntesis de la cadena positiva (RNAm)

Las partículas de RV poseen sus propios complejos de transcripción (CTs), que consisten en las proteínas VP1 (RNA viral dependiente de RNA polimerasa [RdRp]), y VP3, la enzima de taponado viral (cap) (con actividades fosfodiesterasa, guanililtransferasa y metilasa). Los CTs se localizan en la superficie interna de VP2 (núcleo) (Jayaram *et al.*, 2004). Cada CT se une con un segmento de RNA viral específico (Periz *et al.*, 2013).

Los RNAm virales dirigen la síntesis de seis proteínas estructurales (VP1 a VP4, VP6, y VP7) y seis proteínas no estructurales (NSP1 a NSP6) (ciclo temprano de replicación). Además de su función como RNAm, las transcripciones virales también sirven como plantillas de RNA para la síntesis de la hebra negativa de RNA complementario para formar los segmentos genómicos del RNA de doble cadena (dsRNA) (ciclo tardío de replicación). La síntesis de RNA es mediada por la RdRp viral endógena (VP1) (Patton y Spencer, 2000).

Tras varias rondas de transcripción, se acumulan numerosas copias de cada RNA. Después de la síntesis de los primeros nucleótidos de transcripciones nacientes, el componente de VP3 del complejo de la polimerasa añade una secuencia cap m7G en el extremo 5' terminal (Jayaram *et al.*, 2004; citado en Guglielmi *et al.*, 2010).

Un incremento logarítmico en la producción de RNAm en etapas posteriores a la infección (> 4 h pi) indica que los DLPs recién sintetizados se han convertido en transcripcionalmente activos (transcripción secundaria) (Ayala-Breton *et al.*, 2009).

Los virus que mantienen sus genomas segmentados se enfrentan a un desafío de enormes proporciones en el proceso de ensamble (de cómo empaquetar una dotación completa de segmentos del genoma). Algunos virus de RNA utilizan un mecanismo de empaquetamiento no selectivo en el que los segmentos están encapsulados al azar dentro de los viriones. Este mecanismo de empaquetamiento aleatorio crea un gran número de partículas que carecen de genomas completos y son por lo tanto, incapaces de llevar a cabo una infección eficiente (Luque *et al.*, 2009).

Otros virus de RNA, particularmente aquellos con tres o más segmentos de genoma, poseen un evolucionado mecanismo de empaquetamiento más sofisticado mediante el cual se reconoce explícitamente cada RNA viral. Se piensa que los miembros de la familia *Reoviridae* utilizan este enfoque de genes específicos para empaquetar sus genomas de 9, 10, 11, ó 12 segmentos de RNA de doble cadena. La evidencia más fuerte en apoyo del empaquetamiento selectivo en lugar de un embalaje al azar para esta familia viral, proviene de la observación de que la proporción de las unidades de partículas formadoras de placa puede ser bastante baja (Hundley *et al.*, 1985). Por otra parte, nunca se ha identificado a ningún miembro *Reoviridae* que contenga más de una copia de cada gen, lo que sugiere un proceso equimolar exacto de empaquetamiento (Patton, 1990; citado en McDonald y Patton, 2011).

#### 2.1.6.4. Formación de viroplasmos

Las proteínas virales recién sintetizadas son reclutadas en viroplasmos, estructuras donde el genoma viral se replica y donde las partículas de replicación intermedia de doble capa se ensamblan (Patton y Spencer, 2000; citado en Ayala-Breton *et al.*, 2009). Las proteínas no estructurales NSP2 y NSP5 son necesarias para la formación de dichos cuerpos de inclusión citoplásmicos (Fabbretti *et al.*, 1999).

Los viroplasmos son estructuras discretas que se forman en el citoplasma de las células infectadas por rotavirus y constituyen la maquinaria de replicación del virus (Estes y Kapikian, 2007). Además de ser necesarias para su formación, en ellos se localizan las proteínas NSP2 y NSP5 junto con otras proteínas virales, incluyendo la polimerasa (VP1), VP2, VP3 y tubulina (Criglar *et al.*, 2013), proteína componente de los viroplasmos que induce la despolimerización de los microtúbulos y la estabilización por acetilación (Eichwald *et al.*, 2012).

Es en estas estructuras donde se llevan a cabo los pasos iniciales de la morfogénesis viral, en un proceso que implica el empaquetamiento y la replicación de los 11 segmentos de polaridad positiva de RNA para generar los segmentos genómicos virales de doble cadena (Carreño-Torres *et al.*, 2010).

El papel preciso de las proteínas no estructurales en los viroplasmas aún no se ha caracterizado completamente. NSP2 es una proteína de 35 kDa que une RNAs de cadena simple de una manera no específica y se autoensambla en octámeros estables que tienen NTPasa  $Mg^{2+}$  - dependiente y actividades hélice-desestabilizadoras (Taraporewala y Patton, 2001; Jiang *et al.*, 2006). Por su lado, NSP5 (con un total de 198 aminoácidos) es una fosfoproteína ácida O-GlcNAc-glicosilada, con un alto número de lisinas en su extremo C-terminal (Eichwald *et al.*, 2004), se autoensambla en dímeros y también se une al RNA de manera no específica (Vende *et al.*, 2002).

Durante la infección viral, NSP5 se somete a un complejo proceso de fosforilación, donde hay aparición de varias isoformas, de las cuales la más abundante tiene una masa molecular aparente de 28 kDa, seguido por una de 26 kDa y por otras que van desde 32 a 34 kDa. Cuando NSP5 se expresa sola, se acumula en el citoplasma con una distribución homogénea sobre todo como la isoforma de 26 kDa (con muy bajo nivel de fosforilación o no fosforilada) (Afrikanova *et al.*, 1996). Curiosamente, cuando NSP5 es co-expresada con NSP2 en células infectadas, las dos proteínas interactúan y NSP5 se convierte en hiperfosforilada produciendo isoformas de mayor masa molecular aparente (Afrikanova *et al.*, 1998; Criglar *et al.*, 2013). Una segunda consecuencia de la interacción directa con NSP2 es su relocalización dentro de estructuras discretas que morfológicamente asemejan a los viroplasmas, a las cuales se les ha nombrado VLS (estructuras como viroplasma) (Fabbretti *et al.*, 1999; citado en Contin *et al.*, 2010). Esta propiedad es más probable en un cambio conformacional de NSP5 específicamente inducida por la interacción con NSP2, ya que la interacción con la polimerasa viral VP1 no induce la formación de VLS (Arnoldi *et al.*, 2007).

Surcos en el octámero NSP2 son sitios necesarios por los que NSP5 y ssRNA compiten, esto posiblemente regula el balance entre la traducción y replicación del RNA. (Jiang *et al.*, 2006).

NSP4, una glicoproteína de transmembrana, se localiza principalmente en el retículo endoplásmico (ER) y tiene múltiples funciones: (1) Funciona como un receptor

intracelular para DLPs mediante la interacción con VP6 (Taylor *et al.*, 1996). (2) Se libera  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular de los almacenes, actuando como una viroporina (Hyser *et al.*, 2012), lo cual eleva los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, necesario para estabilizar la capa externa de TLP (Hyser *et al.*, 2013). (3) NSP4 forma tapas en los viroplasmos y se co-localiza con la proteína de autofagia LC3 (Berkova *et al.*, 2006). Al desencadenar un aumento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , se activa una ruta dependiente de la quinasa, lo cual conduce a la autofagia (Crawford y Estes, 2013). (4) NSP4 altera la permeabilidad de la membrana plasmática (Newton *et al.*, 1997), y desestabiliza uniones intercelulares (Tian *et al.*, 1996). (5) Su función más importante, NSP4 actúa como una enterotoxina viral (Ball *et al.*, 1996). Es secretada poco después de la infección por RV, ya sea como un fragmento de péptido o como una molécula completa (Bugarcic y Taylor, 2006) e interactúa con las células intestinales no infectadas a través de las integrinas  $\alpha 1\beta 1$  y  $\alpha 2\beta 1$ , receptores situados en sus membranas plasmáticas basolaterales (Seo *et al.*, 2008). La activación de dichos receptores, estimulan cascadas de reacciones intracelulares que se correlacionan con la liberación intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Recientemente se ha informado de que los viroplasmos reclutan gotas de lípidos (LDs) durante la replicación viral (Cheung *et al.*, 2010). LDs son orgánulos celulares que actúan como depósitos de colesterol (CH) y grasas neutras, en particular los triglicéridos (TAGs) y ésteres de colesterol (CEs), y más de 100 especies de proteínas se incorporan en su membrana de fosfolípidos de una sola capa. La morfología de los LDs y su composición son muy dinámicos (Guo *et al.*, 2009), tienen perfiles proteómicos heterogéneos (Ducharme y Bickel, 2008) y adquieren TAGs a tasas variables y la composición de su monocapa de fosfolípidos es flexible (Kuerschner *et al.*, 2008).

Recientes estudios demuestran la estrecha relación existente entre los LDs y los viroplasmos; sus interacciones parecen ser requeridas para la formación de viroplasmos funcionales y la producción de progenie viral infecciosa (Gaunt *et al.*, 2013). La formación de los viroplasmos ha sido estudiada mediante el uso de electrones o microscopía de fluorescencia, sin embargo, a pesar de su importancia

en el ciclo de replicación de rotavirus, poco se sabe acerca de sus dinámicas de formación (Carreño-Torres *et al.*, 2010).

#### 2.1.6.5. Empaquetamiento y formación de DLP's

Debido a su longitud, los RNA's de doble cadena desnudos no pueden ser empaquetados en el núcleo. Más bien, los 11 segmentos positivos de ssRNA son reordenados, e interactúan con las proteínas del núcleo viral y posteriormente se empaquetan y replican. Se supone que los complejos primarios de replicación de VP1, VP3 y ssRNA interactúan con un decámero VP2 (probablemente en los que están implicadas NSP5 y NSP2) (Berois *et al.*, 2003), lo que lleva a la formación de partículas de núcleo. Durante este proceso, la carga negativa del RNA tiene que ser neutralizada por el co-embalaje de cualquiera de los cationes divalentes o espermidina, un compuesto celular catiónico trivalente (Desselberger *et al.*, 2013).

El dominio N-terminal de VP2 es esencial para la encapsidación de VP1 (y la adjunción de ssRNA) (Boudreaux *et al.*, 2013). La formación de complejos con VP2 es esencial para la actividad RdRp de VP1. Actualmente no está claro el cómo se controla el embalaje correcto de los 11 segmentos de RNA en partículas individuales. Una vez formadas, las partículas del núcleo se transcapsidan rápidamente por VP6, lo que lleva a la síntesis de los DLP's (Desselberger *et al.*, 2013).

#### 2.1.6.6. Maduración y liberación de los viriones

Una vez formados los DLP's, éstos salen de los viroplasmos y viajan a través del retículo endoplásmico (ER) para su maduración. En este proceso, NSP4 sirve como un receptor intercelular mediante la interacción con VP6 (Taylor *et al.*, 1996). Dentro del ER, las nuevas partículas se encuentran envueltas transitoriamente, sin embargo dicha envoltura se pierde cuando las partículas adquieren la capa externa que consiste en 60 trímeros de VP4 y 260 trímeros de VP7 (Estes y Greenberg, 2013).

Experimentos de transcapsidación *in vitro* han demostrado que los DLP's interactúan primeramente con VP4, seguido por la interacción con VP7, formando de ésta manera TLP's infecciosas (Trask y Dormitzer, 2006; Estes y Kapikian, 2007).

Los viriones son liberados de las células no polarizadas (MA104) por lisis (Estes y Kapikian, 2007), sin embargo, a partir de células epiteliales, por una especie de proceso en gemación, las partículas virales pueden salir de la célula sin matarla inmediatamente (Gardet *et al.*, 2006).

### 2.1.7. Patogénesis de la infección por Rotavirus

Rotavirus se replica en el citoplasma de las células epiteliales de las vellosidades del intestino delgado, siendo el yeyuno la porción más afectada, sin embargo, puede extenderse a través de la mucosa intestinal sin afectar directamente el colon (Jourdan *et al.*, 1998). Los enterocitos maduros del ápice de las vellosidades son células diferenciadas cuyas funciones son tanto digestivas como de hidrólisis de disacáridos, así como funciones de absorción tales como el transporte de agua y electrolitos. La infección viral selectiva de estas células conduce generalmente a su destrucción y su contenido se excreta junto con las partículas virales en las heces fecales produciendo un desequilibrio en la relación entre absorción y secreción del líquido intestinal y malabsorción de carbohidratos complejos (Nabuurs, 1998).

Los enterocitos de la cripta madura son reemplazados por las células de la cripta secretoria, las cuales son células indiferenciadas que no poseen enzimas hidrolíticas y que ejercen una secreción neta de agua y electrolitos, por lo que se reducen los niveles de sodio y potasio intracelularmente por pérdida de la actividad de la adenosintrifosfatasa y del transporte de sodio acoplado a la glucosa (Tolia y Dubais, 1985; citados en González *et al.*, 2003).

Los síntomas y signos de la infección por Rotavirus se sustentan en varios mecanismos fisiopatológicos distintos, cuya intensidad y consecuencias varían de acuerdo con grado de infección (Didsbury *et al.*, 2011). El principal signo manifestado en la infección por Rotavirus es la diarrea aguda, la cual se define como un cuadro caracterizado por la presencia de deposiciones incrementadas en

frecuencia, alteración en la consistencia (líquida o semilíquida) (Sierra, 1997; citado en Díaz *et al.*, 2009), generando una pérdida excesiva de líquidos y electrolitos causado básicamente por un transporte intestinal anormal de los solutos (Hamilton, 2005).

Por lo general, inicialmente se produce una diarrea osmótica, la cual se presenta por un aumento importante en el lumen intestinal de solutos osmóticamente activos (Díaz *et al.*, 2009), en su mayoría carbohidratos (disacáridos), aminoácidos y diversos iones. La fuerza osmótica de dichos solutos extrae rápidamente el agua y los iones ( $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ) hacia la luz intestinal, donde estos son disueltos. Al haber una mayor cantidad de agua, se genera una disminución de la osmolaridad intraluminal y dilatación intestinal, lo que a su vez induce a un aumento en la motilidad y en la velocidad de tránsito, disminución del tiempo de contacto del contenido con la mucosa intestinal, disminución de la absorción y finalmente una diarrea acuosa. Todo este proceso puede ser consecuencia de una alteración en el transporte (malabsorción), por déficit de disacaridasas, por la ingesta de solutos no absorbibles, o como consecuencia de lesiones en las vellosidades intestinales generadas por algún agente infeccioso (Riverón, 1999).

La glicoproteína no estructural NSP4 es la única proteína viral en la actualidad que se cree funciona como una enterotoxina (Lorrot y Vasseur, 2007; Ousingsawat *et al.*, 2011). Se sintetiza como una glicoproteína de transmembrana intracelular y como tal, es esencial para el ensamblaje del virus. Sin embargo a pesar de la retención del dominio transmembrana, la NSP4 secretada permanece soluble en un entorno acuoso como una lipoproteína oligomérica que puede unirse a diversos tipos de células a través de una interacción con glicosaminoglicanos. La exhibición de este amplio tropismo celular se piensa puede tener repercusiones en la fisiopatología de la enfermedad por Rotavirus (Didsbury *et al.*, 2011).

La actividad enterotóxica atribuida a NSP4, supone que rotavirus puede inducir diarrea secretora sin causar ningún daño estructural a los enterocitos (Lorrot y Vasseur, 2007; Ousingsawat *et al.*, 2011). Esta diarrea resulta de la sobre estimulación de la actividad secretora del tracto intestinal, de tal manera, la diarrea

se produce cuando la secreción de agua en el lumen intestinal excede la capacidad de absorción.

NSP4 genera un aumento de calcio intracelular (Díaz *et al.*, 2008; Didsbury *et al.*, 2011), el cual interviene en la activación y apertura de los canales de cloro con el consiguiente efecto secretor (Murek *et al.*, 2009).

El epitelio del intestino delgado se encuentra formado por enterocitos (tanto los que se encuentran en la parte superior de las vellosidades, llamados maduros, como los de la de la cripta secretoria, o inmaduros) apilados de tal manera que forman una barrera estrecha que restringe el flujo de contenido luminal a la sangre y a los vasos linfáticos y viceversa. Por lo general, dichas uniones son de baja resistencia, lo que significa que la mayor parte de la permeabilidad pasiva del epitelio a los iones monovalentes pequeños y al agua reside en estos complejos de unión (Madara, 1987).

Se ha encontrado que NSP4 causa una interrupción de dichas uniones, generando una reducción en la resistencia transepitelial acompañada por un aumento en la permeabilidad paracelular del flujo de líquidos y electrolitos (Tafazoli *et al.*, 2001). Finalmente, NSP4 también puede generar secreción de cloro de las células de las criptas al estimular el Sistema Nervioso Entérico sin que existan lesiones epiteliales importantes (Lundgren y Svensson, 2001; González *et al.*, 2003).

#### 2.1.8. Fisiopatología de la enfermedad por Rotavirus

La fisiopatología de la diarrea por Rotavirus es el resultado de muchos factores donde los cambios en la homeostasis iónica conducen a la disfunción del enterocito; se produce aumento de la secreción, motilidad alterada, muerte celular y reducción de la absorción en la superficie del intestino, generando por tanto una mala absorción (Greenberg *et al.*, 1994; Michelangeli y Ruiz, 2003).

La alteración de los enterocitos infectados puede servir también para liberar la progenie de virus y productos de la síntesis vírica, generando una amplificación adicional de la enfermedad (Ruíz *et al.*, 2009).

La infección por Rotavirus de la célula huésped se caracteriza por una serie de interacciones virus-célula dependientes de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (Ruíz *et al.*, 2000). Durante el ciclo de replicación, desde la entrada hasta la liberación de partículas recién formadas, la formación de viriones se realiza a través de diferentes compartimentos celulares, cada uno caracterizado por una distinta participación de  $\text{Ca}^{2+}$ , el cual es determinante para el proceso de replicación (Ruíz *et al.*, 2009).

Se plantea la hipótesis de que NSP4 sintetizada en el RE viaja a la membrana plasmática para formar un canal o activar una vía celular de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esto induce un aumento progresivo de la permeabilidad en la membrana plasmática, lo que conduce a una elevación de la concentración citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  y aumenta los secuestrados de  $\text{Ca}^{2+}$  en las cisternas del RE (Michelangeli *et al.*, 1995; Ruíz *et al.*, 2000). Este efecto es probablemente debido a la activación de bombas de SERCA. La elevación de la concentración citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  puede ser responsable de la muerte celular inducida por la infección (Ruíz *et al.*, 2009).

Un aumento constante en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular induce la actividad de proteasas, lipasas y endonucleasas. La activación de proteasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  puede dañar al citoesqueleto y a las proteínas de membrana. La activación de las lipasas, cataliza la hidrólisis de los fosfolípidos de la membrana, además, la activación de las endonucleasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , provoca fragmentación del DNA el cual es un evento importante en la apoptosis (Dorado *et al.*, 2003).

