



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

IDENTIFICACIÓN DE LOS GENOTIPOS DE ROTAVIRUS EN CONEJOS DE LA ZONA SUR-ORIENTE DEL ESTADO DE MÉXICO

TESIS

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

PRESENTA

M.V.Z. EMMANUEL REYNOSO UTRERA

COMITÉ DE TUTORES

Dra. Linda Guiliana Bautista Gómez. Tutora Académica

Dr. Camilo Romero Núñez. Tutor Adjunto

Dr. José Simón Martínez Castañeda. Tutor Adjunto

Amecameca de Juárez, Estado de México. Diciembre 2016.

Resumen

Rotavirus grupo A (RVA), son considerados una de las principales causas de gastroenteritis viral aguda en humanos y animales jóvenes en todo el mundo. La partícula de rotavirus se encuentra constituida por seis proteínas estructurales (VP1-VP4, VP6 y VP7) y seis no estructurales (NSP1-NSP6). VP4 y VP7 son proteínas de la cápside externa que representan los principales determinantes antigénicos, ya que provocan de forma independiente respuestas de anticuerpos neutralizantes y es a partir de su variabilidad genética/antigénica que se determinan los genotipos P y G respectivamente de rotavirus. Al menos 32 genotipos G y 46 genotipos P se han reconocido hasta la fecha. El estudio de las características genéticas de RVA que infectan a los conejos (cepa Lapine) ha sido limitado y hasta hoy en día, se ha reportado que las combinaciones de genotipos G/P más comunes y epidemiológicamente importantes en conejos son G3 P[14] y G3 P[22]. En el presente estudio, se ha realizado la caracterización genotípica de rotavirus grupo A detectado a partir de un brote de enteritis en una producción cunícola de la zona sur-oriente del Estado de México. Basado en la secuencia y análisis filogenético de los genes VP4 y VP7, la cepa identificada en este estudio demostró tener un genotipo G3 P[8] de rotavirus, lo cual contrasta con los genotipos reportados en conejos a nivel mundial. El genotipo G3 ha sido reportado en una amplia variedad de hospederos, incluyendo humanos y conejos, mientras que el genotipo P[8] únicamente ha sido reportado en humanos. Considerando la naturaleza segmentada del genoma de rotavirus y su considerable capacidad de generar mutantes a través de eventos de reordenamiento/recombinación genética y debido a que la combinación de genotipos aquí presentada nunca ha sido identificada en conejos, se propone que dicho hallazgo posiblemente es resultado de eventos de recombinación genética, la cual involucra cepas de humano y conejo, con la posible capacidad de producir enteritis en la población cunícola. Se sugiere la probabilidad de que la cepa lapine no se encuentre circulando en producciones cunícolas en México. Este es el primer reporte del estudio de las características moleculares de rotavirus en conejos de México.

1. Introducción

Los rotavirus (RV) son virus ARN de doble cadena (dsRNA), miembros de la familia *Reoviridae*, subfamilia *Sedoreovirinae*, género *Rotavirus* (ICTV, 2015), son considerados una de las principales causas de gastroenteritis viral aguda en diversas especies animales en todo el mundo (Bishop, 2009; Estes y Kapikian, 2007; Tate *et al.*, 2012), incluyendo conejos (Schoeb *et al.*, 1986; citado en Lavazza *et al.*, 2008). Rotavirus cepa Lapine (LRV) se considera poco virulenta (Thouless *et al.*, 1988), sin embargo puede causar cuadros entéricos, principalmente en conejos post-destete. LRV se caracteriza por una alta tasa de morbilidad y la presencia de signos clínicos inespecíficos, tales como diarrea, deshidratación, anorexia y depresión, lo cual representa un grave problema en explotaciones cunícolas (Lavazza *et al.*, 2008).

La cápside externa del virión de rotavirus está constituida por las proteínas VP4 y VP7, las cuales son los principales determinantes antigénicos (Estes y Kapikian, 2007), y es a partir de su variabilidad genética/antigénica que se determinan los genotipos P y G respectivamente (Estes y Cohen, 1989; Estes y Kapikian, 2007). Al menos 32 genotipos G y 46 genotipos P se han reconocido hasta la fecha (RCWG, 2016)

Actualmente pocos estudios se han centrado en la infección por rotavirus en conejos en general y sus características moleculares en particular (Bonica *et al.*, 2015). LRV ha sido aislada en Canadá (LRV) (Petric *et al.*, 1978), Japón (R-2) (Sato *et al.*, 1982), Italia (82/311F) (Castrucci *et al.*, 1985), Estados Unidos (ALA, C-11, BAP-2) (Conner *et al.*, 1988; Ciarlet *et al.*, 1997), Hungría (Banyai *et al.*, 2005), China (N-5) (Guo *et al.*, 2012) y Corea (Yeon *et al.*, 2013), 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.