La entrada masiva de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria hace que se forme el poro de transición en la membrana mitocondrial interna (MTP), llevando a un colapso en el potencial electroquímico de protones, lo que provoca una disminución en los niveles de ATP, lo cual resulta en una despolarización de la membrana plasmática y la entrada de más  $\text{Ca}^{2+}$  a través de varios canales iónicos creando un círculo vicioso que lleva consecuentemente a la muerte celular (Olanow, 1993).

#### 2.1.9. Determinación de los genotipos de Rotavirus

Como se mencionó anteriormente, la cápside externa de Rotavirus está constituida por las proteínas VP4 y VP7, las cuales son los principales

determinantes antigénicos (Estes y Kapikian, 2007), y es con base a sus características moleculares que se determinan los genotipos P y G respectivamente, así como la caracterización de las cepas de rotavirus (Martella *et al.*, 2003; Matthijnssens *et al.*, 2011<sup>a</sup>; Trojnar *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2013).

Desde que se reconoció a RVA como una causa importante de diarrea viral en mamíferos jóvenes, la diversidad genética de los genes que codifican VP7 y VP4 ha sido ampliamente estudiada (Matthijnssens *et al.*, 2009).

En todo el mundo, diversas combinaciones de genotipos G y P de RV han demostrado ser relativamente comunes a una especie hospedera en particular, por ejemplo, las combinaciones más típicas que se encuentran en los humanos son G1P[8], G3P[8], G4P[8], G9P[8], G12P[8] y G2P[4], siendo G1P[8] el más prevalente en todo el mundo (Bányai *et al.*, 2012; Ghosh y Kobayashi, 2011; Matthijnssens y Van Ranst, 2012; Santos y Hoshino, 2005).

En animales, las combinaciones de genotipo más comunes son G6, G8 y G10 con P[1], P[5], P[11] en bovinos; G3-G5, G9 y G11 con P[6] y P[7] en porcinos (Dhama *et al.*, 2009; Papp *et al.*, 2013<sup>a</sup>); G3 y G14 con P[12] en equinos (Papp *et al.*, 2013<sup>b</sup>); G3 con P[3] y P[9] en perros y gatos (Matthijnssens *et al.*, 2011<sup>b</sup>) y en conejos G3 con P[14] y P[22] (cuadro 3) (Bányai *et al.*, 2005; Ciarlet *et al.*, 1997; Cilli *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2012; Lavazza *et al.*, 2008; Martella *et al.*, 2003, 2004, 2005).

Cuadro 3. Combinaciones de genotipos P y G de RVA comúnmente encontrados en humanos y otros mamíferos. (Ghosh y Kobayashi, 2014; Lavazza *et al.*, 2008).

Especie hospedera	Genotipos comunes VP7 y VP4 de RVA
Humanos	G1-G4, G9, G12, P[4], P[6], P[8]
Ganado	G6, G8, G10, P[1], P[5], P[11]
Cerdos	G3-G5, G9, G11, P[6], P[7]
Caballos	G3, G14, P[12]
Gatos y perros	G3, P[3], P[9]
Conejos	G3, P[14], P[22]

Si bien la caracterización genética de Rotavirus se ha basado en el análisis molecular de dos de sus genes, se ha determinado que esta información podría no ser suficiente para obtener datos concluyentes acerca de la composición genética general de RV, así como el conocimiento de sus complejos patrones evolutivos, motivo por el cual se propuso un nuevo sistema de clasificación integral de acuerdo al genotipo para los 11 segmentos del genoma para su uso en la designación de nuevos genotipos. De esta manera se ha introducido un sistema basado en la secuencia de nucleótidos que comprende el genoma completo (constelación) de RVA (Matthijnssens *et al.*, 2008).

En dicha clasificación, el acrónimo Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx Tx-Ex-Hx, donde x es un número entero, define el genotipo de los genes VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5 respectivamente, de una determinada cepa de RVA. Así, todos los genes están identificados y diferenciados de acuerdo a determinados puntos de corte de las identidades de secuencia de nucleótidos (cuadro 4).

Cuadro 4. Genotipos de la especie A de Rotavirus. Tomado de Matthijnssens *et al.*, (2008).

RV proteína	Porcentaje de identidad <sup>a</sup>	Número de genotipos <sup>b</sup>	Genotipo (acrónimo subrayado)
VP7	80	36 G	<u>G</u> lycosylated (glucosilada)
VP4	80	51 P	<u>P</u> rotease-sensitive (sensible a la proteasa)
VP6	85	18 I	<u>I</u> nnner capsid (cápside interna)
VP1	83	9 R	<u>R</u> dRp <sup>c</sup>
VP2	84	9 C	<u>C</u> ore protein (proteína del núcleo)
VP3	81	8 M	<u>M</u> ethyltransferase (metiltransferasa)
NSP1	79	19 A	Interferon <u>A</u> ntagonist (antagonista del interferón)
NSP2	85	10 N	<u>N</u> TPase (NTPasa)
NSP3	85	12 T	<u>T</u> ranslation enhancer (potenciador de la

NSP4	85	15 E	traducción) Enterotoxin (enterotoxina)
NSP5	91	11 H	PHosphoprotein (fosfoproteína)

<sup>a</sup>Porcentaje de identidad de nucleótidos de corte que define genotipos.

<sup>b</sup>Rotavirus Classification Working Group, 2013.

<sup>c</sup>RNA dependiente de RNA polimerasa.

## 2.2. Rotavirus en conejos

Rotavirus especie A es considerado una de las principales causas de gastroenteritis viral aguda en diferentes especies animales, incluyendo conejos (cepa Lapine [LRV]) (Schoeb *et al.*, 1986). LRV se considera poco virulenta (Thouless *et al.*, 1988; EFSA, 2005), sin embargo, puede causar cuadros entéricos principalmente en conejos post-destete, además, también está implicada en la etiología de brotes de enteritis graves en asociación con bacterias, parásitos y otros virus. Los conejos se infectan por vía oro-fecal, la extensión y gravedad de las lesiones (degeneración de las microvellosidades, mala absorción y diarrea) dependen del número de partículas virales ingeridas. La persistencia de anticuerpos maternos (de 30 hasta 45 días) puede reducir los signos de la enfermedad, de este modo, conejos de 4-5 semanas de edad pueden tener una infección subclínica. La infección por rotavirus es más frecuente en conejos de 35 a 50 días de edad, se caracteriza por una alta tasa de morbilidad y la presencia de signos clínicos inespecíficos, tales como diarrea, deshidratación, distensión abdominal, anorexia, depresión, etc. La diarrea se presenta al principio de la excreción viral, la cual tiene una duración de 6-8 días, seguido generalmente por estreñimiento. Las lesiones observadas a la necropsia no son constantes, puede presentarse entero-tiflitis catarral, congestión gaseosa, líquida o semilíquida, adelgazamiento de las paredes intestinales, pérdida del epitelio intestinal e impactación cecal. Los conejos enfermos pueden morir debido a la deshidratación y a las infecciones secundarias, mientras que los que se recuperan comúnmente muestran una disminución de la productividad debido a la reducida capacidad de absorción (Martella *et al.*, 2004; Lavazza *et al.*, 2008).

En la mayoría de los informes, los conejos de 4 a 6 semanas de edad se ven afectados. Tanto la infección clínica como subclínica ocurre en colonias endémicamente infectadas, por otro lado, en colonias no infectadas, altos niveles de morbilidad y mortalidad se pueden producir en conejos de 1 a 3 semanas de edad, probablemente como resultado de la introducción repentina del virus (Thouless *et al.*, 1988; citado en Cilli *et al.*, 2013).

Aunque generalmente rotavirus se detecta en conejos post-destete con signología entérica, estudios seroepidemiológicos realizados en Italia han demostrado que la mayoría de los conejos adultos son seropositivos para Rotavirus, lo cual es un indicativo de que normalmente hay una circulación constante de pequeñas cantidades del virus en granjas cunícolas industriales (Martella *et al.*, 2004). Las enfermedades entéricas tienen un papel importante en los criaderos de animales de producción, ya que causan graves pérdidas económicas debido a la mortalidad, depresión del crecimiento y disminución del índice de conversión (EFSA, 2005; Lavazza *et al.*, 2008; Dhama *et al.*, 2009).

El diagnóstico virológico de rotavirus se puede realizar con muestras de heces, contenido y/o tejido intestinal mediante Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (PAGE), ELISA, Microscopía Electrónica de tinción negativa (Nsem) y a través de técnicas moleculares como Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa (RT-PCR), Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa en Tiempo Real (qRT-PCR), secuenciación y análisis filogenéticos (Lavazza *et al.*, 2008).

En un estudio realizado por Nieddu *et al.*, (2000), donde el objetivo fue estimar a través de Nsem la prevalencia de los diferentes virus en muestras de conejos con signología entérica durante el periodo comprendido entre 1982-1985 y 1990-1999, fueron examinadas 1067 muestras, 80% de las cuales proveían de conejos que presentaban entero-tiflitis catarral, hemorrágica o necrótica y el 20% restante mostraban enteropatía mucoide e impactación cecal. A través de ME, se observó la presencia de partículas virales en el 37.3% de todas las muestras. De este porcentaje, rotavirus fue identificado en 41.9%, virus parecidos a coronavirus en

25%, parvovirus en 21.1% y virus parecidos a enterovirus en 10.3% de las muestras positivas.

En 30 casos, observaron la presencia simultánea de 2 o 3 virus en una misma muestra. La disponibilidad de los resultados del análisis microbiológico y parasitológico permitió correlacionar las observaciones realizadas con ME con la presencia concomitante de otros agentes patógenos tales como *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) y *Staphylococcus aureus* en conejos lactantes; EPEC, *Clostridium spiroforme* y protozoos flagelados en los otros conejos.

La conclusión de este trabajo es que el complejo – enteritis del conejo de cría intensiva tiene una etiología determinada por muchos factores diferentes, en donde agentes víricos, bacterianos y parasitarios pueden infectar simultáneamente para producir enfermedad. Los virus y rotavirus en particular, no deberían ser capaces de inducir episodios primarios de alta gravedad, sino que actúan como agentes de virulencia media-leve, lo que explicaría su capacidad de convertirse en endémica. La situación de la cría de conejo intensiva, se caracteriza por una alta selección genética, acciones productivas exasperadas, superpoblación y la consiguiente alta contaminación ambiental de patógenos facultativos. Los autores señalan que tanto a estos virus como a otros agentes se les consideran menos o incluso ni siquiera son tomados en cuenta como posibles agentes causales de enteropatías; protozoos *flagellata* de género *Chilomastix* y *Monocercomonas*, podrían tener un papel importante en la aparición de enteritis grave en los conejos, al predisponer infecciones microbianas secundarias agravantes. Por otro lado, no descartan que los cambios en las condiciones fisiológicas y metabólicas, inducidos a nivel entérico por diversos factores, tanto alimentarios o no, puedan mejorar la replicación de los virus que normalmente están presentes en bajas concentraciones, lo cual permitiría explicar una acción patógena.

En otro trabajo realizado por Martella *et al.*, (2004), se analizaron aproximadamente 350 muestras fecales diarreicas de conejos de 25 a 60 días de edad para detectar la presencia de Rotavirus. Inicialmente, Rotavirus fue diagnosticado a través de microscopía electrónica, así como empleando un ensayo inmuno-enzimático

específico comercial de Rotavirus especie A. Una vez realizado el diagnóstico, se extrajo el material genético por adsorción sobre una membrana de celulosa CF11 directamente a partir de las muestras fecales. El gen completo que codifica para la proteína VP7 (1062 pb), se transcribió inversamente (RT) y se amplificó utilizando el kit GeneAmp RNA PCR Core (Applied Biosystems, Monza). El cDNA sintetizado se diluyó 1: 100 y se empleó como plantilla para una segunda amplificación por PCR, usando DNA polimerasa AmpliTaq Gold® (Applied Biosystems, Monza). Para la caracterización de tipo G, (G1 a G6 G8 a G11) se utilizaron diferentes conjuntos de cebadores específicos de tipo G. En ésta segunda amplificación, se emplearon diferentes grupos de cebadores específicos de tipo P, incluyendo los tipos más comunes P humanos y animales (P [1], P [4], P [5], P [6], P [7], P [8], P [9], P [10], P [11]) y los tipos Lapine P (P [14] y P [22]). Se realizó análisis de la secuencia después de la purificación del producto de PCR en columnas Ultrafree DA (Amicon Millipore, Bedford, EE.UU.), utilizando un ABI PRISM 377 (Applied Biosystems, Monza).

Los resultados obtenidos a partir de este estudio muestran que Rotavirus fue identificado en 62 (17,6%) de las 350 muestras analizadas. Se indica que la mayoría de los LRVs italianos fueron clasificados como G3 P[22], mientras que sólo se encontró una muestra que contenía el genotipo P[14]. De igual manera, sólo encontraron una muestra que contenía una mezcla de los virus G3 P[14] + P[22]. Todas las cepas LRV italianas muestran una especificidad del genotipo G3 para VP7. Rotavirus de genotipo G se ha descrito en un amplio espectro de especies animales, incluyendo los seres humanos. Sin embargo hasta ahora, es la única especificidad para VP7 de Rotavirus identificado en conejos. Los datos obtenidos confirman la gran conservación del gen VP7 de LRV.

Bányai *et al.*, (2005), señala que la aplicación de técnicas moleculares mejoradas en la detección y caracterización de cepas de Rotavirus ha llevado a la descripción de varias combinaciones nuevas, así como a la determinación de especificidades y variantes genéticas de los genes de las proteínas de la cápside externa, VP7 y VP4. A pesar de la enorme diversidad de cepas de Rotavirus de mamíferos, los pocos Rotavirus Lapine caracterizados hasta la fecha parecen tener una estrecha gama de

tales combinaciones de antígenos; solamente P[14] con G3 y, recientemente también P[22], por lo tanto se considera al genotipo G3 de RVA Lapine epidemiológicamente importante en conejos.

En su estudio, caracterizaron un Rotavirus especie A cepa Lapine con un electroferotipo corto, detectado en un brote de enteritis en un criadero comercial de Hungría. Sobre la base de la secuencia y análisis filogenético de las proteínas VP7, VP4 y NSP4, la cepa lapine caracterizada, poseía un genotipo G3 P[22], mismo que es compartido por la mayoría de los Rotavirus Lapine. Aunque el genotipo P[22] había sido recientemente identificado, la relativamente alta variación de la secuencia entre su cepa y los identificados en Italia (89,1 a 90,4% de identidad de nucleótidos), indica que estas cepas se diversificaron mucho antes de que se describieran por primera vez, lo que sugiere fuertemente que este genotipo pudo haber circulado en criaderos o en la naturaleza sin ser detectado antes. Por tal motivo se concluye que el genotipo P[22] de LRV muestra una dispersión geográfica más amplia de lo que se pensaba, aunque la comprensión de su verdadera situación epidemiológica necesita más investigación.

Lavazza *et al.*, (2008), llevó a cabo un estudio donde el objetivo fue afirmar el papel patogénico e importancia de Rotavirus como agente primario a través de la estimación de la prevalencia de LRV identificados por Nsem, en muestras de conejos que mostraban ya sea una enteropatía o lesiones atribuibles: impactación cecal, dilatación intestinal, entero-tiflitis, etc. Durante los años 2002 a 2007, doscientas cuarenta y tres muestras tomadas principalmente de conejos que mostraron entero-tiflitis catarral, hemorrágica o necrótica, enteropatía mucoide e impactación cecal fueron examinadas. Por Nsem, se observó la presencia de partículas virales en el 45,3% de ellas; Rotavirus se identificó en el 16,0%, partículas parecidas a coronavirus en el 24,7%, parvovirus en un 9,0% y partículas parecidas a enterovirus en un 5,8% de las muestras positivas. Además, adenovirus, calicivirus y reovirus se encontraron de forma esporádica y, en 29 casos, dos o tres virus diferentes se observaron en asociación en la misma muestra. Utilizando los criterios para la clasificación de cepas de Rotavirus en base a la genotipificación de VP4 (tipo

P) y VP7 (tipo G), casi todas las cepas fueron caracterizadas como G3 P[22], con lo que se confirmó la presencia del alelo reconocido recientemente de Rotavirus P [22] de VP4 en conejos italianos.

Al igual que en estudio de Nieddu *et al.*, (2000), se realizaron análisis microbiológicos y parasitológicos de las muestras; la disponibilidad de dichos resultados, permitieron correlacionar las observaciones Nsem con la presencia contemporánea de otros agentes patógenos, como *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) y *Staphylococcus aureus* en conejos lactantes, *Cl. spiroforme* y protozoos flagelados en los demás conejos. Discuten el papel patogénico y la importancia de Rotavirus como agente etiológico primario de enteritis en los conejos.

Los resultados que obtuvieron indican que la mayoría de los casos de enteritis en los conejos probablemente tenían múltiples etiologías y que la presencia viral no era absolutamente necesaria para la determinación de las lesiones entéricas, por el contrario, éstas podían estar inducidas por uno o más agentes. La conclusión de que no hay agentes patógenos específicos que puedan ser constantemente asociados a las enteropatías, ha llevado a la proposición de que el complejo – enteritis del conejo es un síndrome multifactorial, donde los microorganismos involucrados actúan sinérgicamente incrementando de esta manera su virulencia.

### 2.2.1. Identificación genética de Rotavirus en conejos

Rotavirus cepa Lapine se encuentra dentro de la especie A, subgrupo I; ha sido identificada en Canadá (LRV) (Petric *et al.*, 1978); Japón (R-2) (Sato *et al.*, 1982); Italia (82/311F) (Castrucci *et al.*, 1985), (30/96, 160/01, 229/01, 308/01) (Martella *et al.*, 2003), (30/96) (Matthijnssens *et al.*, 2006); Estados Unidos (ALA, C-11, BAP, BAP-2) (Conner *et al.*, 1988; Ciarlet *et al.*, 1997); Hungría (229-01, 3489/3) (Bányai *et al.*, 2005); China (N-5) (Guo *et al.*, 2012); Países Bajos (K1130027) (Schoondermark-van de Ven *et al.*, 2013) y Corea (13D025) (Kim *et al.*, 2013), (Rab1404) (Oem *et al.*, 2019), y las que han sido caracterizadas pertenecen en su mayoría al genotipo G3 de VP7 y al genotipo P[14] y P[22] de VP4 (cuadro 5).

El análisis de las cepas ha puesto de manifiesto una homogeneidad antigénica / genética sustancial de LRV (Martella *et al.*, 2003, 2004, 2005; Lavazza *et al.*, 2008; Cilli *et al.*, 2013). Con excepción de la cepa japonesa R-2, todas las cepas LRV poseen especificidad de SG I (Ciarlet *et al.*, 2000; Martella *et al.*, 2003).

Cuadro 5. Estudios mundiales sobre Rotavirus en conejos.

País	Autores	Cepa	Genotipo
Canadá	Petric <i>et al.</i> , 1978	LRV	*G3 P[14]
Japón	Sato <i>et al.</i> , 1982	R-2	*G3 P[14]
Italia	Castrucci <i>et al.</i> , 1985	82/311F	*G3 P[14]
E. U. A.	Conner <i>et al.</i> , 1988; Ciarlet <i>et al.</i> , 1997	ALA, C-11, BAP, BAP 2	G3 P[14]
Italia	Martella <i>et al.</i> , 2003; Matthijssens <i>et al.</i> , 2006	30/96, 160/01, 229/01 308/01	G3 P[14] y P[22]
Hungría	Bányai <i>et al.</i> , 2005	229-01, 3489/3	G3 P[22]
China	Guo <i>et al.</i> , 2012	N-5	G3 P[14]
Países Bajos	Schoondermark-van de Ven <i>et al.</i> , 2013	K1130027	G6 P[11]
Corea	Kim <i>et al.</i> , 2013	13D025	G3 P[3]
	Oem <i>et al.</i> , 2019	Rab1404	G3 P[22]

\*Caracterizaciones realizadas por Ciarlet *et al.*, (1997) y Hoshino *et al.*, (2002).

### 2.2.2. Constelaciones de Rotavirus lapine

Hasta el día de hoy, únicamente han sido caracterizados cuatro genomas completos de LRV: la cepa RVA/Rabbit-tc/ITA/30/96/1996/G3P[14] (30/96) en Italia (Martella *et al.*, 2003; Matthijssens *et al.*, 2006), la cepa RVA/Rabbit-tc/CHN/N5/1992/G3P[14] (N-5) en China (Guo *et al.*, 2012), la cepa RVA/Rabbit-tc/NLD/K1130027/2011/G6P[11] (K1130027) en los Países Bajos (Schoondermark-van de Ven *et al.*, 2013) y recientemente la cepa RVA/Rabbit-

wt/KOR/Rab1404/2014/G3P[22] (Rab1404) en Corea (Oem *et al.*, 2019), cuyas configuraciones genéticas se observan en el cuadro 6.

Si bien la cepa K1130027 fue aislada a partir de conejos, los análisis filogenéticos de los 11 segmentos indicaron que representaba una transmisión directa entre especies de una cepa RVA bovina a una colonia de conejos, motivo por el cual, dicha cepa no es considerada una cepa típica Lapine de RVA.

Cuadro 6. Constelaciones de genotipos de RV reportadas en conejos.

<b>Cepa</b>	<b>/</b>	<b>VP7</b>	<b>VP4</b>	<b>VP6</b>	<b>VP1</b>	<b>VP2</b>	<b>VP3</b>	<b>NSP1</b>	<b>NSP2</b>	<b>NSP3</b>	<b>NSP4</b>	<b>NSP5</b>
<b>Gen</b>												
30/96		G3	P[14]	I2	R2	C2	M3	A9	N2	T6	E5	H3
N-5		G3	P[14]	I17	R3	C3	M3	A9	N1	T1	E3	H2
Rab1404		G3	P[22]	I2	R3	C3	M3	A9	N2	T3	E3	H3
K1130027		G6	P[11]	I2	R2	C2	M2	A13	N2	T6	E2	H3

El genoma completo de la cepa italiana 30/96 contenía un total de 18,504 nucleótidos, codificando un total 5,797 aminoácidos. Los análisis filogenéticos mostraron una evidente diferencia entre las secuencias de la cepa 30/96 y secuencias de RVA de otras especies hospederas, tanto a nivel de nucleótidos como de aminoácidos, al asociarse en clados separados y exclusivos. Sólo las secuencias correspondientes a VP4, VP7, NSP1 y NSP4 se asociaron con secuencias previamente reportadas de LRV de las cepas estadounidenses ALA, BAP, BAP-2 y C-11 e italianas 308/01, 160/01 y 229/01, lo cual daba las primeras evidencias del alto nivel de homogeneidad genética de LRV.

La cepa N-5, aislada en China, contenía un total de 18,804 nucleótidos, que codificaron un total de 5,796 aminoácidos. Los análisis correspondientes demostraron que el gen VP7 exhibía identidades de secuencia de nucleótidos de 78.6 – 97.2% con cepas de Rotavirus G3 humano (B4106), simio (RRV, TUCH), canino (CU-1, K9, A79-10), felino (Cat2, Cat97) y lapine (30/96). El gen VP4 mostró identidades de secuencia de nucleótidos máximas de 80.6 – 85.5% con cepas de rotavirus humano (B4106), lapine (30/96) y ovino (OVR762), todas compartiendo el

genotipo P[14]. Por otro lado, VP4 de la cepa N5 también mostró una similitud de 80.0 – 81.5% a nivel de nucleótidos con las cepas de rotavirus P[14] 30/96, C11, ALA y BAP-2, y 62.3 – 63.6% con las cepas P[22] 308/01, 160/01, 229/01.

El gen VP6 mostró una similitud de 68.5 – 81.2% a nivel de nucleótidos con otras cepas de referencia del genotipo I, sin embargo, estos valores de identidad de secuencia fueron más bajos que los porcentajes de corte determinados por el Grupo de Trabajo de Clasificación de Rotavirus (RCWG por sus siglas en inglés [Rotavirus Classification Working Group]), el cual corresponde a 85% para el gen VP6 (Matthijnssens *et al.*, 2008), para su asignación a uno de los genotipos I establecidos, por lo tanto, el gen VP6 de la cepa N5 fue asignado al nuevo genotipo I17.

Por su parte, los genes VP1, VP2, VP3, NSP1, NSP2 y NSP4 mostraron estar estrechamente relacionados con los genes de la cepa simia TUCH; NSP3 y NSP5 con las cepas humanas Wa y 69M. Las cepas de simio RRV y TUCH compartieron su ascendencia con Rotavirus caninos / felinos y mostraron una estrecha relación con Rotavirus humanos T152 / parecidos a felinos.

Comparaciones con los genotipos de las cepas de simio TUCH y RRV, las cepas caninas A79-10, CU-1, K9, las cepas felinas Cat2 y Cat97, y las cepas humanas T152 y 69M, demostraron que la cepa china N-5 posiblemente era de origen felino / canino, o era el resultado de reordenamientos múltiple involucrando Rotavirus caninos, felinos y humanos.

La cepa de LRV Rab1404, caracterizada en la República de Corea, mostró ser diferente en cinco genes (VP1, VP2, VP4, NSP3 y NSP4) respecto a la cepa 30/96 y la cepa N-5 (VP4, VP6, NSP2, NSP3 y NSP5), mientras que fue diferente en ocho genes (VP1, VP2, VP3, VP4, VP7, NSP1, NSP3 y NSP4) comparada con la cepa K1130027, sin embargo, compartió ocho genes idénticos (VP1, VP2, VP3, VP6, VP7, NSP1, NSP2 y NSP5) con la cepa humana parecida a bovino RCH272 y la cepa de simio RRV (VP2, VP3, VP6, VP7, NSP1, NSP2, NSP3 y NSP4). Además,

Rab1404 compartió siete genotipos con la cepa canina CU-1, la cepa humana parecida a canino HCR3A, la cepa de murciélago LZHP2 y la cepa equina E3198.

El gen VP7 de Rab1404 mostró estar más relacionado con las cepas de murciélagos chinos MYAS33 (91.0%) y LZHP2 (91.3%), y la cepa de caballo argentino E3198 (91.1%), pero no con las cepas LRV. La secuencia de VP4 exhibió una similitud máxima de nucleótidos de 97.8% con la cepa lapine húngara 3489/3, seguida de una similitud de 89.4, 88.8 y 87.7% con las cepas italianas 229/01, 160/01 y 308/01 respectivamente. El gen VP6 mostró estar más relacionado con la cepa 30/96 (95.9%) así como con las cepas humanas similares a la lapine B4106 (96.7%) y BE5028 (97.3%).

Los genes VP1, VP2 y VP3 mostraron estar estrechamente relacionados con las cepas LZHP2 (95.7%), MYAS33 (93.2%) y RRV (88,2%), respectivamente, mientras que los genes NSP1, NSP3 y NSP4 de Rab1404 estaban relacionados con RRV (92.0%, 94.7% y 95.3%) y E3198 (89.5%, 92.9% y 93.3%). NSP2 y NSP5 se asociaron con las cepas lapine 30/96 (94.3% y 93.2%), K1130027 (89.8% para ambos genes), B4106 (97.8% y 98.4%), y BE5028 (98.0% y 98.1%), respectivamente.

Rab1404 mostró compartir 3 genotipos con las cepas 30/96 y N-5, mientras que fue diferente para los otros 8. Considerando el origen de las cepas lapine (conejos), sigue sin ser clara la razón subyacente a las diferencias en los genotipos, sin embargo, se plantea que el origen / antepasado de las diferentes cepas lapine es diferente. En el caso particular de la cepa Rab1404, los resultados indican que está más estrechamente relacionada con el ancestro canino / felino de RRV.

### 3. Planteamiento del problema

Rotavirus es considerado una de las principales causas de diarrea viral en diversas especies animales en todo el mundo, incluyendo conejos.

Un número limitado de estudios han investigado las características moleculares de rotavirus infectante de conejos, existiendo pocas cepas Lapine aisladas y parcialmente caracterizadas. Dicha situación pone de manifiesto una falta importante de conocimiento respecto a la composición genética de rotavirus circulante tanto en poblaciones de conejos silvestres, como en granjas de producción cunícola.

El constante crecimiento de la cunicultura en México conlleva al incremento del contacto o interacción física conejo – conejo y humano – conejo, situación que podría generar un mayor riesgo exposición y transmisión de enfermedades, ya sean entre las mismas especies, o bien, de carácter antropozoonótico o zoonótico.

La naturaleza segmentada del genoma de rotavirus le confiere la capacidad de generar eventos de recombinación y reordenamientos genéticos, además de la presentación de mutaciones puntuales en cada segmento de dsRNA. Dichas características le permiten cruzar las barreras interespecies e infectar distintas poblaciones animales, dentro de las que se incluyen la población cunícola y humana. Sin el conocimiento de la composición genética de rotavirus, así como de sus características moleculares, es imposible conocer el origen filogenético de cada segmento de su genoma, así como el origen de una cepa determinada, de la misma manera, será imposible comprender y realizar predicciones sustentadas sobre sus complejos patrones evolutivos.

Desde que se reconoció a RVA como una causa importante de diarrea viral en mamíferos jóvenes, sus características y diversidad genética han sido ampliamente estudiadas en humanos y en algunas especies de importancia productiva, sin embargo, la investigación sobre rotavirus infectante de conejos es escasa.

#### 4. Justificación

El genoma de rotavirus infectante de conejos ha sido total y parcialmente caracterizado en diferentes países, sin embargo, no existen reportes sobre las características moleculares de RV en conejos en México.

En nuestro país, la producción cunícola es una actividad pecuaria creciente; en el año 2016, la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación estimó que la producción total nacional superó las 15,000 toneladas de carne de conejo, siendo el Estado de México la principal entidad productora, comercializadora y consumidora de dicho producto. Dentro de esta entidad, los municipios que registran una mayor producción son Amecameca, Texcoco, Teotihuacán, Toluca, Jilotepec y Atlacomulco.

La caracterización molecular de RV en México es importante para determinar su nivel de homogeneidad genética en comparación con las todas las cepas lapine reportadas.

El establecimiento de las relaciones filogenéticas de los genes de RV, contribuye al conocimiento de la dinámica evolutiva y epidemiológica del virus, además de la posibilidad de determinar las implicaciones biológicas que representa para la especie hospedera, para otras especies animales y para la población humana.

## 5. Hipótesis

Los genes asociados a virulencia de rotavirus infectante de conejos en el Estado de México, presentan una mayor asociación filogenética con genotipos de rotavirus humanos.

## 6. Objetivos

### 6.1. Objetivo general

Caracterizar los genotipos de rotavirus mediante los genes asociados a virulencia (VP3, VP4, VP7, NSP1 y NSP4), aislado a partir de conejos (*Oryctolagus cuniculus*) con signología entérica, procedentes de la principal entidad productora de México. **Objetivos Específicos**

1. Detectar rotavirus en muestras de conejos a través de Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (PAGE) y a través de Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa (RT-PCR).
2. Adaptar RV a cultivo celular (MA-104) a partir de las muestras positivas.
3. Secuenciar y comparar los amplicones obtenidos de los genes VP3, VP4, VP7, NSP1 y NSP4 con las registradas en diferentes bases de datos, así como asignar los genotipos a los segmentos de dsRNA.
4. Analizar filogenéticamente las secuencias de cada segmento y determinar las implicaciones biológicas de los resultados obtenidos.

## 7. Material y método

### 7.1. Diseño de estudio

#### **Tipo de investigación**

El presente estudio se desarrolló bajo un enfoque cualitativo, descriptivo no experimental y transversal.

#### **Localización del área de estudio**

El Estado de México se encuentra en la región más alta del país (altitud máxima de 5,500 metros sobre el nivel del mar), en la porción central de la República Mexicana. Al norte colinda con los estados de Querétaro e Hidalgo; al sur con los de Guerrero, Morelos y la Ciudad de México, al este con los de Tlaxcala y Puebla y al oeste con el de Michoacán. Se encuentra en una posición geográfica entre las coordenadas de 19° 21' 15" de latitud norte y 99° 37' 51" de longitud oeste. Predomina el templado sub-húmedo con lluvias en verano, temperatura media entre 10 y 16 °C, y precipitación anual entre 500 y 1500 mm.

#### **Población bajo estudio**

Fueron conejos con signología entérica (diarrea líquida, semilíquida o catarral, deshidratación, distensión abdominal, anorexia, depresión), procedentes de Amecameca, Texcoco y Teotihuacán; importantes municipios productores de carne de conejo ubicados en el Estado de México.

#### **Unidad de análisis**

Genes de rotavirus asociados a virulencia.

#### **Tipo de muestreo**

No probabilístico dirigido.

## **Lugar del estudio**

Laboratorio de Biotecnología, Biología Molecular y Genética, Universidad Autónoma del Estado de México, Centro Universitario UAEM Amecameca. Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia. Carretera Amecameca-Ayapango km 2.5, Amecameca, CP. 56900, Estado de México, México.

Laboratorio de Virología A1, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

Anfiteatro de la Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Centro Universitario UAEM Amecameca. Carretera Amecameca-Ayapango km 2.5, Amecameca, CP. 56900, Estado de México, México.

Laboratorio de Microbiología. Universidad Autónoma del Estado de México, Centro Universitario UAEM Amecameca. Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia. Carretera Amecameca-Ayapango km 2.5, Amecameca, CP. 56900, Estado de México, México.

## **Periodo**

El presente estudio se llevó a cabo en el periodo comprendido entre el mes de julio de 2018 al mes de marzo de 2020, Además, se procesaron y analizaron 40 muestras pertenecientes a un banco biológico del Laboratorio de Biotecnología, Biología Molecular y Genética, Centro Universitario UAEM Amecameca, del periodo 2014-2017.

### **7.2. Toma de muestra**

Una vez seleccionados los conejos, se realizó la toma de muestra para proceder a su análisis a través de PAGE y RT-PCR para la detección de rotavirus.

#### *Ante mortem*

Se colectó la mayor cantidad posible de muestra de heces de cada conejo (al menos 3 mililitros de heces líquidas o bien 3 gramos de heces blandas o sólidas) y se colocaron de forma individual en viales Eppendorf® de 1.6 ml, los cuales fueron

transportados en refrigeración al Laboratorio de Microbiología, donde se mantuvieron en congelación a - 20°C, hasta su análisis.

### *Post mortem*

En animales muertos dentro de un periodo no mayor a dos horas o bien animales con cuadro clínico entérico severo, fueron sacrificados de forma humanitaria siguiendo estrictamente los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-033-SAG/ZOO-2014, “Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres”, se les practicó necropsia utilizando instrumental y guantes estériles para cada caso.

Se tomaron muestras de heces, contenido intestinal y porciones de cada segmento de intestino delgado y grueso, las cuales fueron colectadas, transportadas y conservadas de la forma anteriormente descrita.

## 7.3. Procesamiento de la muestra

### 7.3.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)

Se llevó a cabo la extracción de RNA total a través de la técnica de fenol-cloroformo, de acuerdo con el siguiente protocolo:

- En un vial Eppendorf® de 1.6ml, colocar 100 microlitros (µl) de muestra, adicionar 200µl de solución PBS y homogeneizar.
- Tomar 200µl del homogeneizado y colocarlo en un vial nuevo, agregar 50µl de buffer disruptor 5x.
- Agregar 125µl de fenol y 125µl de cloroformo, homogeneizar en vortex por 2 minutos.
- Centrifugar a 10,000 revoluciones por minuto (rpm) por 5 minutos.
- Colectar todo el sobrenadante sin tocar la fase intermedia y colocarlo en un vial nuevo debidamente etiquetado.

Una vez obtenido el RNA total, este fue analizado por PAGE con el objetivo de obtener patrones electroforéticos característicos de los 11 segmentos de RNA de

doble cadena de rotavirus. La Electroforesis en Gel de Poliacrilamida se llevó a cabo siguiendo el siguiente protocolo:

- Al RNA extraído (190µl aproximadamente), añadir 21.1µl de azul de bromofenol en glicerol (buffer de carga), nueve partes del sobrenadante más una parte buffer de carga.
- Homogeneizar girando el vial varias veces.
- Correr el un gel de poliacrilamida al 7.5% con un grosor de 1 milimetro.

### **Gel inferior (7.5%)**

Reactivo	1 gel	2 geles
Agua Mili-q	11.08 ml	22.16 ml
Acryl-bis (30:0.8)	5.64 ml	11.28 ml
Tris 1.5 M, Ph 8.8	7.5 ml	11.28 ml
APS 10%	150 µl	200 µl
TEMED	15 µl	20 µl
Volumen total	22.5 ml	44.94 ml

### **Gel superior (5%)**

Reactivo	1 gel	2 geles
Agua Mili-q	4.48 ml	8.96 ml
Acryl-bis (30:0.8)	0.75 ml	1.5 ml
Tris 1.5 M, Ph 8.8	2.5 ml	5.0 ml
APS 10%	75 µl	150 µl
TEMED	7.5 µl	15 µl
Volumen total	7.8 ml	15.6 ml

- Elaborar el buffer de corrida: diluir el stock de 10x a 1x. En una probeta de 1 litro, colocar 900 ml de agua bidestilada.
- Adicionar 100 ml de buffer de corrida (10x), colocar papel parafilm y homogeneizar.

- Una vez polimerizado el gel superior, quitar peines y cargar 100µl de cada muestra.
- Armar la cámara de electroforesis vertical y llenar con buffer de corrida.
- Correr toda la noche a 360 mA/hr total (18 horas a 19 mA para 2 geles (si fuese 1 gel = 18 hrs a 10 mA, o 10 hrs a 18 mA).

### Tinción de gel con plata

- 1.- Fijar en agitación de 30 a 45 minutos en solución E 1X (Fijadora) [Solución E 10X, etanol - 287ml, ácido acético glacial - 3ml]. Retirar la solución.
- 2.- Incubar en agitación de 30 a 45 minutos en solución F 1X [Solución F 100X, AgNO<sub>3</sub> - 5.5g, H<sub>2</sub>O - 30 ml].
- 3.- Enjuagar brevemente con agua bidestilada, dos veces.
- 4.- Revelar con solución G 1X (Reveladora), hasta que las bandas sean visibles [Solución G, NaOH - 10M - 7ml, Formaldehído - 37% - 0.8 ml, H<sub>2</sub>O - 100ml]. Para un gel de 1mm se necesitan 100ml, para 2 geles de 1mm 200ml.
- 5.- Detener la reacción con Ácido Acético a 5%.
- 6.- Visualizar en transiluminador.