Rotavirus ha sido identificado en conejos en México a través de RT-PCR (Reynoso, 2014), sin embargo aún no se ha determinado la cepa ni sus características genotípicas, motivo por el cual en el presente estudio se llevará a cabo la identificación genotípica de rotavirus en conejos a través del análisis de los genes VP4 Y VP7.

2. Revisión de literatura

2.1. Virus

Los virus son organismos biológicos submicroscópicos (SOPT, 2010), compuestos de dos o tres partes: su material genético, que porta la información hereditaria; una cubierta proteica que protege a estos genes (Cápside) y en algunos también se puede encontrar una bicapa lipídica que los rodea cuando se encuentran fuera de la célula (envoltura vírica o peplo) (Carter *et al.*, 2005). Los virus no pueden realizar actividades metabólicas de manera independiente (DRAE, 2014); carecen de los componentes necesarios para la replicación celular o para llevar a cabo la síntesis de proteínas (Carter *et al.*, 2005), por tal motivo, requieren la maquinaria de biosíntesis y de generación de energía de células vivas para replicarse, considerándolos parásitos intracelulares (SOPT, 2010).

2.1.1. Generalidades de los virus

A continuación se enlistan las propiedades comunes a todos los virus (Carter *et al.*, 2005; Dimmock *et al.*, 2007).

- Son mucho más pequeños que las células procariontes o eucariontes; la mayoría de los virus estudiados tienen un diámetro de entre 10 y 300 nanómetros.
- En general, a diferencia de las células, los virus tienen una estructura simple y estática.
- No poseen un sistema metabólico propio.
- Dependen de la maquinaria de la célula hospedera para su replicación (parásitos intracelulares estrictos).
- Tienen genomas de DNA o RNA, pero carecen de ribosomas y otros factores necesarios para la traducción de proteínas. Así pues, dependen de la célula hospedera para la producción de proteínas virales.
- Sus genomas codifican información mínima para asegurar lo siguiente: 1) replicación del genoma y empaquetamiento; 2) producción de proteínas

virales; y 3) subvertir funciones celulares para permitir la producción de viriones.

- Algunos virus (bacteriófagos) infectan células procariontes, mientras que otros infectan células eucariontes.
- Algunos virus destruyen las células, produciendo enfermedad; otros persisten en estado latente o persistente en la célula infectada; y otros pueden causar transformación maligna de las células a las que infecta.
- En comparación con el genoma celular, los genomas virales son pequeños, sin embargo éstos varían en tamaño en más de 100 veces; de entre 3000 a 1.200.000 pares de bases.
- Los genomas virales están asociados con la proteína que en su forma más simple es la partícula del virus, pero en algunos virus esta nucleoproteína está rodeada por otras proteínas y/o una bicapa lipídica.
- Las proteínas periféricas de la partícula viral permiten al virus reconocer el sitio correcto de adhesión celular y poder entrar en su citoplasma.

2.1.2. Estructura viral

Dimmock *et al.*, (2007) indica que todos los genomas de los virus están rodeados por proteínas que:

- Protegen a los ácidos nucleicos a partir de la degradación de la nucleasa (enzimas nucleolíticas).
- Contienen elementos de identificación, que garantizan el reconocimiento de una célula diana apropiada.
- Poseen un sistema de liberación del genoma viral que asegura que éste sea liberado de una partícula sólo en el momento y lugar adecuado.
- Incluyen las enzimas esenciales para la infectividad de algunos virus.
- Se denominan proteínas estructurales, ya que son parte de la partícula viral.

Una partícula vírica completa (virión), consiste en un ácido nucleico rodeado por una capa de protección proteica llamada cápside. Las cápsides están compuestas de

subunidades proteicas idénticas llamadas capsómeros. Al ácido nucleico más la cubierta o cápside de una partícula viral es frecuentemente llamada nucleocápside. Los virus envueltos contienen una membrana externa que rodea a la nucleocápside, dicha envoltura viral se deriva de membranas de la célula hospedera (nuclear, de aparato de Golgi, de retículo endoplásmico o membrana plasmática). Tal como estas membranas, la envoltura viral se compone de una bicapa lipídica con proteínas insertadas en ella, proteínas que son codificadas por el virus. Los virus más simples carecen de envoltura y tienen ADN o ARN de cadena sencilla (Mahy *et al.*, 2007).

Carter *et al.*, (2005), indica que de acuerdo a su morfología, existen cinco estructuras virales básicas diferentes:

- Icosaédrico desnudo.
- Helicoidal desnudo.
- Icosaédrico envuelto.
- Helicoidal envuelto.
- Complejos.

De acuerdo a la naturaleza del presente estudio, nos enfocaremos en los virus de estructura icosaédrica, siendo este tipo de virus en su mayoría los que infectan a los animales. Un icosaedro regular es la mejor manera de formar una carcasa cerrada a partir de subunidades idénticas. El número mínimo requerido de capsómeros idénticos es doce, cada uno compuesto de cinco subunidades idénticas. Muchos virus, como los rotavirus, tienen más de doce capsómeros y parecen esféricos, manteniendo esta simetría, los ápices de los capsómeros están rodeados por otros cinco capsómeros y reciben el nombre de pentones, las caras triangulares de éstos también se componen de otros seis capsómeros y reciben el nombre de hexones (Mahy *et al.*, 2007).

2.1.3. Replicación viral

Como parásitos intracelulares, los virus dependen en gran medida del uso de numerosos mecanismos celulares para llevar a cabo exitosamente su ciclo de replicación (Paul y Bartenschlager, 2013).

Muchos virus animales toman ventaja de las vías endocíticas para conducirse a través de un programa de entrada y descubrimiento complejo (Smith y Helenius, 2004).

La replicación del genoma y el ensamble de los virus por lo general se llevan a cabo en compartimientos intracelulares específicos en los que se concentran los componentes virales, aumentando así la eficiencia de los procesos de replicación. Para un gran número de virus, se ha descrito la formación de "fábricas", que consisten en focos perinucleares o citoplasmáticos que excluyen en su mayoría a proteínas del huésped y algunos orgánulos, pero reclutan otros orgánulos celulares específicos para la construcción de una estructura única. La formación de la fábrica vírica implica una serie de interacciones complejas y eventos de señalización entre factores virales y celulares. Las mitocondrias, la membrana citoplasmática, así como componentes del citoesqueleto participan con frecuencia en la formación de las factorías virales, siendo el suministro de las necesidades básicas y comunes para los pasos clave en el ciclo de replicación viral (Novoa *et al.*, 2005).

Los detalles precisos de la replicación varían para virus individuales, pero tienen en común una serie de eventos específicos en el ciclo de multiplicación. La primera etapa recibe el nombre de adhesión o adsorción, en la cual se establece una unión entre proteínas de la cápside vírica y receptores específicos de la superficie celular del huésped, pero algunos bacteriófagos también son capaces de adherirse a los flagelos, vellosidades (pili) o cápsulas presentes en la superficie de la bacteria hospedera. La especificidad de unión proteína – cápside se determina por la variedad de huéspedes de los virus, mecanismo que ha evolucionado para favorecer a virus que sólo pueden infectar células en que se pueden replicar. La adhesión al

receptor, puede inducir cambios en la proteína de la envoltura viral, resultando en la fusión de las membranas viral y celular (Dimmock *et al.*, 2007).

Después de haberse unido a la superficie celular, el virus debe realizar un efecto de entrada (endocitosis mediada por receptores o por fusión de membrana) para ser capaz de replicarse, esto se lleva a cabo en un proceso llamado penetración vírica. Una vez dentro de la célula, el genoma viral está disponible para la replicación. Esto se consigue por la pérdida de muchas, o todas, de las proteínas que componen la partícula en un proceso conocido como descubrimiento (Smith y Helenius, 2004).

Para algunos virus, las fases de entrada y pérdida de la envoltura se combinan en un solo proceso. Típicamente, estas tres primeras fases no requieren el gasto de energía. Una vez disponible el genoma viral, será usado en la fase de biosíntesis cuando la replicación del genoma, la transcripción de RNAm y la traducción del mismo den lugar a las proteínas virales. El proceso de traducción utiliza ribosomas proporcionadas por la célula huésped y es este requisito para el proceso de traducción, así como la necesidad de moléculas para la biosíntesis, que hace que los virus sean parásitos intracelulares obligados. El genoma recién sintetizado puede entonces ser utilizado como plantilla para más rondas de replicación y como plantillas para la transcripción de más RNAm de virus, en un proceso de amplificación que aumenta el rendimiento del virus a partir de la célula infectada (Dimmock *et al.*, 2007).

Al unirse los nuevos genomas con las proteínas del virus recién sintetizadas, se forman partículas de virus iguales a los progenitores, o sea, partículas virales completas, en un proceso llamado ensamble. Finalmente, las partículas deben salir de la célula en una fase de liberación, después de lo cual buscan nuevas células huésped potenciales para comenzar el proceso nuevamente. Las partículas virales producidas dentro de la célula pueden requerir un posterior procesamiento para convertirse en infecciosas, y esta fase de maduración puede ocurrir antes o después de la liberación (Smith y Helenius, 2004).