### Elaboración de soluciones

Solución	Reactivos	Cantidad	Concentración
<b>Buffer disruptor</b>	TRIS base pH 6.8	0.605 gr	0.05 M
	EDTA	1.46 gr	0.05 M
	SDS	5 gr	5%
	NaCl	0.29 gr	0.05 M
	H <sub>2</sub> O	100 ml	
<b>Buffer de carga</b>	Glicerina	9.72 ml	
	Azul de Bromofenol 3.5%	50 µl	*Disolver gota a gota añadiendo NaOH 1M

<b>Solucion E 10X</b>	Etanol	287 ml	
	Ácido acético glacial	3 ml	
<b>Solución F 100X</b>	AgNO <sub>3</sub>	5.5 gr	
	H <sub>2</sub> O	30 ml	
<b>Solución G</b>	NaOH	14 ml	10 M
	Formaldehido 37%	1.6 ml	
	H <sub>2</sub> O cbp	200 ml	
<b>Solución de paro</b>	Ácido acético	12.5 ml	
	H <sub>2</sub> O cbp	250 ml	
<b>Buffer de corrida 10X pH 8.3</b>	TRIS base	30.3 gr	0.25 M
	Glicina	144 gr	1.92 M
	H <sub>2</sub> O	1 L	
<b>Acrilamida–Bis 30:0.8</b>	Acrilamida	30gr	
	Bisacrilamida	0.8 gr	
	H <sub>2</sub> O	100 ml	

### 7.3.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa

Todas las muestras fueron procesadas por RT-PCR, en el Laboratorio de Biotecnología, Biología Molecular y Genética del Centro Universitario UAEM Amecameca.

Se llevó a cabo la extracción del RNA total de las muestras mediante la técnica de fenol – cloroformo, empleando TRI Reagent<sup>®</sup> (Zymo Reseach<sup>™</sup>), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Se realizaron RT-PCR's empleando el kit comercial SuperScript<sup>®</sup> III One Step RT-PCR with Platinum<sup>®</sup> Taq (Invitrogen<sup>™</sup>), para la identificación de RV mediante la amplificación de los genes VP6, VP4 y VP7. Para la detección de VP6, se emplearon los cebadores diseñados por Gómara *et al.*, (2002), los cuales

amplifican un fragmento de 379pb del gen VP6 (VP6-F [nt 747–766] 5' GACGGVGCRACTACATGGT 3' y VP6-R [nt 1126 a 1106] 5' GTCCAATTCATNCCTGGTGG 3'). Para VP4 se utilizaron los cebadores reportados por Gentsch *et al.*, (1992), para la amplificación de un fragmento de 876pb (Con 3 [nt 11–32] F 5' TGGCTTCGCCATTTTATAGACA 3' y Con 2 [nt 887–868] R 5' ATTCGGACCATTATAACC 3'). Para la amplificación completa de VP7, se utilizaron los cebadores Beg 9 (nt 1–28) F 5' GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG 3' y End 9 (nt 1062–1036) R 5' GGTCACATCATAAATTCTAATCTAAG 3' reportados por Gouvea *et al.*, (1990). Como control positivo para todas las reacciones, se empleó la vacuna pentavalente Rotateq (laboratorio Sanofi Pasteur MSD), la cual contiene cepas variantes humano-bovino de rotavirus: G1, G2, G3, G4 y P1A (genotipo P1[8]).

Los productos de PCR fueron colocados en geles de agarosa 2x teñidos con bromuro de etidio, seguido del proceso de electroforesis, con un tiempo de 30 minutos a 100 Volts. Los productos amplificados fueron visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta.

Las muestras positivas a rotavirus por PAGE y/o por RT-PCR, fueron candidatas para el intento de adaptación a condiciones de cultivo celular y posterior aislamiento viral.

### 7.3.3. Cultivo celular

El proceso de cultivo celular se llevó a cabo conforme al siguiente protocolo:

#### **Descongelamiento de células MA-104 (células de riñón de mono verde africano, *Chlorocebus* spp.)**

- Sacar las células MA-104 del contenedor con nitrógeno líquido y descongelar rápidamente en agua a 37 °C.
- En un tubo cónico estéril de 15 ml, colocar las células descongeladas y agregar 10 ml de MEM-10 (10 = 10% suero fetal bovino), mezclar gentilmente y centrifugar a 1000 rpm por 10 minutos.

- Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 5 ml de MEM-10.
- Agregar 10ml de MEM-10 en un frasco F75 (75 cm<sup>2</sup> Cell Culture Flask, Corning Incorporated COSTAR), incubar a 37 °C y posteriormente agregar los 5 ml con las células.
- Rotular el frasco indicando línea celular, número de pase, fecha y nombre de usuario.
- Incubar a 37 °C, en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%, hasta alcanzar confluencia.

#### **Subcultivo de células MA-104**

- El medio de cultivo deberá temperarse antes de ser utilizado.
- Eliminar el medio de cultivo del frasco que será subcultivado.
- Lavar la lámina de monocapa con 10 ml de verseno (EDTA sal disódica, PBS Sol. A), evitando agregar la solución directamente sobre las células.
- Desechar el sobrenadante. Realizar dos lavados.
- Añadir 5 ml de TRIPSINA-Verseno (EDTA), y distribuir el líquido uniformemente sobre toda la capa. Retirar el exceso dejando solamente de 1 a 1.5 ml.
- Incubar 5 minutos a 37 °C. Pasado el tiempo de incubación, dar pequeños golpes en el canto del frasco para disociar a las células.
- Agregar cuanto baste para 10 ml de MEM-10, y lavar la superficie del frasco donde se encontraban adheridas las células (solo se conservará el volumen a emplear para el subcultivo, el resto se desechará).
- Identificar el nuevo frasco con la rotulación antes mencionada.
- Incubar a 37 °C, CO<sub>2</sub> 5%, hasta alcanzar el nivel de confluencia deseada.

#### **Adaptación de rotavirus infectante de conejos a partir de heces o tejido**

El intento de adaptación de rotavirus previamente identificado en muestras se llevó a cabo de acuerdo con el siguiente protocolo (Urasawa *et al.*, 1981; Ward *et al.*, 1991; Arnold *et al.*, 2009):

1. **a)** En un vial Eppendorf® de 1.6ml, preparar un homogenizado de aproximadamente 15% (peso/volumen) de heces utilizando MEM sin suero (SS).  
**b)** En un vial Eppendorf® de 1.6ml, preparar un homogenizado de aproximadamente 15% (peso/volumen) de tejido previamente triturado con mortero u otra técnica, utilizando MEM-SS.
2. Centrifugar a 10,000 rpm a 4 °C por 15 minutos. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de 1.6 ml.
3. Por cada 1 ml de sobrenadante recuperado añadir:
  - 1.- 100 µl de penicilina/estreptomicina (stock 10,000 U penicilina, 10 mg estreptomicina por ml).
  - 2.- 100 µl de anfotericina B (stock 0.25 mg/ml).
  - 3.- 5 µl de tripsina (stock 2 mg/ml en MEM-SS).
4. Incubar 30 minutos (o 1 hora) a 37 °C.
5. Por cada 1 ml de sobrenadante recuperado, añadir:
  - 1.- 100 µl de gentamicina (stock 5 mg/ml).
6. Lavar los frascos F-75 con células MA-104 confluentes 2 veces con MEM-SS, y añadir 15 ml de MEM-SS.
7. Infectar 2 frascos F-75 por muestra, uno con 100 µl y otro con 10 µl del inoculo. Adsorber durante 1 hora a 37 °C, homogenizar cada 10 minutos.
8. Posterior a la incubación de 1 hora, lavar las células 2 veces con MEM-SS, añadir MEM-SS + 2 mg/ml de tripsina.
9. Incubar a 37 °C CO<sub>2</sub> 5%. Añadir cada tercer día 2 mg/ml de tripsina.
10. Cosechar cuando se observe efecto citopático o a los 5 días.
11. Congelar y descongelar una vez los frascos F-75, y dar un segundo pase, tratando el virus con tripsina y siguiendo los pasos 5 a 8.
12. Evaluar el dsRNA de rotavirus de ambos pases mediante PAGE y/o por RT-PCR. En caso de observarse bandas tenues, realizar un tercer pase. De no obtener resultados positivos, realizar los pases ciegos que se informe en la literatura.

#### 7.4. Análisis de resultados

Los fragmentos amplificados a través de RT-PCR, fueron purificados a partir de gel utilizando el QIAquick Gel Extraction Kit® (Qiagen™), según instrucciones del fabricante. Los fragmentos purificados fueron secuenciados en un ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Las secuencias obtenidas fueron empleadas para realizar la búsqueda de similitud y genotipado de secuencias de nucleótidos y aminoácidos empleando el programa BLAST (Herramienta de búsqueda básica de alineación local) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, Institutos Nacionales de la Salud, Bethesda, MD).

Las secuencias obtenidas fueron comparadas en alineamientos múltiples de secuencias con las secuencias reportadas a nivel mundial en diferentes bases de datos (GenBank, EMBL y DDBJ). Los análisis molecular y filogenético se llevaron a cabo mediante el software MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). Como herramienta complementaria para la asignación de genotipos, se empleó el programa de genotipado automático RotaC 2.0 para rotavirus especie A disponible en <http://rotac.regatools.be/> (Maes *et al.*, 2009).

## 8. Resultados

Se llevaron a cabo diversos muestreos en granjas de producción cunícola ubicadas en los municipios Amecameca, Texcoco, Teotihuacán y Toluca (figura 7).



Figura 7-A



Figura 7-B



Figura 7-C



Figura 7-D



Figura 7-E



Figura 7-F



Figura 7-G



Figura 7-H



Figura 7-I



Figura 7-J



Figura 7-K



Figura 7-L

Figura 7: A - L. Producciones cunícolas muestreadas.

Una vez concluido cada muestreo en campo, los conejos y/o heces fueron transportados al Anfiteatro y al Laboratorio de Microbiología del Centro Universitario UAEM Amecameca, donde se procedió a la toma e identificación de muestras de heces, contenido intestinal y tejido de todas las porciones de intestino delgado (duodeno, yeyuno, íleon) y grueso (ciego, colon, recto) (figura 8).



Figura 8-A



Figura 8-B



Figura 8-C



Figura 8-D



Figura 8-E



Figura 8-F

Figura 8: A - F. Procesos de necropsias y recolección de muestras.

Cada muestra de heces y/o contenido intestinal fue homogeneizada y dividida en cuatro porciones, de acuerdo con la actividad a realizar:

- Una porción para ser procesada a través de PAGE.

- Una porción para ser procesada a través de RT-PCR.
- Una porción para realizar cultivo celular.
- Una porción para almacenamiento (stock).

En total, se recolectaron 148 muestras procedentes de conejos con signología entérica (diarrea, distensión abdominal, depresión, anorexia, deshidratación).

### Electroforesis en gel de poliacrilamida

Las muestras fueron transportadas en congelamiento al Laboratorio de Virología A1, de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, donde fueron analizadas por PAGE (figura 9).

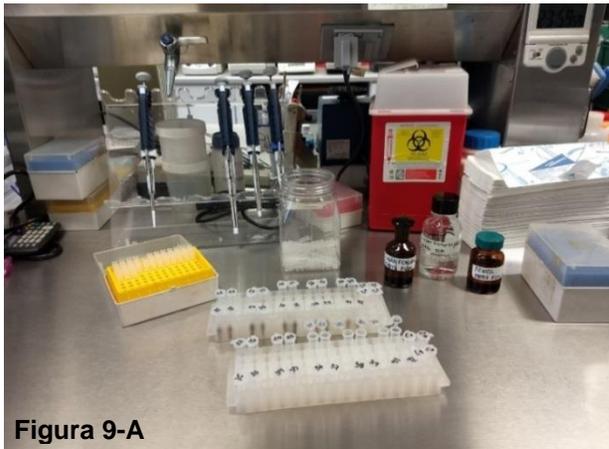


Figura 9-A



Figura 9-B

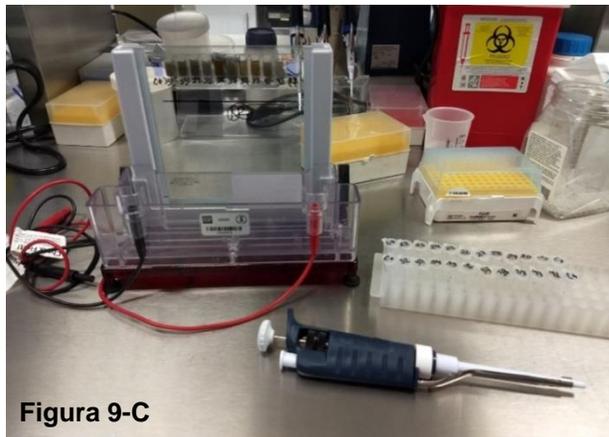


Figura 9-C



Figura 9-D

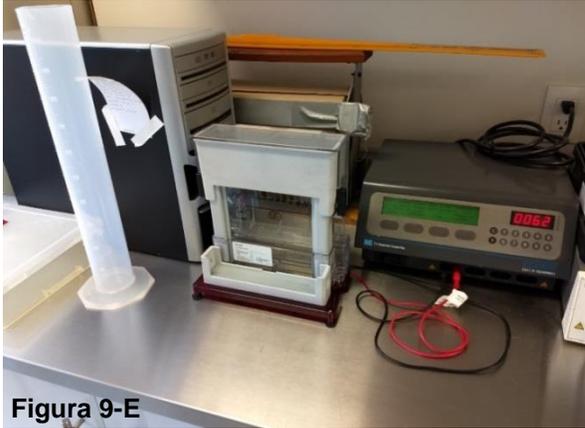


Figura 9-E

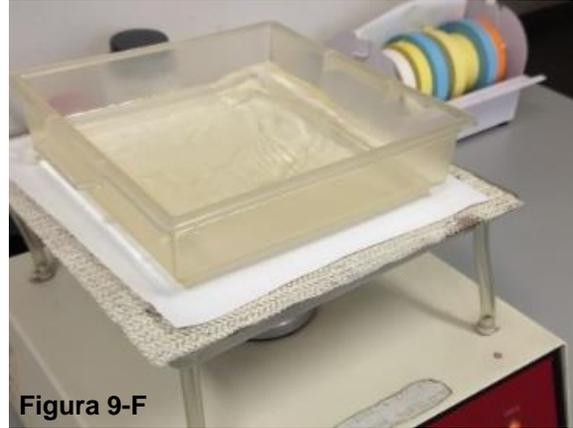


Figura 9-F

Figura 9: A - F. Procesamiento de muestras por Electroforesis en Gel de Poliacrilamida.

Tras la realización de distintos geles, en ninguno de ellos se logró apreciar el patrón electroforético característico de dsRNA de rotavirus (figura 10), sin embargo, las muestras no se consideraron negativas; se planteó la posibilidad de que Rotavirus estuviera presente en algunas de ellas, pero con una carga viral insuficiente para poder visualizar los segmentos de su genoma a través de esta técnica.

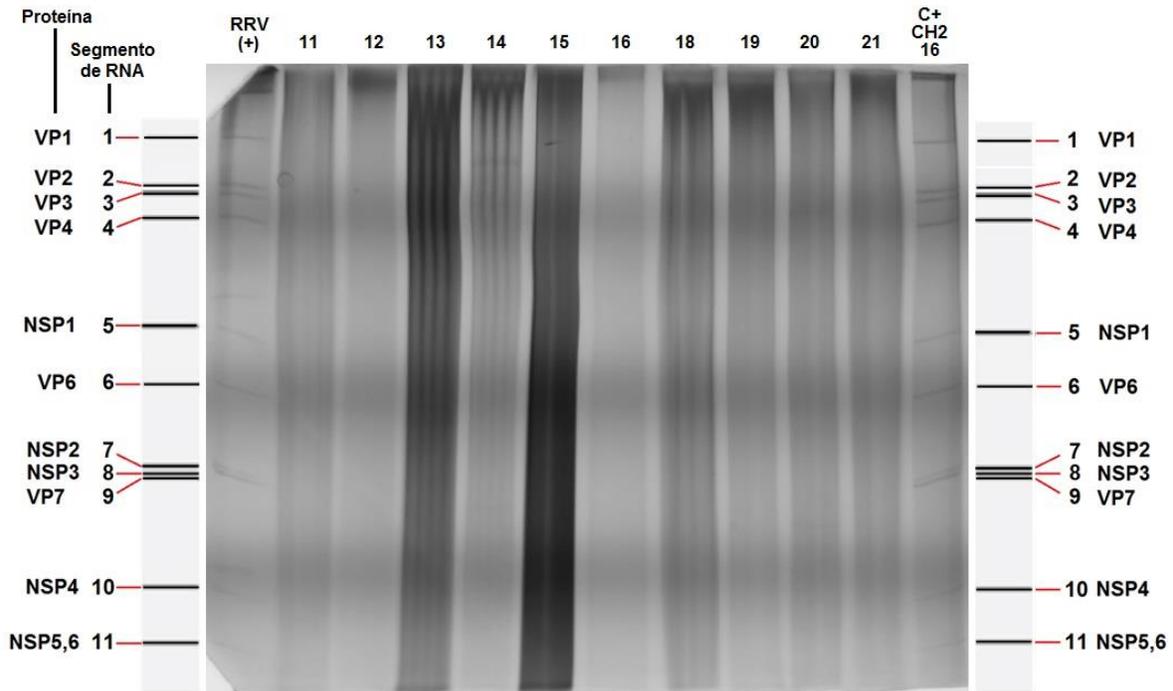


Figura 10-A

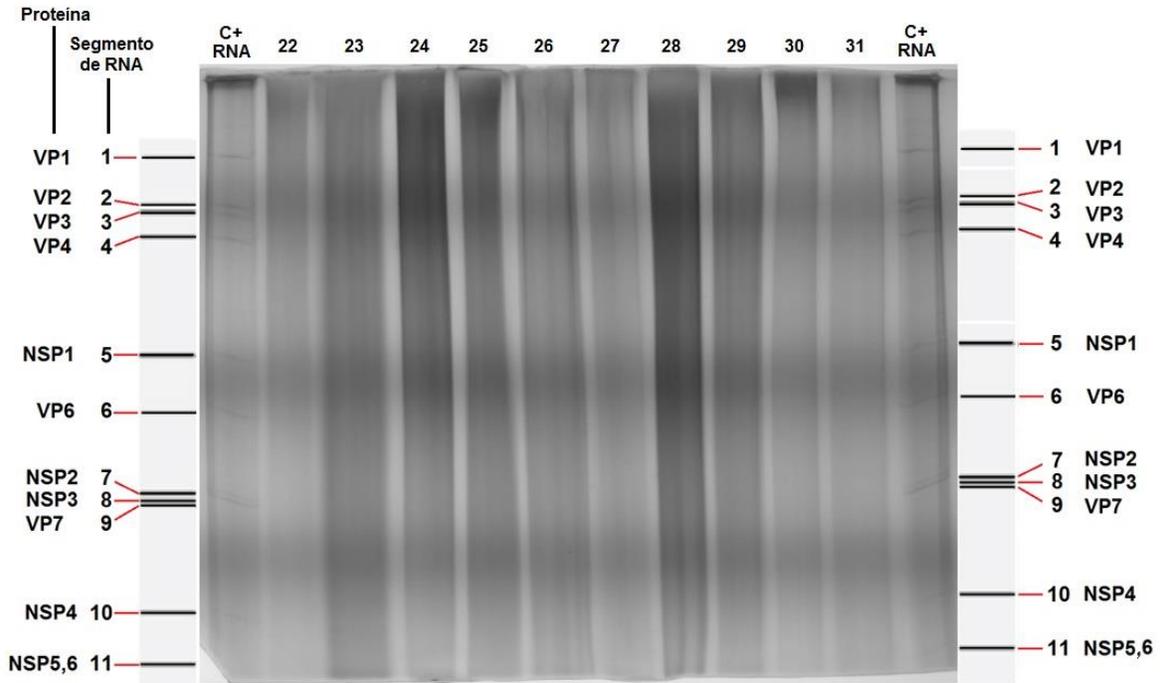


Figura 10-B

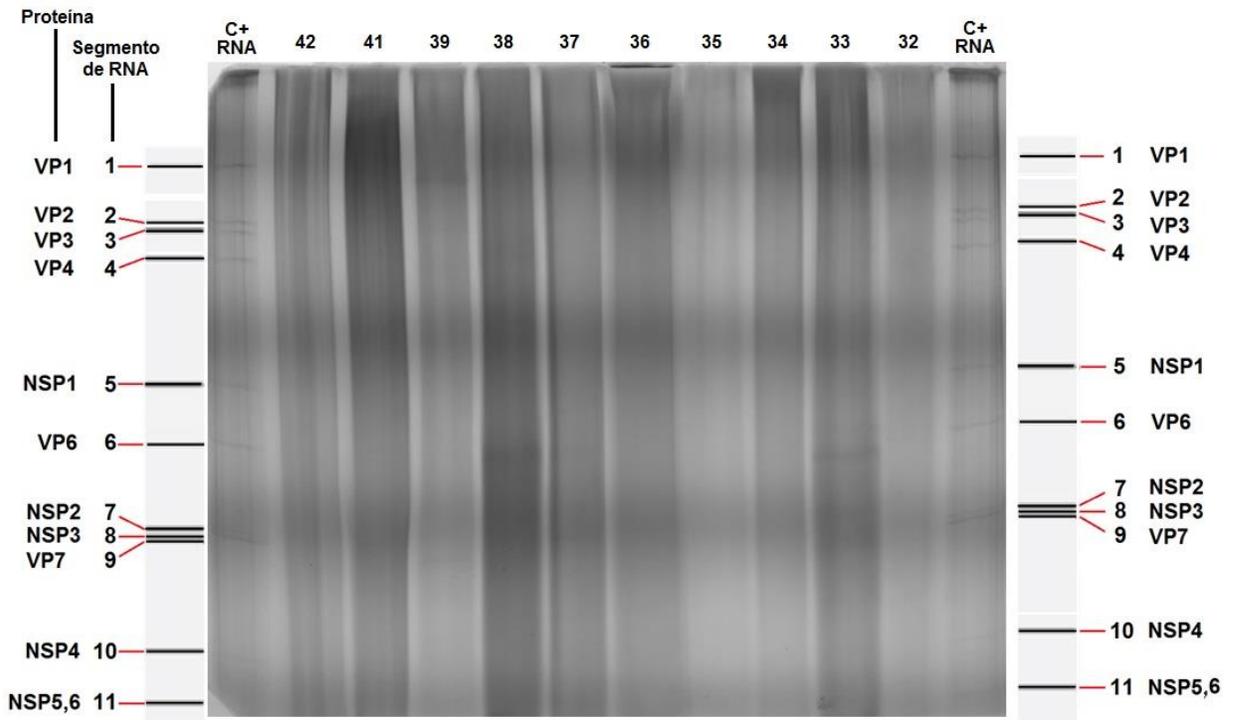


Figura 10-C

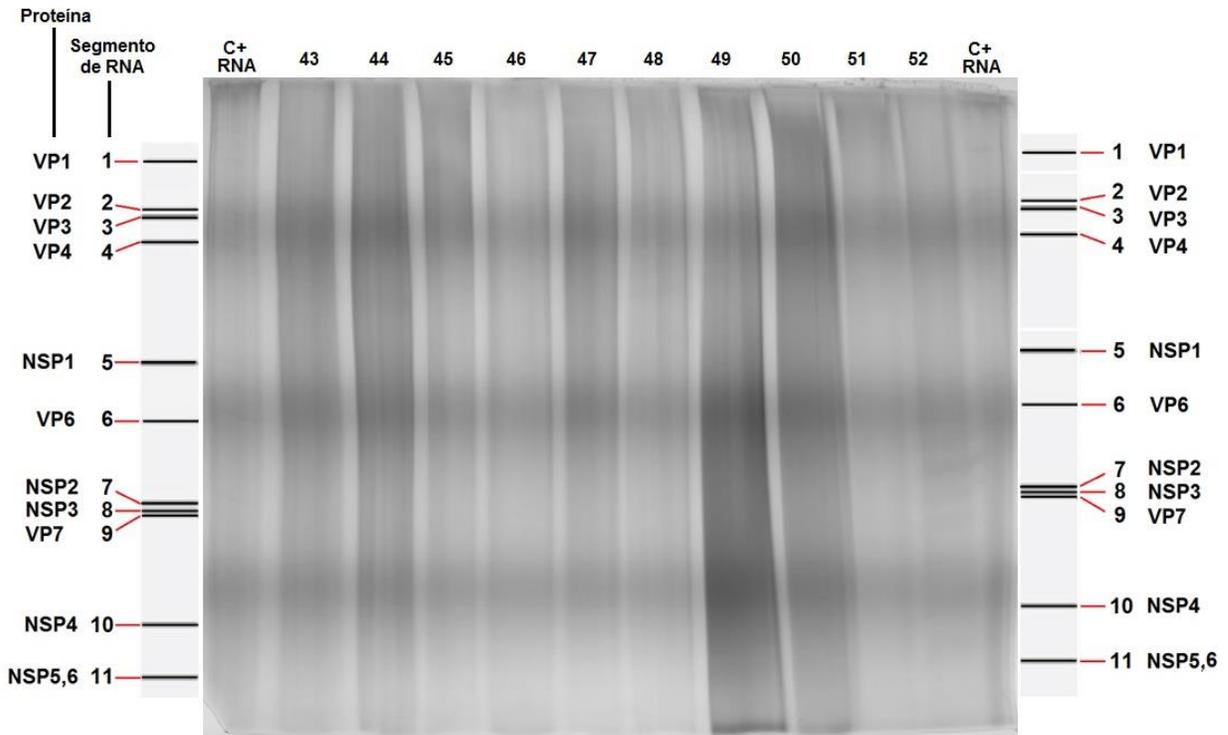


Figura 10-D

Figura 10: A - D. Geles de poliacrilamida tenidos con nitrato de plata donde se analizaron diferentes muestras para la detección de dsRNA de RV. RRV (+) y C+ RNA: control positivo de la extracción. CH2 16 (+): control positivo de la elaboración del gel y tinción.

### Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa

Todas las muestras fueron procesadas mediante RT-PCR, a través del uso de cebadores de diagnóstico para la amplificación parcial de los genes NSP3, VP7 y VP6 de rotavirus, en el Laboratorio de Biotecnología, Biología Molecular y Genética del Centro Universitario UAEM Amecameca.

Se obtuvieron amplificaciones a los tamaños esperados 72, 239 y 389pb para los genes NSP3, VP7 y VP6 respectivamente, a partir de diferentes muestras (figura 11).

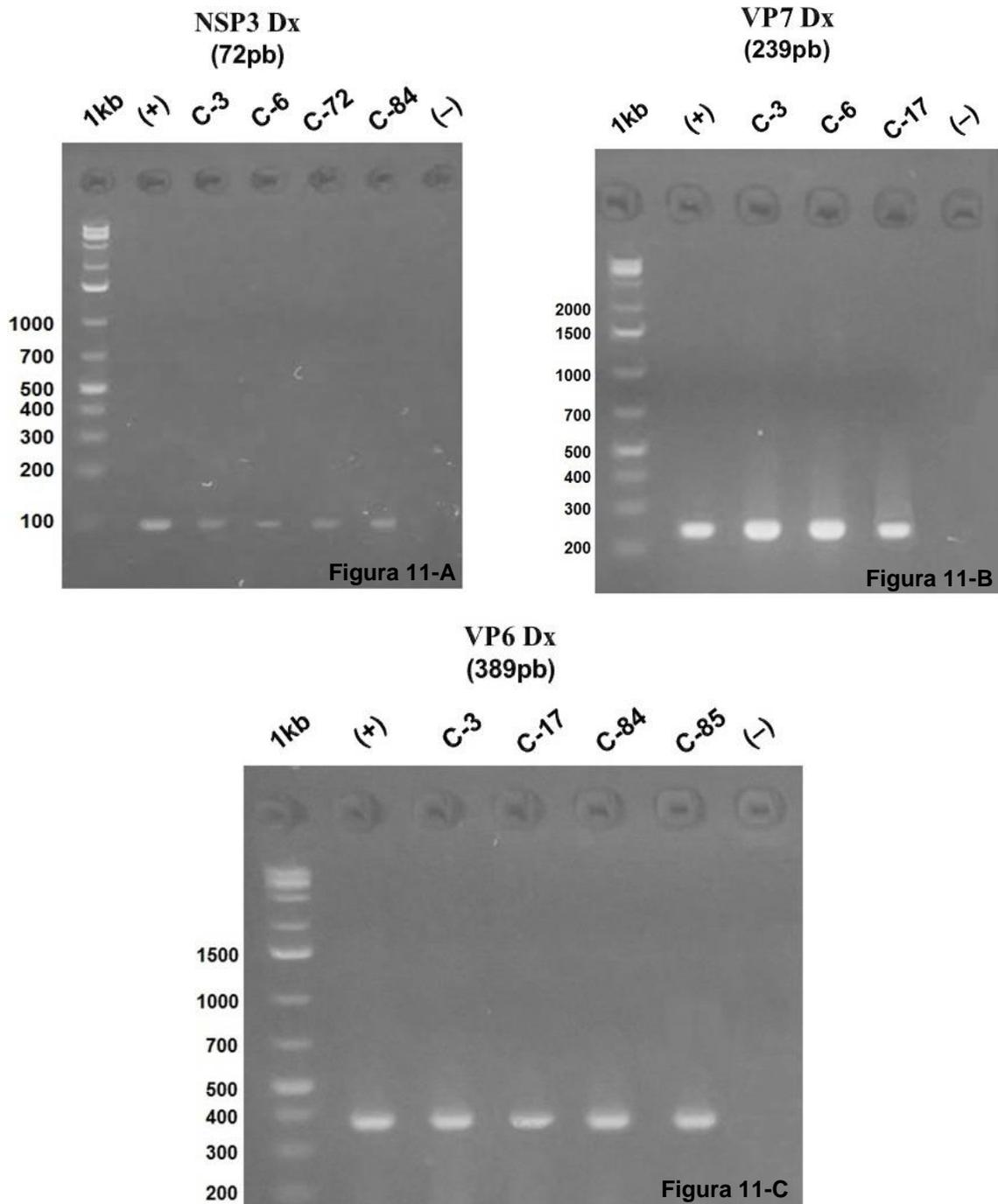


Figura 11. Geles de agarosa a 3x que muestran amplificaciones de diferentes genes de RV, en los 3 casos se empleó un marcador de peso molecular de 1kb (carril 1), seguido del control positivo (carril 2) y DNA de conejo como control negativo (carril final). Figura 11-A: amplificaciones de 72pb correspondientes al gen NSP7; 11-B: productos de 239pb correspondientes a VP7; 11-C: amplicones de 389pb correspondientes a VP6.

Las muestras positivas al menos a un gen, fueron analizadas empleando cebadores de longitud completa para la amplificación de los genes VP4, VP7, NSP1 y NSP4 (figura 12).

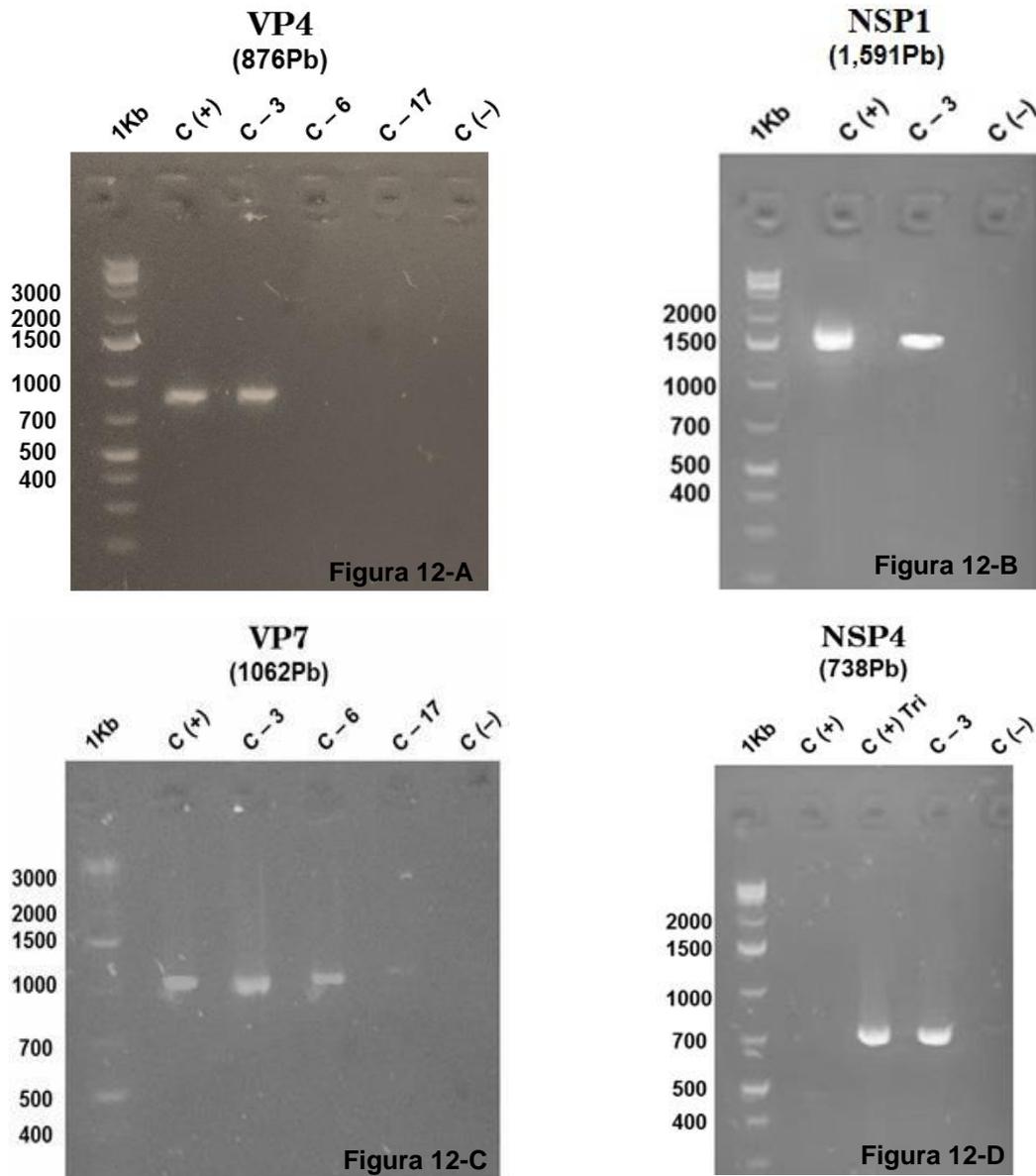


Figura 12. Geles de agarosa a 2x que muestran amplificaciones de diferentes genes de RV, en los 3 casos se empleó un marcador de peso molecular de 1kb (carril 1), seguido del control positivo (carril 2) y DNA de conejo como control negativo (carril final). Figura 12-A: amplicones de 876pb correspondientes a VP4; 12-B: productos de 1,591pb de NSP1; 12-C: amplicones de 1,062pb de VP7; 12-D: productos de 738pb de NSP4.

Mediante el uso de distintos cebadores, se obtuvieron amplificaciones para diferentes genes de RV (cuadro 7), obteniéndose en total 6 muestras positivas, mismas que fueron candidatas para el intento de adaptación a condiciones de cultivo celular.

Cuadro 7. Relación muestras – genes amplificados de rotavirus.

Muestra ID	Genes amplificados
3	NSP1, NSP3, NSP4, VP4, VP6 y VP7
6	NSP3 y VP7
17	VP6 y VP7
72	NSP3 y VP6
84	NSP3 y VP6
85	VP6

## Cultivo celular

Las muestras positivas a algún gen por RT-PCR fueron procesadas para la adaptación de RV a condiciones de cultivo celular (figura 13).

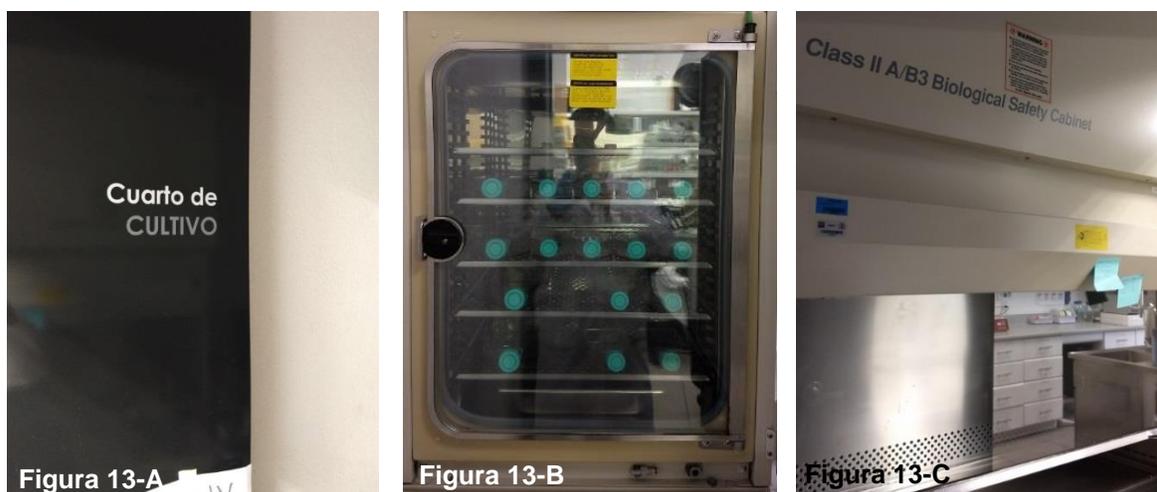


Figura 13: A - C. Imágenes del proceso de cultivo *in vitro*.

A continuación, se presenta un cultivo celular normal (sin inocular) de células MA-104, donde se observa una lámina de monocapa confluyente (figura 14-A), seguido de un cultivo celular infectado con RRV, se aprecia el efecto citopático característico de RV (pérdida de estructura celular, desprendimiento y focos líticos) (figura 14-B).