2.1.4. Genoma viral

El ácido nucleico de un virus contiene toda la información necesaria para producir nuevas partículas virales. Parte de esta información se utiliza directamente para sintetizar componentes del virión y otra parte para hacer proteínas accesorias o para proporcionar señales que permiten al virus alterar la maquinaria biosintética celular y reorientar su mecanismo hacia la producción del virus. Considerando que la forma común del material genético en los sistemas vivos es DNA de doble cadena, los virus contienen una gran variedad en cuanto a la forma y composición de sus ácidos nucleicos. El tipo de genoma viral se ha utilizado como base para la clasificación de los virus (Dimmock *et al.*, 2007).

El genoma viral está compuesto por DNA o RNA, un virus no contiene los dos simultáneamente (Smith y Helenius, 2004). El material genético puede ser de una sola cadena (ss por sus siglas en inglés), de doble cadena (ds), o parcialmente de doble cadena. El genoma puede tener sus extremos covalentemente ligados el uno al otro (circular) o no estar unido por sus extremos (lineal). Un ejemplo es el genoma de los virus de viruela (poxvirus), el cual es ssDNA cuyos extremos están covalentemente unidos uno al otro. Los virus pueden presentar su genoma en una sola pieza (monopartita), o bien, éste puede estar dividido en varios segmentos (Carter *et al.*, 2005).

De forma general, los genomas de los virus RNA son más pequeños que los de DNA, con un tamaño máximo de 30,000 nucleótidos (nt) como ejemplo tenemos a los Coronavirus. Una hipótesis para esto es que las polimerasas RNA virales tienden a cometer más errores que las polimerasas DNA. Así, la fidelidad de la replicación puede limitar el tamaño. En contraste, los genomas de virus de DNA pueden alcanzar un tamaño de hasta 300,000 nt, como en algunas especies de Herpesvirus. Todos los genomas virales de RNA son lineales. La mayoría de estos son de cadena sencilla y unos pocos son de cadena doble. Carter *et al.*, (2005), señala que en cuanto a ssRNAs, existen tres posibilidades importantes:

- Si el ssRNA funciona como mensajero para la traducción de proteínas (tiene la misma orientación que el RNAm), se le llama sentido positivo.
- En contraste, si el RNA viral es antisense (o complementario) a ese RNAm (y entonces no puede ser traducido directamente) se dice que es sentido negativo.
- En algunos virus se transcriben porciones del genoma de RNA, generando sRNA mensajeros que son entonces traducidos. La copia de estos sRNAm (complementaria, supuestamente RNAs sentido negativo) puede ser también traducida. Este arreglo es único entre los virus, y se dice que es ambos sentidos (Ambisense).

Los virus muestran una gran diversidad en cuanto a su morfología, estructura del genoma, modo de infección, gama de huéspedes, tropismo tisular, etc., cada una de estas propiedades pueden ser utilizadas para colocar a los virus en grupos, sin embargo la clasificación de los virus únicamente sobre la base de uno o incluso dos de estos parámetros no da lugar a un sistema donde el estudio de un virus en un grupo en particular pueda ser usado para sacar conclusiones acerca de otros miembros del mismo grupo. Con el fin de evitar todos estos problemas, el Premio Nobel David Baltimore propuso un esquema de clasificación que abarca todos los virus con base en la naturaleza de sus genomas, sus modos de replicación y la expresión génica. Este sistema proporciona una oportunidad de hacer inferencias y predicciones sobre la naturaleza fundamental de todos los virus dentro de cada grupo definido (Dimmock *et al.*, 2007).

El ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) clasifica los virus de RNA en el Grupo III, Grupo IV y Grupo V dentro del sistema de clasificación de Baltimore para la clasificación de los virus, y no considera virus de DNA en cuyo ciclo de replicación actúen virus de RNA intermediarios. Los virus que poseen RNA como material genético, pero que incluyen productos intermedios de DNA en su ciclo de replicación se denominan retrovirus, y comprenden el grupo VI de la clasificación de Baltimore (King *et al.*, 2012).

2.2. Rotavirus

Los Rotavirus (RV) son virus RNA de doble cadena (dsRNA), miembros de la familia *Reoviridae*, subfamilia *Sedoreovirinae*, género Rotavirus (ICTV, 2015; Estes y Kapikian, 2007), causan enfermedad diarreica severa en diversas especies de mamíferos, incluyendo el hombre (Greenberg y Estes, 2009; Bishop, 2009; citado en Bonica *et al.*, 2015), siendo la causa más importante de enfermedad diarreica severa en niños y jóvenes de todo el mundo (Bishop *et al.*, 1973; citado en Desselberger, 2014), afectan al 95% de niños menores de 5 años de edad, causan un estimado de 2 millones de hospitalizaciones y 453.000 muertes infantiles anuales, la mayoría de ellos en países en desarrollo (Parashar *et al.*, 2003^a; Parashar *et al.*, 2003^b; citado en Ghosh y Kobayashi, 2014).