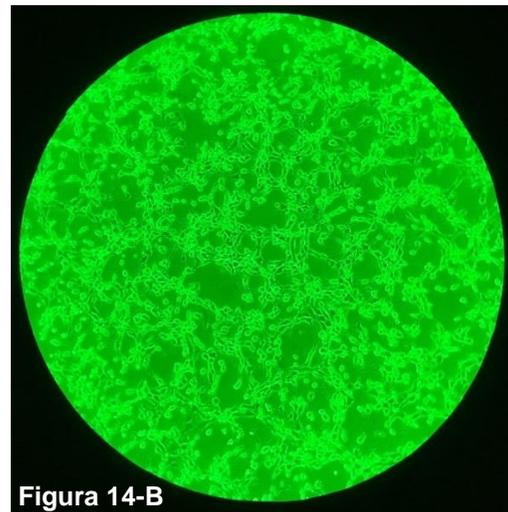
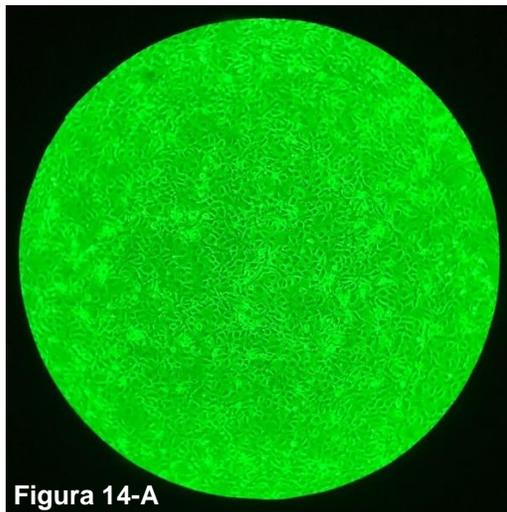
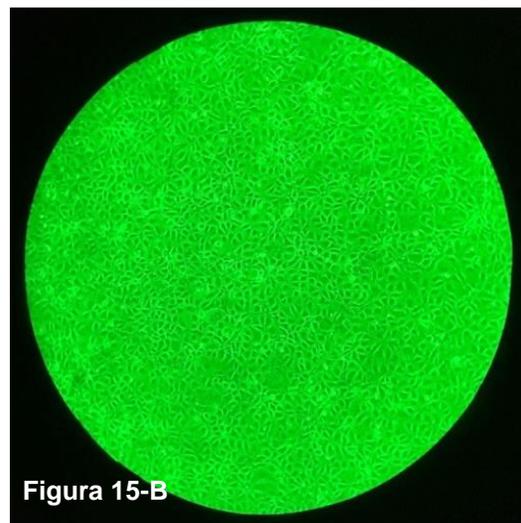
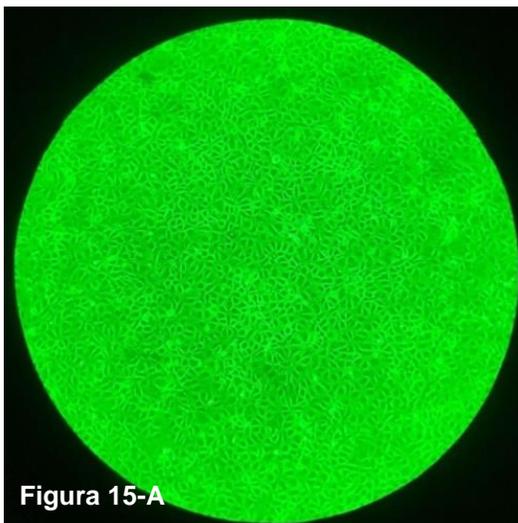


Figura 14-A. Cultivo celular de células MA-104 sin inocular. 14-B: Cultivo celular infectado con RRV; se aprecia un evidente efecto citopático.

Tras llevarse a cabo distintos procesos de adaptación de rotavirus a condiciones de cultivo celular, no se observaron efectos citopáticos atribuibles a la infección por RV en ninguna de las muestras analizadas (figura 15).



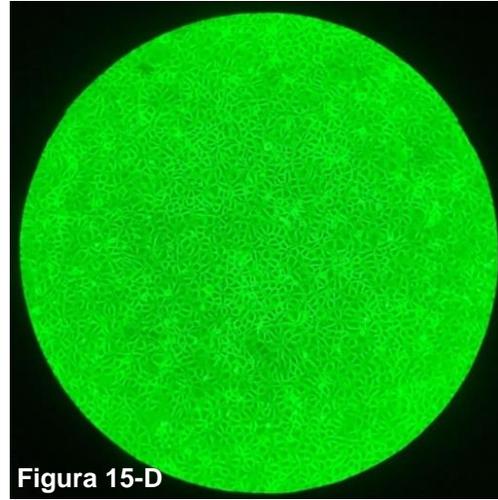
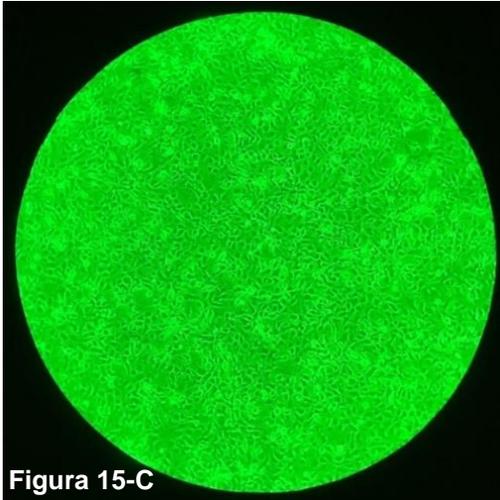


Figura 15: A - D. Cajas de cultivo inoculadas con soluciones de muestras positivas a RV por RT-PCR, no se detecta presencia de efecto citopático.

### Secuenciación y análisis

Los resultados de secuenciación, análisis molecular y filogenético se encuentran incorporados en los productos de la presente investigación.

## 9. Productos

A continuación, se enlistan los productos generados a partir de la presente investigación.

1. Publicación del trabajo de investigación titulado “Análisis de la presencia de Rotavirus en conejos en el Estado de México” en la Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias, indexada en JCR, con un factor de impacto de 0.8, ubicada en el cuartil 3. El trabajo fue publicado en la edición Vol. 10, Núm. 2 (2019): Abril-Junio. Disponible en: <https://cienciaspecuarias.inifap.gob.mx/index.php/Pecuarias/article/view/4638>



### REVISTA MEXICANA DE CIENCIAS PECUARIAS

<https://doi.org/10.22319/mcp.v10i2.4638>

Nota de investigación



**Análisis de la presencia de Rotavirus en conejos del Estado de México**



Emmanuel Reynoso Utrera <sup>a</sup>

Linda Guiliana Bautista Gómez <sup>a\*</sup>

José Simón Martínez Castañeda <sup>b</sup>

Camillo Romero Núñez <sup>a</sup>

Virginia Guadalupe García Rubio <sup>a</sup>

Gabriela López Aguado Almazán <sup>a</sup>

Pedro Abel Hernández García <sup>b</sup>

Enrique Espinosa Ayala <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Universidad Autónoma del Estado de México. Centro Universitario UAEM Amecameca, Km 2.5, Carretera Amecameca Ayapango, 59000. México.

<sup>b</sup> Universidad Autónoma del Estado de México. Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Toluca, Estado de México, México.

\*Autor de correspondencia: lin\_bag@yahoo.com.mx; lgbautistag@uaemex.mx

2. Elaboración de artículo científico titulado “Unusual G3 P[8] rotavirus genotype detected in a mexican rabbit, possible human - rabbit interspecies transmission” enviado a la revista Suiza *Animals*, indexada en JCR, con un factor de impacto de 2.3, ubicada en el cuartil 1.



1 *Type of the Paper (Article)*

2 **Unusual G3 P[8] rotavirus genotype detected in a**  
3 **mexican rabbit, possible human - rabbit interspecies**  
4 **transmission**

5 **Emmanuel Reynoso-Utrera <sup>1</sup>, Linda Guiliana Bautista-Gómez<sup>2</sup>, and José Simón**  
6 **Martínez-Castañeda <sup>3</sup>**

7 <sup>1</sup> Laboratorio de Biotecnología, Biología Molecular y Genética. Universidad Autónoma del Estado de México,  
8 Centro Universitario UAEM Amecameca. Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia. Carretera  
9 Amecameca-Ayapango km 2.5, Amecameca, CP. 56900, Estado de México, México.

10 <sup>2</sup> Laboratorio de Biología Molecular, Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal,  
11 Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, C.P.  
12 50090, Estado de México, México.

13 \* Correspondence: lin\_bag@yahoo.com.mx

14 Received: date; Accepted: date; Published: date

15 **Simple Summary:**

16 Rotavirus species A (RVA) is considered a major cause of viral gastroenteritis in humans and  
17 young animals worldwide. In the present study, rotavirus was detected in intestinal tissue samples  
18 from a rabbit with enteric signology by means of RT-PCR, through the amplification of genes that  
19 encode the proteins of the outer layer capsid VP4 and VP7. Molecular and phylogenetic analyzes of  
20 the strain identified as C-3/15 showed that VP4 was closely related to the human rotavirus (HRV)  
21 strain VU12-13-42 (97.63% nt and 99.04% aa identity), genotype P [8]. For its part, VP7  
22 demonstrated a high identity degree with the 6235 strain (96.81% nt and 97.03% aa identity), G3  
23 genotype, also human origin. The results obtained represent evidence of a possible rotavirus  
24 human-rabbit interspecies transmission event, which had not been previously documented. It is  
25 suggested that C-3/15 strain may belong to the same HRV strain circulating in the region, or may  
26 have originated by genetic rearrangements between different human or lapine rotavirus. This is the  
27 first report of genotyping of rotavirus identified in rabbits in Mexico.

28 **Abstract:**

29 Rotavirus species A (RVA) is an important etiologic agent of acute gastroenteritis in young humans  
30 and animals worldwide, including rabbits. Studies that have investigated the genetic characteristics  
31 of rotavirus in rabbits (lapine rotavirus or LRV) are limited, and to date, the characterized LRV



## 10. Conclusiones generales

Rotavirus es considerado una de las principales causas de gastroenteritis aguda en humanos y animales jóvenes en todo el mundo. En la presente investigación, rotavirus fue identificado en 4% (6/148) del total de muestras analizadas, resultado que sugiere que el papel que desempeña rotavirus en la presentación de signología entérica en la población cunícola de la región bajo estudio, podría considerarse de poca relevancia, sin embargo, no se descarta la hipótesis de que RV tenga un papel importante en el ingreso y replicación de otros agentes patógenos, como *Eimeria* spp., mediante la alteración del epitelio intestinal.

Rotavirus fue identificado en diferentes muestras solo mediante el empleo de distintos pares de iniciadores, en otras palabras, incluso utilizando diferentes pares de cebadores (reportados o diseñados) para un mismo gen, no fue posible obtener amplificaciones de todos los segmentos objetivo de RVA a partir de una sola muestra (excepto de C-3/15). Se plantea que estos resultados pueden ser atribuidos a una alta variabilidad genética de rotavirus en la región de estudio. De ser correcto este planteamiento, dicha variabilidad, por sí misma, podría evidenciar importantes cambios en la conformación genética de RV (incluso en regiones altamente conservadas), de una determinada zona geográfica a otra.

Se identificaron los genotipos G3 P[8] E2 de los genes VP7, VP4 y NSP4 respectivamente de rotavirus, detectado en muestras de conejos con signología entérica en el Estado de México, resultado que contrasta con la homogeneidad genética que ha demostrado tener LRV a nivel mundial. Por otro lado, las secuencias obtenidas de VP7 y VP4 mostraron mayores relaciones filogenéticas con cepas de rotavirus humano, mientras que NSP4 estuvo más relacionado con una cepa vacunal de RV.

Los resultados obtenidos indican que el rotavirus identificado (C-3/15) no pertenece a una cepa Lapine típica, sino que, probablemente, se trata de una cepa resultante de rearrreglos genéticos entre diferentes cepas de rotavirus humanos (considerando que VP4 y VP7 no se asociaron a una misma cepa HRV) y cepas de origen vacunal. Se

sugiere la realización de estudios de vigilancia epidemiológica de rotavirus para poder determinar si los genotipos identificados son comunes a una cepa de RV salvaje circulante en la región de estudio, o se trata de un evento aislado sin mayor significancia biológica.

Se ha informado que cualquier vacuna rearmada de rotavirus posee teóricamente el potencial de rearmarse con rotavirus de tipo salvaje o con otros componentes de la misma vacuna para formar nuevos rearmantes *in vivo*, lo cual da explicación a la interesante asociación de NSP4 con una cepa vacunal, además, ya se ha reportado la identificación de rearmos genéticos entre cepas de rotavirus de tipo salvaje con cepas vacunales de RV.

Se apoya la propuesta de que el uso generalizado de la vacuna RotaTeg, ha permitido la introducción de genes de vacuna en cepas de rotavirus salvaje, lo cual tendrá un impacto en la composición genética, epidemiología y evolución de los virus circulantes asociados con infecciones humanas y, de acuerdo con nuestros resultados, también animales.

La presente investigación representa el primer informe sobre la presencia de rotavirus humanos en conejos con signología entérica, así como la identificación de posibles rearmantes entre cepas de rotavirus humanos y cepas vacunales en animales.

## 11. Referencias bibliográficas

- Adams, W., Kraft, L. 1963. Epizootic diarrhea of infant mice: identification of the etiologic agent. *Science*. Vol. 141. No. 3578. Pp. 359–360.
- Afrikanova, I., Fabbretti, E., Miozzo, M., Burrone, O. 1998. Rotavirus NSP5 phosphorylation is up-regulated by interaction with NSP2. *Journal of General Virology*. Vol. 79. Pp. 2679–2686.
- Afrikanova, I., Miozzo, M., Giambiagi, S., Burrone, O. 1996. Phosphorylation generates different forms of rotavirus NSP5. *The Journal of General Virology*. Vol. 77. Pp. 2059–2065.
- Arias, C., Guerrero, C., Méndez, E., Zárate, S., Isa, P., Espinosa, R. 2001. Early events of rotavirus infection: the search for the receptor(s). *Novartis Foundation Symposium*. John Wiley & Sons. LTD, Chichester. England. Pp. 47-60.
- Arnold, M., Patton, J. T., McDonald, S. M. 2009. Culturing, storage, and quantification of rotaviruses. *Current protocols in microbiology*. Chapter 15. 15C–3.
- Arnoldi, F., Campagna, M., Eichwald,† C., Desselberger, U., Burrone, O. 2007. Interaction of Rotavirus Polymerase VP1 with Nonstructural Protein NSP5 Is Stronger than That with NSP2. *Journal of Virology*. Vol. 81. No. 5. Pp. 2128–2137.
- Ayala-Breton, C., Arias, M., Espinosa, R., Romero, P., Arias, C., López S. 2009. Analysis of the Kinetics of Transcription and Replication of the Rotavirus Genome by RNA Interference. *Journal of Virology*. Vol. 83. No. 17. Pp. 8819–8831.
- Baker, M., Prasad, B. 2010. Rotavirus cell entry. *Current topics in microbiology and immunology*. Vol. 343. Pp.121–48.
- Ball, J., Tian, P., Zeng, C., Morris, A., Estes, M. 1996. Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science*. Vol. 272. No. 5258. Pp. 101–104.

Bányai, K., Forgach, P., Erdelyi, K., Martella, V., Bogdan, A., Hocsak, E., Havasi, V., Melegh, B., Szucs, G. 2005. Identification of the novel lapine rotavirus genotype P[22] from an outbreak of enteritis in a Hungarian rabbitry. *Virus research*. Vol. 113. No. 2. Pp. 73–80.

Bányai, K., Kemenesi, G., Budinski, I., Földes, F., Zana, B., Marton, S., Varga-Kugler, R., Oldal, M., Kurucz, K., Jakab, F. 2017. Candidate new rotavirus species in Schreiber's bats, Serbia. *Infection, Genetics and Evolution*. Vol. 48. Pp. 19–26.

Bányai, K., László, B., Duque, J., Steele, A., Nelson, E., Gentsch, J., Parashar, U. 2012. Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the pre rotavirus vaccine era: Insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs. *Vaccine*. Vol. 30. (Suppl. 1). A122–A130.

Bastardo, J., Maldonado, A. 2012. Epidemiología y prevención de la gastroenteritis por rotavirus en Venezuela. *Saber, Universidad de Oriente, Venezuela*. Vol. 24. No 2. Pp. 114–122.

Berkova, Z., Crawford, S., Trugnan, G., Yoshimori, T., Morris, A., Estes, M. 2006. Rotavirus NSP4 induces a novel vesicular compartment regulated by calcium and associated with viroplasm. *Journal of Virology*. Vol. 80. No. 12. Pp. 6061–6071.

Berois, M., Sapin, C., Erk, I., Poncet, D., Cohen, J. 2003. Rotavirus nonstructural protein NSP5 interacts with major core protein VP2. *Journal of Virology*. Vol. 77. No. 3. Pp. 1757–1763.

Bishop, R. 2009. Discovery of rotavirus: Implications for child health. *Journal of gastroenterology and hepatology*. Vol. 24. S81 – S85.

Bishop, R., Davidson, G., Holmes, I., Ruck, B. 1973. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet* 2. Vol. 2. No. 7841. Pp. 1281–1283.

Blackhall, J., Fuentes, A., Magnusson, G. 1996. Genetic stability of a porcine rotavirus RNA segment during repeated plaque isolation. *Virology*. Vol. 225. No. 1. Pp. 181–190.

Bonica, M., Zeller, M., Van Ranst, M., Matthijnsens, J., Heylen, E. 2015. Complete Genome Analysis of a Rabbit Rotavirus Causing Gastroenteritis in a Human Infant. *Viruses*. Vol. 7. Pp. 844-856.

Boudreaux, C., Vile, D., Gilmore, B., Tanner, J., Kelly, D., McDonald, S. 2013. Rotavirus core shell subdomains involved in polymerase encapsidation into virus-like particles. *The Journal of general virology*. Vol. 94. No. 8. Pp. 1818–1826.

Bugarcic, A., Taylor, J. 2006. Rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 is secreted from the apical surfaces of polarized epithelial cells. *Journal of Virology*. Vol. 80. No. 24. Pp. 12343–12349.

Campagna, M., Eichwald, C., Vascotto, F., Burrone, O. 2005. RNA interference of rotavirus segment 11 mRNA reveals the essential role of NSP5 in the virus replicative cycle. *Journal of General Virology*. Vol. 86. Pp. 1481–1487.

Carreño-Torres, J., Gutiérrez, M., Arias, C., López, S., Isa, P. 2010. Characterization of viroplasm formation during the early stages of rotavirus infection. *Virology Journal*. Vol. 7. P. 350.

Castrucci, G., Ferrari, M., Frigeri, V., Cilli, V., Perecca, L., Donelli, G. 1985. Isolation and characterization of cytopathic strains of rotavirus from rabbits. *Archives of Virology*. Vol. 83. Pp. 99–104.

Cheung, W., Gill, M., Esposito, A., Kaminski, C., Courousse, N., Chwetzoff, S., Trugnan, G., Keshavan, N., Lever, A., Desselberger, U. 2010. Rotaviruses Associate with Cellular Lipid Droplet Components To Replicate in Viroplasms, and Compounds Disrupting or Blocking Lipid Droplets Inhibit Viroplasm Formation and Viral Replication. *Journal of Virology*. Vol. 84. No. 13. Pp. 6782–6798.

Ciarlet, M., Crawford, S., Estes, M. 2001. Differential infection of polarized epithelial cell lines by sialic acid-dependent and sialic acid-independent rotavirus strains. *Journal of Virology*. Vol. 75. No. 23. Pp. 11834–11850.

Ciarlet, M., Estes, M., Conner, M. 1997. Comparative amino acid sequence analysis of the outer capsid protein VP4 from four lapine rotavirus strains reveals identity with genotype P[14] human rotavirus. *Archives of Virology*. Vol. 142. No. 5. Pp. 1059-1069.

Ciarlet, M., Liprandi, F., Conner, M., Estes, M. 2000. Species specificity and interspecies relatedness of NSP4 genetic groups by comparative NSP4 sequence analyses of animal rotaviruses. *Archives of virology*. Vol. 145. No. 2. Pp. 371-383.

Ciarlet, M., Ludert, J., Iturriza-Gomara, M., Liprandi, F., Gray, J., Desselberger, U., Estes, M. 2002. Initial interaction of rotavirus strains with N-acetylneuraminic (sialic) acid residues on the cell surface correlates with VP4 genotype, not species of origin. *Journal of Virology*. Vol. 76. No. 8. Pp. 4087–4095.

Cilli, A., Koike, C., N, Frazatti-Gallina., Timenetsky, M. 2013. Detection of Rotavirus G3P[22] Genotype in Gnotobiotic Rabbit Model. *Journal of Virology & Antiviral Research*. Vol. 2. Issue 3.

Comité Nacional Sistema Producto Cunicola. (2017). Disponible en <http://sistemaproductocunicola.org.mx/cunicola.html> Consultado el 13 de febrero de 2018.

Conner, M., Estes, M., Graham, D. 1988. Rabbit model of rotavirus infection. *Journal of Virology*. Vol. 62. No. 5. Pp. 1625–1633.

Contin, R., Arnoldi, F., Campagna, M., Burrone, O. 2010. Rotavirus NSP5 orchestrates recruitment of viroplasmic proteins. *Journal of General Virology*. Vol. 91. Pp. 1782–1793.

Contin, R.,† Arnoldi, F.,† Mano, M., Burrone, O. 2011. Rotavirus Replication Requires a Functional Proteasome for Effective Assembly of Viroplasms. *Journal of Virology*. Vol. 85. No. 6. Pp. 2781–2792.

Coulson, B., Londrigan, S., Lee, D. 1997. Rotavirus contains integrin ligand sequences and a disintegrinlike domain that are implicated in virus entry into cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 94. No. 10. Pp. 5389–5394.

Crawford, S., Estes, M. 2013. Viroporin-mediated calcium-activated autophagy. *Autophagy*. Vol. 9. No. 5. Pp. 797–798.

Crawford, S., Mukherjee, S., Estes, M., Lawton, J., Shaw, A., Ramig, R., Prasad, B. 2001. Trypsin cleavage stabilizes the rotavirus VP4 spike. *Journal of Virology*. Vol. 75. No. 13. Pp. 6052–6061.

Criglar, J., Hu, L., Crawford, S., Hyser, J., Broughman, J., Prasad, B., Estes, M. 2013. A novel form of rotavirus NSP2 and phosphorylation-dependent NSP2-NSP5 interactions are associated with viroplasm assembly. *Journal of Virology*. Vol. 88. No. 2. Pp. 786–798.

De Grazia, S., Bonura, F., Colomba, C., Cascio, A., Di Bernardo, F., Collura, A., Terra-nova, D., Martella, V., Giammanco, G. 2014. Data mining from a 27-years rotavirus surveillance in Palermo, Italy. *Infection, Genetics and Evolution*. Vol. 28. Pp. 377–384.

De-Leener, K., Rahman, M., Matthijnsens, J., Van Hoovels, L., Goegebuer, T., Van der Donck, I., & Van Ranst, M. 2004. Human infection with a P[14], G3 lapine rotavirus. *Virology*. Vol. 325. No. 1. Pp. 11–17.

Desselberger, U. 2014. Rotaviruses. *Virus Research*. Vol. 190. Pp. 75 – 96.

Desselberger, U., Richards, J., Tchertanov, L., Lepault, J., Lever, A., Burrone, O., Cohen, J. 2013. Further characterisation of rotavirus cores: ss(+)RNAs can be

packaged in vitro but packaging lacks sequence specificity. *Virus Research*. Vol. 178. No. 2. Pp. 252–263.

Dhama, K., Chauhan, R., Mahendran, M., Malik, S. 2009. Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals. *Veterinary Research Communications*. Vol. 33. Pp. 1-23.

Díaz, J., Madera, M., Pérez, Y., García, M., León, K., Torres, M. 2009. Generalidades en Diarrea Aguda. *Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría*. Vol. 72. No. 4. Pp. 139 -145.

Díaz, Y., Chemello, M., Pena, F. 2008. Expression of nonstructural rotavirus protein NSP4 mimicks Ca<sup>2+</sup> homeostasis changes induced by rotavirus infection in cultured cells. *Journal of Virology*. Vol. 82. No. 22. Pp. 11331–11343.

Díaz-Salinas, M., Romero, P., Espinosa, R., Hoshino, H., López, S., Ariasa, C. 2013. The Spike Protein VP4 Defines the Endocytic Pathway Used by Rotavirus To Enter MA104 Cells. *Journal of Virology*. Vol. 87. No. 3. Pp. 1658–1663.

Díaz-Salinas, M., Silva-Ayala, D., López, S., Arias, C. 2014. Rotaviruses reach late endosomes and require the cation-dependent mannose-6-phosphate receptor and the activity of cathepsin proteases to enter the cell. *Journal of Virology*. Vol. 88. No. 8. Pp. 4389 – 4402.

Didsbury, A., Wang, C., Verdon, D., Sewell, M., McIntosh, J., Taylor, J. 2011. Rotavirus NSP4 is secreted from infected cells as an oligomeric lipoprotein and binds to glycosaminoglycans on the surface of non-infected cells. *Virology Journal*. Vol. 8. Pp. 1-10.

Dorado, C., Rugerio, C., Rivas, S. 2003. Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Revista de la Facultad de Medicina, UNAM*. Vol. 46. No. 6. Pp. 229-235.

Dormitzer, P., Sun, Z., Blixt, O., Paulson, J., Wagner, G., Harrison, S. 2002. Specificity and affinity of sialic acid binding by the rhesus rotavirus VP8\* core. *Journal of Virology*. Vol. 76. No. 20. Pp. 10512–10517.

Ducharme, N., Bickel, P. 2008. Lipid droplets in lipogenesis and lipolysis. *Endocrinology*. Vol. 149. No. 3. Pp. 942–949.

EFSA. 2005. The Impact of the current housing and husbandry systems on the health and welfare of farmed domestic rabbits. *The EFSA Journal*. Vol. 267 Pp. 1-31.

Eichwald, C., Arnoldi, F., Laimbacher, A., Schraner, E., Fraefel, C., Wild, P., Burrone, O., Ackermann, M. 2012. Rotavirus viroplasm fusion and perinuclear localization are dynamic processes requiring stabilized microtubules. *PLoS ONE*. Vol. 7. No. 10.

Eichwald, C., Jacob, G., Muszynski, B., Allende, J., Burrone, O. 2004. Uncoupling substrate and activation functions of rotavirus NSP5: phosphorylation of Ser-67 by casein kinase 1 is essential for hyperphosphorylation. *The National Academy of Sciences of the USA*. Vol. 101. No. 46. Pp. 16304–16309.

Estes, M., Cohen, J. 1989. Rotavirus Gene Structure and Function. *Microbiological Reviews*. Vol. 53. No. 4. Pp. 410-449.

Estes, M., Greenberg, H. 2013. Rotaviruses. In: Knipe, D.M., Howley, P. *et al.*, (Eds.). *Fields Virology*. 6th edition. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. PA. Pp. 1347–1401.

Estes, M., Kapikian, A. 2007. Rotaviruses. In: Knipe, D.M.; Howley, PM.; Griffin, DE.; Lamb, RA.; Martin, MA.; Roizman, B.; Straus, SE., editors. *Fields Virology*. 5th edition. Vol 2. Kluwer Health/Lippincott, Williams and Wilkins; Philadelphia. Pp. 1917-1974.

Fabbretti, E., Afrikanova, I., Vascotto, F., Burrone O. 1999. Two non-structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures in vivo. *Journal of General Virology*. Vol. 80. Pp. 333–339.

Flewett, T., Bryden, A., Davies, H. 1973. Virus particles in gastroenteritis. *Lancet* 2. Vol. 2. No. 7844. Pp. 1459–1510.

- Flewett, T., Bryden, A., Davies, H., Woode, G., Bridger, J., Derrick, J. 1974. Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *Lancet* 2. Vol. 304. No. 7872. Pp. 61–63.
- Gardet, A., Breton, M., Fontanges, P., Trugnan, G., Chwetzoff, S. 2006. Rotavirus spike protein VP4 binds to and remodels actin bundles of the epithelial brush border into actin bodies. *Journal of Virology*. Vol. 80. No. 8. Pp. 3947–3956.
- Gaunt, E., †† Zhang, Q., † Cheung, W., Wakelam, M., Lever, A., Desselberger, U. 2013. Lipidome analysis of rotavirus-infected cells confirms the close interaction of lipid droplets with viroplasmas. *Journal of General Virology*. Vol. 94. Pp. 1576–1586.
- Gentsch, J., Glass, R., Woods, P., Gouvea, V., Gorziglia, M., Flores, J., Das, B., Bhan, M. 1992. Identification of Group A Rotavirus Gene 4 Types by Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 30. No. 6. Pp. 1365–1373.
- Ghosh, S., Kobayashi, N. 2011. Whole-genomic analysis of rotavirus strains: current status and future prospects. *Future Microbiology*. Vol. 6. No. 9. Pp. 1049–1065.
- Ghosh, S., Kobayashi, N. 2014. Exotic rotaviruses in animals and rotaviruses in exotic animals. *Virusdisease*. Vol. 25. No. 2. Pp. 158–172.
- Gómara, M. I., Wong, C., Blome, S., Desselberger, U., Gray, J. 2002. Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. *Journal of virology*. Vol. 76. No. 13. Pp. 6596–6601.
- González, M., Hidalgo, R., Silva, L. 2003. Rotavirus: Enfermedad emergente de transmisión digestiva. *Revista Cubana de Pediatría*. Vol. 75. No. 1.
- Gouvea, V., Glass, R., Woods, P., Taniguchi, K., Clark, H., Forrester, B., Fang, Z. 1990. Polymerase Chain Reaction Amplification and Typing of Rotavirus Nucleic Acid from Stool Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 28. No. 2. Pp. 276 – 282.

Greenberg, H., Clark, H., Offit, P. 1994. Rotavirus pathology and pathophysiology. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Vol. 185. Pp. 255–283.

Greenberg, H., Estes, M. 2009. Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination. *Gastroenterology*. Vol. 136. No. 6. Pp. 1939–1951.

Gualtero, D., Guzmán, F., Acosta, O., Guerrero, C. 2007. Amino acid domains 280-297 of VP6 and 531-554 of VP4 are implicated in heat shock cognate protein hsc70-mediated rotavirus infection. *Archives of Virology*. Vol. 152. No. 12. Pp. 2183–2196.

Guglielmi, K., McDonald, S., Patton, J. 2010. Mechanism of Intraparticle Synthesis of the Rotavirus Double-stranded RNA Genome. *The Journal of biological chemistry*. Vol. 285. No. 24. Pp. 18123–18128.

Guo, D., Liu, J., Lu, Y., Sun, Y., Yuan, D., Jiang, Q., Lin, H., Li, C., Si, C., Qu, L. 2012. Full genomic analysis of rabbit rotavirus G3P[14] strain N5 in China: identification of a novel VP6 genotype. *Infection, genetics and evolution*. Vol. 12. No. 7. Pp. 1567–1576.

Guo, Y., Cordes, K., Farese, R., Walther, T. 2009. Lipid droplets at a glance. *Journal of Cell Science*. Vol. 122. No. 6. Pp. 749–752.

Gutiérrez, M., Isa, P., Sánchez-San Martín, C., Pérez-Vargas, J., Espinosa, R., Arias, C., López, S. 2010. Different Rotavirus Strains Enter MA104 Cells through Different Endocytic Pathways: the Role of Clathrin-Mediated Endocytosis. *Journal of Virology*. Vol. 84, No. 18. Pp. 9161–9169.

Hamilton J.R. 2005. Infecciones intestinales. En: Behrman, R., Baughan, P. *Tratado de Pediatría*. 17ª Ed. Volumen II. España: Interamericana. Mc Graw-Hill. Pp. 1142–1143.

Hoshino, Y., Saif, L.J., Kang, S. Y., Sereno, M. M., Chen, W. K., Kapikian, A. Z. 1995. Identification of group A rotavirus genes associated with virulence of a porcine rotavirus and host range restriction of a human rotavirus in the gnotobiotic piglet model. *Virology*. Vol. 209. No. 1. Pp. 274–280.

- Hu, L., Chow, D., Patton, J., Palzkill, T., Estes, M., Prasad, V. 2012. Crystallographic Analysis of Rotavirus NSP2-RNA Complex Reveals Specific Recognition of 5' GG Sequence for RTPase Activity. *Journal of Virology*. Vol. 86. No. 19. Pp. 10547–10557.
- Hundley, F., Biryahwaho, B., Gow, M., Desselberger, U. 1985. Genome rearrangements of bovine rotavirus after serial passage at high multiplicity of infection. *Virology*. Vol. 143. No. 1. Pp. 88–103.
- Hyser, J., Utama, B., Crawford, S., Broughman, J., Estes, M. 2013. Activation of the endoplasmic reticulum calcium sensor STIM1 and store-operated calcium entry by rotavirus requires NSP4 viroporin activity. *Journal of Virology*. Vol. 87. No. 24. Pp. 13579–13588.
- Hyser, J., Utama, B., Crawford, S., Estes, M. 2012. Genetic divergence of rotavirus nonstructural protein 4 results in distinct serogroup-specific viroporin activity and intracellular punctate structure morphologies. *Journal of Virology*. Vol. 86. No. 9. Pp. 4921–4934.
- ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses). 2018. Virus Taxonomy. EC 50. <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2015> Consultado el 27 de Enero de 2019.
- INEGI. 2007. Estados Unidos Mexicanos Censo Agropecuario. VIII Censo Agrícola, Ganadero y Forestal.
- Isa, P., Arias, C., López, S. 2006. Role of sialic acids in rotavirus infection. *Glycoconjugate Journal*. Vol. 23. Issue 1-2. Pp. 27–37.
- Jayaram, H., Estes, M., Prasad, B. 2004. Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. *Virus research*. Vol. 101. No. 1. Pp. 67–81.
- Jiang, X., Jayaram, H., Kumar, M., Ludtke, S., Estes, M., Prasad, B. 2006. Cryoelectron microscopy structures of rotavirus NSP2–NSP5 and NSP2–RNA

complexes: implications for genome replication. *Journal of Virology*. Vol. 80. No. 21. Pp. 10829–10835.

Jourdan, N., Brunet, J., Spain, C., Blais, A., Cotte-Laffitte, J., Forestier, F. 1998. Rotavirus infection reduces sucrose-isomaltase expression in human intestinal epithelial cell by perturbing protein targeting and organization of microvillar cytoskeleton. *Journal of Virology*. Vol. 72. No. 9. Pp. 1728–36.

Kerr, P. J., Donnelly, T. M. 2013. Viral infections of rabbits. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*. Vol 16. No. 2. Pp. 437–468.

Kim, Y., Lee, E., Oem, J., Kim, S., Lee, K., Lee, M., Park, S. 2013. Molecular characterization of the VP4, VP7 and NSP4 genes of the Korean lapine rotavirus. *Preventive veterinary medicine*. Vol. 37. No. 4. Pp. 181–184.

Kojima, K., Taniguchi, K., Kawagishi-Kobayashi, M., Matsuno, S., Urasawa, S. 2000. Rearrangement generated in double genes, NSP1 and NSP3, of viable progenies from a human rotavirus strain. *Virus Research*. Vol. 67. No. 2. Pp. 163–171.

Komoto, S., Tacharoenmuang, R., Guntapong, R., Ide, T., Tsuji, T., Yoshikawa, T., Tharmaphornpilas, P., Sangkitporn, S., Taniguchi, K. 2016. Reassortment of Human and Animal Rotavirus Gene Segments in Emerging DS-1-Like G1P[8] Rotavirus Strains. *PLoS One*. Vol. 11 No. 2. Pp. 1–26.

Kuerschner, L., Moessinger, C., Thiele, C. 2008. Imaging of lipid biosynthesis: how a neutral lipid enters lipid droplets. *Traffic*. Vol. 9. No. 3. Pp. 338–352.

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*. Vol. 35. No. 6. Pp. 1547–1549.

Lavazza A., Cerioli M., Martella V., Tittarelli C., Grilli G., Brivio R., Buonavoglia C. 2008. Rotavirus in diarrheic rabbits: prevalence and characterization of strains in Italian Farms. *Pathology and Hygiene*. 993–998.

Lawton, J., Estes, M., Prasad, B. 1997. Three-dimensional visualization of mRNA release from actively transcribing rotavirus particles. *Nature Structural Biology*. Vol. 4. No. 2. Pp. 118–121.

Li, C., Chen, H. 2014. Enhancement of influenza virus transmission by gene reassortment. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* Vol. 385. Pp.185–204.

Li, W., Manktelow, E., Von Kirchbach, J., Gog, J., Desselberger, U., Lever, A. 2010. Genomic analysis of codon, sequence and structural conservation with selective biochemical-structure mapping reveals highly conserved and dynamic structures in rotavirus RNAs with potential cis-acting functions. *Nucleic Acids Research*. Vol. 38. No. 21. Pp. 7718–7735.

López, P., Cáceres, D., López, E. 2007. Enfermedad por Rotavirus: Características epidemiológicas, clínicas, prevención y manejo. *Precop CCAP*. Vol. 6. No. 2. Pp. 45–55.

López, S., Arias, C. 2004. Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends in Microbiology*. ISSN 0966-842X. Vol. 12. No. 6. Pp. 271-278.

López, S., Arias, C. 2006. Early steps in rotavirus cell entry. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. ISSN 0070-217X. Vol. 309. Pp. 39-66.

Lorrot, M., Vasseur, M., 2007. How do the rotavirus NSP4 and bacterial enterotoxins lead differently to diarrhea? *Virology Journal*. Vol. 4. No. 31.

Luchs, A., Timenetsky, M. 2014. G8P[6] rotaviruses isolated from Amerindian children in Mato Grosso do Sul, Brazil, during 2009: close relationship of the G and P genes with those of bovine and bat strains. *The Journal of general virology*. Vol. 95. No. 3. Pp. 627–641.

Lundgren, O., Svensson, L. 2001. Pathogenesis of Rotavirus diarrhea. *Microbes and Infection*. Vol. 3. No. 13. Pp. 1145-1156.