2.2.1. Antecedentes

En los últimos 40 años se estudiaron y se demostraron numerosos virus como agentes causales de gastroenteritis en humanos: adenovirus, minireovirus, agente Norwalk, astrovirus, calicivirus, coronavirus y rotavirus, siendo estos últimos los más frecuentes como agentes causales de diarrea en niños, animales mamíferos jóvenes y en algunas especies de aves. Los rotavirus han cumplido con los criterios requeridos para definir un virus como agente etiológico de gastroenteritis en humanos y animales, como son: hallazgo y cultivo del virus a partir del intestino del caso clínico, demostración de una respuesta inmune específica contra el virus y transmisibilidad natural y experimental de la enfermedad diarreica (Bastardo y Maldonado, 2012).

Los Rotavirus en humanos fueron inicialmente descritos en 1973 por Ruth Bishop y colaboradores en Melbourne, Australia (Bishop *et al.*, 1973; Flewett *et al.*, 1973), en células epiteliales de la mucosa duodenal de niños con gastroenteritis, y luego identificados en las heces de niños con gastroenteritis aguda (Vizzi, 2009).

El año siguiente y casi simultáneamente, mediante microscopía electrónica y tinción negativa, se reconocieron partículas virales de 65 a 75 nanómetros (nm) de diámetro

en heces de muchos niños con gastroenteritis aguda en Australia, Inglaterra, Estados Unidos de Norteamérica y Canadá (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).

En un principio a estos virus se les dieron muchos nombres como: Orbivirus (en 1973), Rotavirus (1974), Duovirus (1975), Virus de la Gastroenteritis Infantil (1975), agentes parecidos a los Reovirus (Kapikian en 1976 y Konno en 1977), pero rotavirus se eligió como nombre genérico oficial en 1979 (Bastardo y Maldonado, 2012).

2.2.2. Clasificación

De acuerdo al Comité Internacional de Taxonomía de Virus, los rotavirus son clasificados como un género dentro de la Familia *Reoviridae* y Subfamilia *Sedoreovirinae*, sin orden asignado (ICTV, 2015).

Hasta hoy en día, de acuerdo con la reactividad serológica y la variabilidad genética de la proteína de la cápside intermedia VP6, se han diferenciado ocho grupos (también denominadas especies) de rotavirus (A, B, C, D, E, F, G y H), que difieren en sus características antigénicas, epidemiológicas, la especie animal y los grupos de edades más susceptibles (Matthijnssens *et al.*, 2011^a; Patton, 2012).

Los grupos de rotavirus pertenecientes a la especie A, B y C (RVA, RVB y RVC, respectivamente) son conocidos por infectar humanos y diversos animales (principalmente los del grupo 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, principalmente aves (tabla 1) (Matthijssens *et al.*, 2012^a).

En base a la especificidad antigénica de la proteína VP6, dentro del grupo 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 cápside externa que representan los principales determinantes antigénicos, ya que provocan de forma independiente respuestas de anticuerpos neutralizantes, y es a partir de su variabilidad genética/antigénica que se determinan los genotipos G y P respectivamente (Estes y Cohen, 1989; Estes y Kapikian, 2007). Al menos 32 genotipos G y 46 genotipos P (figura 1) se han reconocido hasta la fecha (Matthijssens *et al.*, 2011^a; Trojnar *et al.*, 2013; ICTV, 2015).

Tabla 1. Grupos de Rotavirus detectados en diferentes especies de mamíferos y/o aves. (Ghosh y Kobayashi, 2014).

Grupo	Especies hospedadoras
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

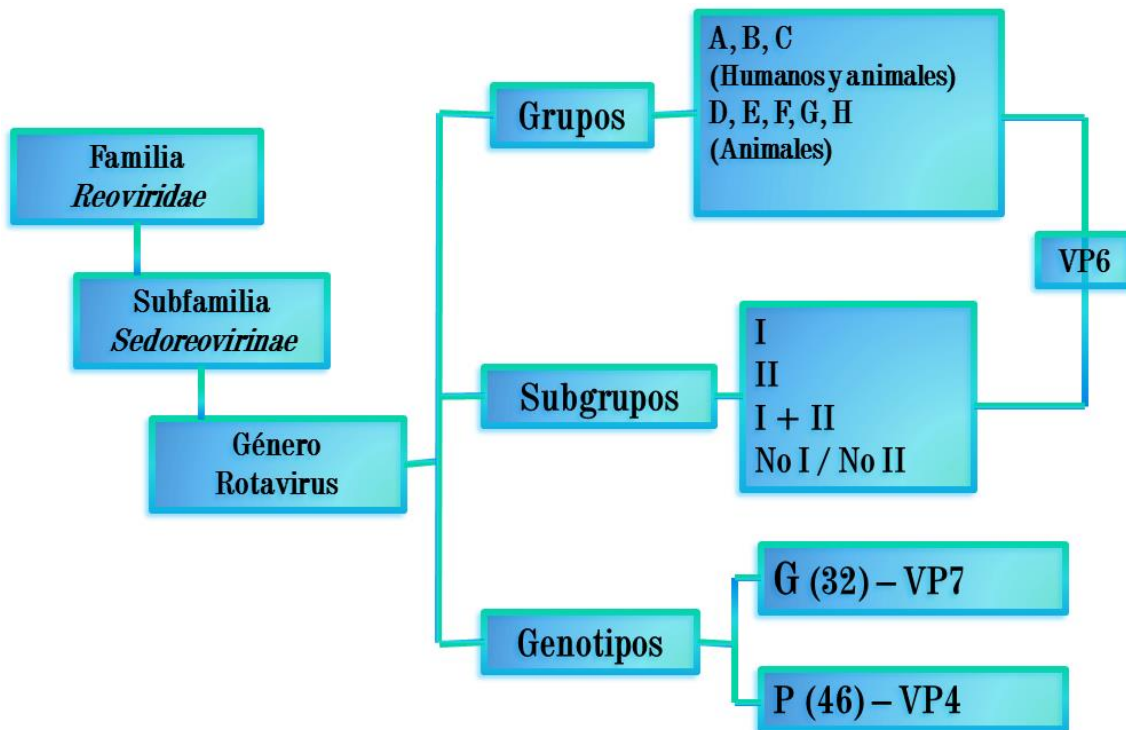


Figura 1. Clasificación de los rotavirus (Matthijnssens *et al.*, 2012^b; Cilli *et al.*, 2013; ICTV, 2015).

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).

Dentro del grupo A, las que predominan alrededor del mundo son las cepas de los serotipos G1 al 4, G9 y P1. Existen también genotipos P dependiendo de su similitud en secuencia de ácidos nucleicos. 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).

Se propuso un sistema de clasificación de acuerdo al genotipo para los 11 segmentos del genoma para su uso en la designación de nuevos genotipos. De ésta manera se ha introducido un sistema de clasificación integral, basado en la

secuencia de nucleótidos que comprende el genoma completo de RVA (Matthijnsens *et al.*, 2008). En dicho sistema, 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 (Matthijnsens *et al.*, 2011^a). En la tabla 2 se muestra el grado de diversidad genómica entre los Rotavirus del grupo A que co-circulan en los diferentes grupos de poblaciones y animales.

Tabla 2. Genotipos de las especies A de Rotavirus. Tomado de Matthijnsens *et al.*, (2009^a).

RV proteína	Porcentaje de identidad ^a	Número de genotipos ^b	Genotipo (acrónimo subrayado)
VP7	80	32 G	<u>G</u> lycosylated (glucosilada)
VP4	80	46 P	<u>P</u> rotease-sensitive (sensible a la proteasa)
VP6	85	18 I	<u>I</u> nter capsid (cápside interna)
VP1	83	9 R	<u>R</u> dRp ^c
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 traducción)
NSP4	85	15 E	<u>E</u> nterotoxin (enterotoxina)
NSP5	91	11 H	<u>P</u> hosphoprotein (fosfoproteína)

^aPorcentaje de identidad de nucleótidos de corte que define genotipos.

^bRotavirus Classification Working Group, 2013.

^cRNA dependiente de RNA polimerasa.

2.2.3. Estructura

La partícula de rotavirus mide aproximadamente 100 nm de diámetro, no posee envoltura y presenta una cápside proteica compuesta por tres capas concéntricas icosaédricas (figura 2). Cada partícula contiene una RNA-Polimerasa dependiente de RNA (Estes y Cohen, 1989). El virión consiste en seis proteínas estructurales (VP1-VP4, VP6 y VP7) y seis proteínas no estructurales (NSP1-NSP6) (Estes y Cohen, 1989; Pesavento *et al.*, 2006; citados en Bonica *et al.*, 2015).

Como se ha mencionado, el virión de los diferentes grupos de rotavirus está compuesto por tres capas concéntricas de proteínas que engloban el genoma viral. La capa externa está formada por la glicoproteína VP7 y la proteína VP4; la capa intermedia se conforma por la proteína VP6, que es la más abundante del virus, constituyendo aproximadamente el 50% de la proteína total del virión. Esta proteína rodea la capa interna o nucleocápside del virus que está formada por las proteínas VP1, VP2 y VP3 (Estes y Kapikian, 2007; citados en Matthijnssens *et al.*, 2012^a).

El triple estrato proteico que forma al virión consiste de 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). VP1 y VP3, involucradas en el proceso de transcripción, se unen a la superficie interna de VP2, formando un complejo trimérico. Doscientos sesenta trímeros de VP6 constituyen la capa intermedia, que junto al core forma las partículas de doble cápside o DLP (por sus siglas en inglés: double-layer particle). La capa externa está formada por dos proteínas, VP4 y VP7; 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).