Luque, D., Rivas, G., Alfonso, C., Carrascosa, J., Rodríguez, J., Castón, J. 2009. Infectious bursal disease virus is an icosahedral polypliod dsRNA virus. *The National Academy of Sciences of the USA*. Vol. 106. No. 7. Pp. 2148–2152.

Madara, J. 1987. Intestinal absorptive cell tight junctions are linked to cytoskeleton. *American Journal of Physiology*. Vol. 253. Pp. 171–175.

Maes, P., Matthijnsens, J., Rahman, M., Van Ranst, M. 2009. RotaC: a web-based tool for the complete genome classification of group A rotaviruses. *BMC Microbiology*. Vol. 9. No. 238.

Malherbe, H., Harwin, R., 1963. The cytopathic effects of vervet monkey viruses. *South African medical journal*. Vol. 37. Pp. 407–411.

Martella, V., Ciarlet, M., Camarda, A., Pratelli, A., Tempesta, M., Greco, G., Cavalli, A., Elia, G., Decaro, N., Terio, V., Bozzo, G., Camero, M., Buonavoglia, C. 2003. Molecular characterization of the VP4, VP6, VP7, and NSP4 genes of lapine rotaviruses identified in Italy: emergence of a novel VP4 genotype. *Virology*. Vol. 314. Pp. 358–370.

Martella, V., Ciarlet, M., Lavazza, A., Camarda, A., Lorusso, E., Terio, V., Ricci, D., Cariola, F., Gentile, M., Cavalli, A., Camero, M., Decaro, N., Buonavoglia, C. 2005. Lapine rotaviruses of the genotype P[22] are widespread in Italian rabbitries. *Veterinary microbiology*. Vol. 111. No. 1-2. Pp. 117-124.

Martella, V., Lavazza, A., Terio, V., Camarda, A., Cerioli, M., Elia, G., Pratelli, A., Buonavoglia, C. 2004. Exploring the epidemiology of Lapine Rotaviruses: evidence for spreading of rotaviruses displaying the newly-recognised p[22] vp4 gene allele in Italy. 8th World Rabbit Congress.

Matthijnsens, J., Bilcke, J., Ciarlet, M., Martella, V., Bányai, K., Rahman, M., Zeller, M., Beutels, P., Van Damme, P., Van Ranst, M. 2009. Rotavirus disease and vaccination: impact on genotype diversity. *Future Microbiology*. Vol. 4. No. 10. Pp. 1303 - 1316.

Matthijnssens, J., Ciarlet, M., McDonald, S., Attoui, H., Bányai, K., Rodney, J., Buesa, J., Mathew, D., Estes, M., Gentsch, J., Iturriza, I., Johne, R., Kirkwood, C., Martella, V., Mertens, P., Nakagomi, O., Parreño, V., Rahman, M., Ruggeri, F., Saif, L., Santos, N., Steyer, A., Taniguchi, K., Patton, J., Desselberger, U., Ranst, M. 2011<sup>a</sup>. Uniformity of Rotavirus Strain Nomenclature Proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Archives of virology*. Vol. 156. No. 8. Pp. 1397–1413.

Matthijnssens, J., Ciarlet, M., Rahman, M., Attoui, H., Bányai, K., Estes, M., Gentsch, J., Iturriza-Gómara, M., Kirkwood, C., Martella V., Mertens, P., Nakagomi, O., Patton, J., Ruggeri, F., Saif, L., Santos, N., Steyer, A., Taniguchi, K., Desselberger, U., Ranst, M. 2008. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Archives of virology*. Vol. 153. No. 8. Pp.1621–1629.

Matthijnssens, J., De Grazia, S., Piessens, J., Heylen, E., Zeller, M., Giammanco, GM., Bányai, K., Buonavoglia, C., Ciarlet, M., Martella, V., Van Ranst, M. 2011<sup>b</sup>. Multiple reassortment and interspecies transmission events contribute to the diversity of feline, canine and feline/canine-like human group A rotavirus strains. *Infection, Genetics and Evolution*. Vol. 11. No. 6. Pp. 1396–1406.

Matthijnssens, J., Otto, P., Ciarlet, M., Desselberger, U., Van Ranst, M., Johne, R. 2012. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Archives of virology*. Vol. 157. Pp. 1177–1182.

Matthijnssens, J., Rahman, M., Martella, V., Xuelei, Y., De Vos, S., De-Leener, K., Ciarlet, M., Buonavoglia, C., Van Ranst, M. 2006. Full Genomic Analysis of Human Rotavirus Strain B4106 and Lapine Rotavirus Strain 30/96 Provides Evidence for Interspecies Transmission. *Journal of Virology*. Vol. 80. No. 8. Pp. 3801–3810.

Matthijnssens, J., Van Ranst, M. 2012. Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans. *Current opinion in virology*. Vol. 2. No. 4. Pp. 426–433.

Mayor, S., Pagano, R. 2007. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Vol. 8. Pp. 603–612.

McClain, B., Settembre, E., Temple, B., Bellamy, A., Harrison, S. 2010. X-ray crystal structure of the rotavirus inner capsid particle at 3.8 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*. Vol. 397. No. 2. Pp. 587–599.

McDonald, S. M., Nelson, M. I., Turner, P. E., & Patton, J. T. 2016. Reassortment in segmented RNA viruses: mechanisms and outcomes. *Nature Reviews Microbiology*. Vol. 14. No. 7. Pp. 448.

McDonald, S., Patton, J. 2011. Assortment and packaging of the segmented rotavirus genome. *Trends in microbiology*. Vol. 19. No. 3. Pp. 136–144.

Mebus, C., Underdahl, N., Rhodes, M., Twiehaus, M. 1969. Further studies on neonatal calf diarrhea virus. *Proceedings, annual meeting of the United States Animal Health Association*. Vol. 73. Pp. 97–99.

Michelangeli, F., Liprandi, F., Chemello, M., Ciarlet, M., Ruiz, M. 1995. Selective depletion of stored calcium by thapsigargin blocks rotavirus maturation but not the cytopathic effect. *Journal of Virology*. Vol. 69. No. 6. Pp. 3838–3847.

Michelangeli, F., Ruiz, M., 2003. Physiology and pathophysiology of the gut in relation to viral diarrhea. In *Viral Gastroenteritis*. Dusselberger, U. and Gray, J., Eds. Zuckerman, A.J. and Mushahwar, I.K., Series Eds. *Perspectives in Medical Virology*. Elsevier, Amsterdam. Vol. 9. Pp. 23–50.

Mihalov-Kovács, E., Gellért, Á., Marton, S., Farkas, S. L., Fehér, E., Oldal, M., Jakab, F., Martella, V., Bányai, K. 2015. Candidate new rotavirus species in sheltered dogs, Hungary. *Emerging infectious diseases*. Vol. 21 No. 4. Pp. 660–663.

Mingo, R., Zhang, S., Long, C. P., LaConte, L. E., McDonald, S. M. 2017. Genetic determinants restricting the reassortment of heterologous NSP2 genes into the simian rotavirus SA11 genome. *Scientific reports*. Vol. 7. No. 1. Pp. 1–12.

- Murek, M., Kopic, S., Geibel, J. 2009. Evidence for intestinal chloride secretion. *Experimental physiology*. Vol. 95. No. 4. Pp. 471–485.
- Nabuurs, M. 1998. Weaning piglets as a model for studying pathophysiology of diarrhea. *Veterinary Quarterly*. Vol. 20. No. 30. Pp. 542-545.
- Newton, K., Meyer, J., Bellamy, A., Taylor, J. 1997. Rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 alters plasma membrane permeability in mammalian cells. *Journal of Virology*. Vol. 71. No. 12. Pp. 9458–9465.
- Nieddu, D., Grilli, G., Gelmetti, D., Gallazzi, D., Toccaceli, S., Lavazza, A. 2000. Electron microscopy detection of viral agents in rabbits with enteropathy during the period 1982-1999 in Italy. In: *Proc. 7th World Rabbit Congress*. 2000, July. Valencia, Spain. *World Rabbit Science*, 8 suppl. 1. Vol. B. Pp. 325-333.
- Oem, J. K., Lee, S. Y., Kim, Y. S., Na, E. J., Choi, K. S. 2019. Genetic characteristics and analysis of a novel rotavirus G3P [22] identified in diarrheic feces of Korean rabbit. *Infection, Genetics and Evolution*. Vol. 73. Pp. 368–377.
- Olanow, C. 1993. A radical hypothesis for neurodegeneration. *Trends in Neurosciences*. Vol. 16. No. 11. Pp. 439–444.
- Ousingsawat, J., Mirza, M., Tian, Y., Roussa, E., Schreiber, R., Cook, DI., Kunzelmann, K. 2011. Rotavirus toxin NSP4 induces diarrhea by activation of TMEM16A and inhibition of Na<sup>+</sup> absorption. *Pflügers Archiv: European journal of physiology*. Vol. 461. No. 5. Pp. 579–589.
- Papp, H., László, B, Jakab, F., Ganesh, B., De Grazia, S., Matthijnsens, J., Ciarlet, M., Martella, V., Bányai, K. 2013<sup>a</sup>. Review of group A rotavirus strains reported in swine and cattle. *Veterinary microbiology*. Vol. 165. No. 3-4. Pp. 190–199.
- Papp, H., Matthijnsens, J., Martella, V., Ciarlet, M., Bányai, K. 2013<sup>b</sup>. Global distribution of group A rotavirus strains in horses: a systematic review. *Vaccine*. Vol. 31. Pp. 5627–5633.

- Parra, G., Bok, K., Martínez, M., Gomez, J. 2004. Evidence of rotavirus intragenic recombination between two sublineages of the same genotype. *The Journal of general virology*. Vol. 85. No. 6. Pp. 1713–1716.
- Patton, J. 1990. Evidence for equimolar synthesis of double-strand RNA and minus-strand RNA in rotavirus-infected cells. *Virus Research*. Vol. 17. No. 3. Pp. 199–208.
- Patton, J. 2012. Rotavirus diversity and evolution in the post-vaccine world. *Discovery medicine*. Vol. 13. No. 68. Pp. 85–97.
- Patton, J., Silvestri, L., Tortorici, M., Vasquez-Del Carpio, R., Taraporewala, Z. 2006. Rotavirus Genome Replication and Morphogenesis: Role of the Viroplasm. *Current topics in microbiology and immunology*. Vol. 309. Pp. 169–187.
- Patton, J., Spencer, E. 2000. Genome replication and packaging of segmented double-stranded RNA viruses. *Virology*. Vol. 277. No. 2. Pp. 217–225.
- Patton, J., Vasquez-Del Carpio, R., Tortorici, M., Taraporewala, Z. 2007. Coupling of rotavirus genome replication and capsid assembly. *Advances in Virus Research*. Vol. 69. Pp. 167–201.
- Periz, J., Celma, C., Jing, B., Pinkney, J., Roy, P., Kapanidis, A. 2013. Rotavirus mRNAs are released by transcript-specific channels in the double-layered viral capsid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 110. No. 29. Pp. 12042–12047.
- Pesavento, J., Crawford, S., Estes, M., Prasad, B. 2006 Rotavirus proteins: Structure and assembly. *Current topics in microbiology and immunology*. Vol. 309. Pp. 189–219.
- Petric, M., Middleton, P., Grant, C., Tam, J., Hewitt, C. 1978. Lapine rotavirus: preliminary study on epizootology and transmission. *Canadian Journal of Comparative Medicine*. Vol. 42. No. 1. Pp. 143–147.

Prasad, B., Rothnagel, R., Zeng, C., Jakana, J., Lawton, J., Chiu, W., Estes, M. 1996. Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional complexes in rotavirus. *Nature*. Vol. 382. No. 6590. Pp. 471–473.

RCWG (Rotavirus Classification Working Group). 2019. Virus Classification. <https://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagenomics/virus-classification/rcwg> Consultado el 27 de Enero de 2019.

Riverón, R. 1999. Fisiopatología de la Diarrea Aguda. *Revista Cubana de Pediatría*. Vol. 71. No. 2. Pp. 86-115.

Rojas, M., Ayala, C., López, S. 2008. Biología molecular de Rotavirus: una mirada a través de la interferencia de RNA. Departamento de Genética y Fisiología Molecular. Instituto de Biotecnología, UNAM. Vol. 38.

Rotavirus Classification Working Group, 6th meeting, Valencia, October 2013.

Ruíz, M., Cohen, J., Michelangeli, F., 2000. Role of  $Ca^{2+}$  in the replication and pathogenesis of rotavirus and other viral infections. *Cell calcium*. Vol. 28. No. 3. Pp. 137–149.

Ruíz, M., Leon, T., Díaz, Y., Michelangeli, F. 2009. Molecular Biology of Rotavirus Entry and Replication. *The Scientific World Journal*. Vol. 9. Pp. 1476–1497.

SAGARPA. 2016. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. El Estado de México primer lugar en producción y consumo de conejo. *Boletín No. 78*. México. 2p.

SAGARPA. 2018. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Disponible en <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-pecuaria> Consultado el 23 de febrero de 2019.

Santos, N., Hoshino, Y. 2005. Global distribution of rotavirus serotypes/ genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Reviews in medical virology*. Vol. 15. No. 1. Pp. 29–56.

- Sato, K., Inaba, Y., Miura, Y., Tokuhisa, S., Matumoto, M. 1982. Antigenic relationships between rotaviruses from different species as studied by neutralization and immunofluorescence. *Archives of Virology*. Vol. 73. No. 1. Pp. 45–50.
- Schoeb, T. R., Casebolt, D. B., Walker, V. E., Potgieter, L. N., Thouless, M. E., DiGiacomo, R. F. 1986. Rotavirus-associated diarrhoea in a commercial rabbitry. *Laboratory Animal Science*. Vol. 36. No. 2. Pp.149–152.
- Schoondermark-van de Ven, E., Van Ranst, M., de Bruin, W., van den Hurk, P., Zeller, M., Matthijnsens, J., Heylen, E. 2013. Rabbit colony infected with a bovine-like G6P [11] rotavirus strain. *Veterinary microbiology*. Vol. 166. No. 1-2. Pp. 154-164.
- Seo, N., Zeng, C., Hyser, J., Utama, B., Crawford, S., Kim, K., Höök, M., Estes, M. 2008. Integrins alpha1beta1 and alpha2beta1 are receptors for the rotavirus enterotoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 105. No. 26. Pp. 8811–8818.
- Settembre, E., Chen, J., Dormitzer, P., Grigorieff, N., Harrison, S. 2011. Atomic model of an infectious rotavirus particle. *The EMBO journal*. Vol. 30. No. 2. Pp. 408–416.
- Sierra, P. 1997. Diarrea interpretación de la enfermedad. XX Congreso Colombiano de Pediatría. Sociedad Colombiana de Pediatría.
- Solberg, O., Hasing, M., Trueba, G., Eisenberg, J. 2009. Characterization of novel VP7, VP4, and VP6 genotypes of a previously untypeable group A rotavirus. *Virology*. Vol. 385 Pp. 58–67.
- Tafazoli, F., Zeng, C., Estes, M., Magnusson, K., Svensson, L. 2001. NSP4 enterotoxin of rotavirus induces paracellular leakage in polarized epithelial cells. *Journal of Virology*. Vol. 75. No. 3. Pp. 1540-1546.

Taraporewala, Z., Patton, J. 2001. Identification and characterization of the helix-destabilizing activity of rotavirus nonstructural protein NSP2. *Journal of Virology*. Vol. 75. No. 10. Pp. 4519–4527.

Taylor, J., O'Brien, J., Yeager, M., 1996. The cytoplasmic tail of NSP4, the endoplasmic reticulum-localized non-structural glycoprotein of rotavirus, contains distinct virus binding and coiled coil domains. *The EMBO journal*. Vol. 15. No 17. Pp. 4469–4476.

Thouless, M., Digiacomio, R., Deeb, B., Howard, H. 1988. Pathogenicity of Rotavirus in Rabbits. *Journal of clinical microbiology*. Vol. 26. No. 5. Pp. 943-947.

Tian, P., Ball, J., Zeng, C., Estes, M. 1996. The rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 possesses membrane destabilization activity. *Journal of Virology*. Vol. 70. No. 10. Pp. 6973–6981.

Tolia, U., Dubais, R. 1985. Update of oral rehydration: its place in treatment of acute gastroenteritis. *Pediatric Annals*. Vol. 14. No. 4. Pp. 295-303.

Trask, S., Dormitzer, P. 2006. Assembly of highly infectious rotavirus particles recoated with recombinant outer capsid proteins. *Journal of Virology*. Vol. 80. No. 22. Pp. 11293–11304.

Troeger, C., Forouzanfar, M., Rao, P. C., Khalil, I., Brown, A., Reiner Jr, R. C., Fullman, N., et al. 2017. Estimates of global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal diseases: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet Infectious Diseases*. Vol. 17. No. 9. Pp. 909–948.

Trojnar, E., Sachsenroder, J., Twardziok, S., Reetz, J., Otto, P., Johne, R. 2013. Identification of an avian group A rotavirus containing a novel VP4 gene with a close relationship to those of mammalian rotaviruses. *The Journal of general virology*. Vol. 94. Pp. 136 -142.

Tsugawa, T., Tatsumi, M., & Tsutsumi, H. 2014. Virulence-associated genome mutations of murine rotavirus identified by alternating serial passages in mice and cell cultures. *Journal of virology*. Vol. 88. No. 10. Pp. 5543-5558.

Urasawa, T., Urasawa, S., Taniguchi, K. 1981. Sequential passages of human rotavirus in MA-104 cells. *Microbiology and immunology*. Vol. 25. No. 10. Pp. 1025–1035.

Vende, P., Taraporewala, Z., Patton, J. 2002. RNA-binding activity of the rotavirus phosphoprotein NSP5 includes affinity for double-stranded RNA. *Journal of Virology*. Vol. 76. No. 10. Pp. 5291–5299.

Vizzi, E. 2009. Rotavirus: consideraciones biológicas, epidemiológicas e inmunológicas de la infección en humanos. *Salus online. Biología Molecular*. Vol. 12 Sup. 1. Pp. 14-31.

Ward, R. L., Clemens, J. D., Sack, D. A., Knowlton, D. R., Mcneal, M. M., Huda, N., Ahmed, F., Rao, M., Schiff, G. M. 1991. Culture adaptation and characterization of group A rotaviruses causing diarrheal illnesses in Bangladesh from 1985 to 1986. *Journal of clinical microbiology*. Vol. 29. No. 9. Pp. 1915–1923.

Willoughby, R., Yolken, R. 1990. SA11 rotavirus is specifically inhibited by an acetylated sialic acid. *The Journal of Infectious Diseases*. Vol. 161 Pp. 116–119.

Zárate, S., Espinosa, R., Romero, P., Méndez, E., Arias, C., López, S. 2000. The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells. *Journal of Virology*. Vol. 74. Issue 2. Pp. 593–599.

Zárate, S., Romero, P., Espinosa, R., Arias, C., López, S. 2004. VP7 Mediates the Interaction of Rotaviruses with Integrin  $\alpha 3$  through a Novel Integrin-Binding Site. *Journal of Virology*. Vol. 78. No. 20. Pp. 10839–10847.