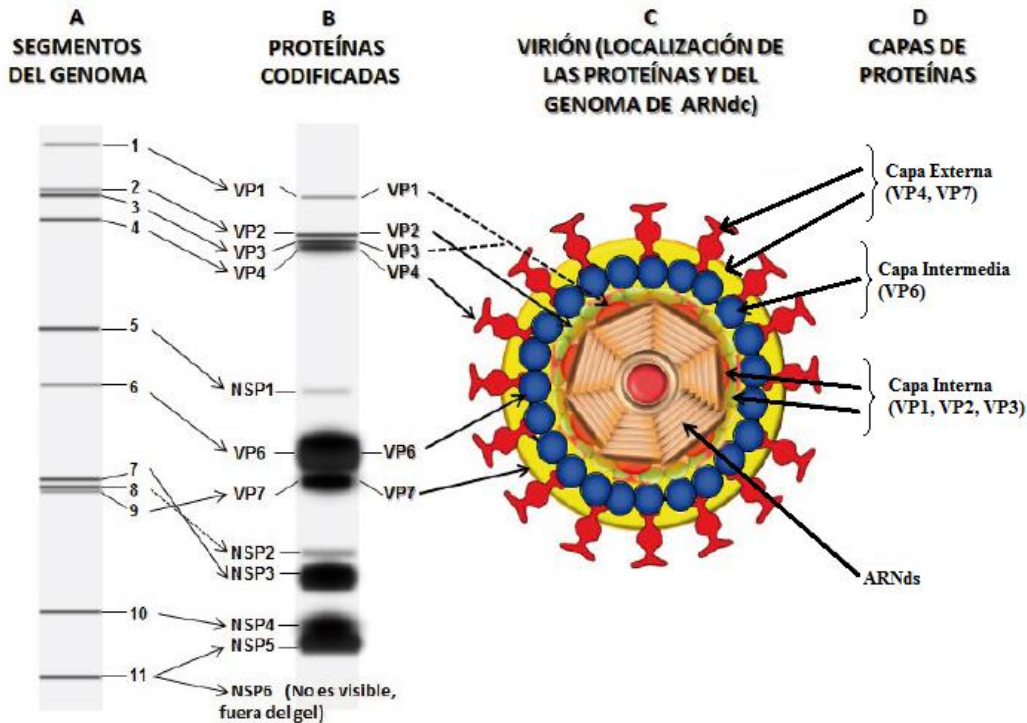


Figura 2. Representación esquemática de la estructura de Rotavirus: A) Los once segmentos de RNA de doble cadena que conforma el genoma como se observan por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) y tinción con nitrato de plata. B) Proteínas codificadas por cada uno de los once segmentos genómicos. C) La manera como se disponen las proteínas y el genoma de RNAs para formar el virión o partícula viral completa. D) Las tres capas concéntricas de proteínas que encierran al genoma viral y las distintas proteínas que integran cada capa. Tomado de Bastardo y Maldonado, (2012).

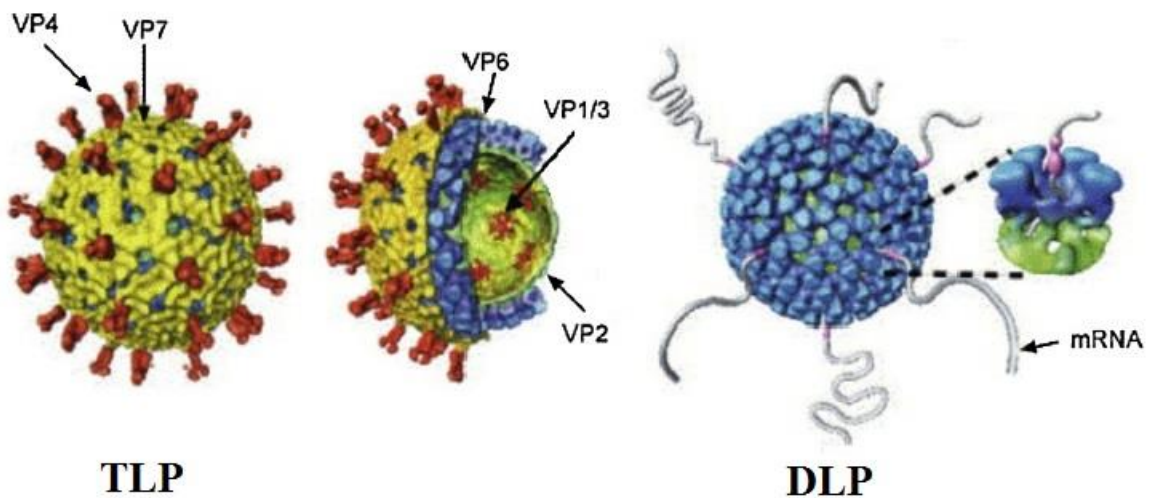


Figura 3. Modelo de reconstrucción a través de Cryo-EM de partículas de triple capa (TLP) y partículas de doble capa (DLP) de Rotavirus. Tomado de Jayaram *et al.*, (2004).

La proteína VP4 tiene funciones esenciales en el ciclo de vida del virus, incluyendo la unión al receptor (presenta un sitio de clivaje para la tripsina) y la penetración a la célula que infecta; por lo tanto, las propiedades de esta proteína son determinantes importantes del rango de huésped, virulencia, tropismo, e inducción de inmunidad protectora (Estes y Kapikian, 2007). En muchas cepas de Rotavirus, VP4 es una hemoaglutinina y media el ataque celular, la virulencia y la restricción de crecimiento del virus en células de tejido en cultivo. VP7, la segunda proteína más abundante del virión, es una glicoproteína que al igual que VP4, es inmunogénica, su papel durante las primeras interacciones del virus con la célula no es muy claro, aunque se ha demostrado recientemente que interacciona con la superficie celular en eventos posteriores a la unión inicial (Zárate *et al.*, 2004; citado en Rojas *et al.*, 2008).

El clivaje de VP4 con tripsina en la célula huésped da como resultado la escisión específica de VP4 para proporcionar 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).

Dentro de la nucleocápside se encuentran los once segmentos de RNA de doble cadena que constituyen el genoma viral, estos once segmentos, según lo revelan estudios de criomicroscopía electrónica, parece que están ordenados geométricamente dentro de la partícula (Bastardo y Maldonado, 2012).

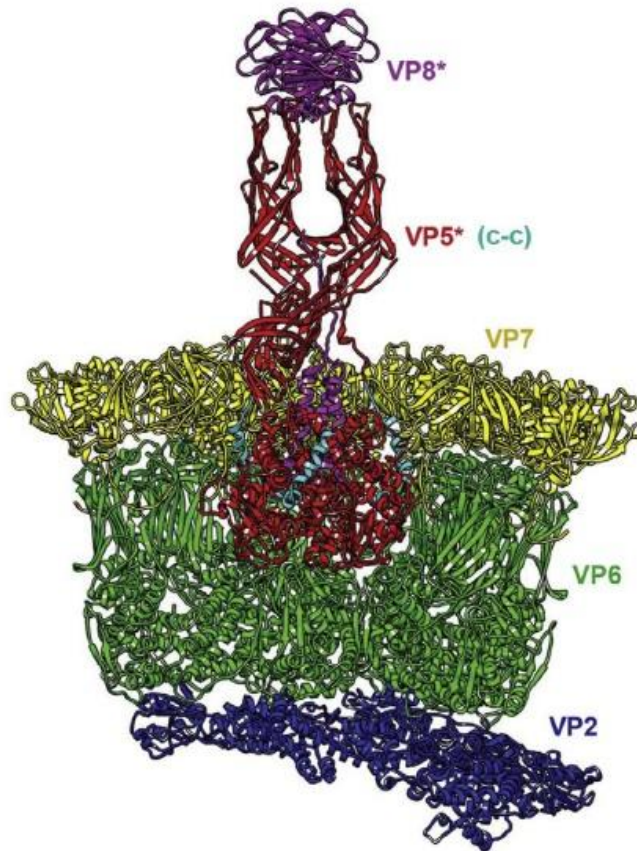


Figura 4. Interacción de las proteínas estructurales de Rotavirus. Vista en corte lateral de las interacciones de VP4 en el TLP. El subdominio VP8* se muestra en morado y VP5* en rojo. El segmento VP5* que formará el doble enrollamiento (c-c) en la conformación post-entrada está en azul (cian). Los dominios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

2.2.4. Genoma

El genoma viral de rotavirus mide aproximadamente 18.500 pb, está constituido por 11 segmentos de RNA de doble cadena (ARNds), que codifican para seis proteínas estructurales y seis no estructurales (Prasad *et al.*, 1996; citado en Bastardo y Maldonado, 2012; Gaunt *et al.*, 2013), (de 667 hasta 3.302 nt). Con la excepción del 11° segmento genómico (que codifica para las proteínas NSP5 y NSP6), todos los demás son monocistrónicos (Estes y Kapikian, 2007; citados en Matthijssens *et al.*, 2009^a; Desselberger, 2014), en la tabla 3 se muestran las asignaciones gen-proteína y proteína-función determinadas a través del análisis de varias cepas RVA.

Tabla 3. 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 ^a	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 ^b	37	Capa externa	780	Homotrímero; glicoproteína; antígeno de neutralización tipo G; dependiente de Ca ²⁺
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; viroporina; receptor intracelular para DLPs; interactúa con viroplasmas y la vía de la autofagia; modula el Ca ²⁺ 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 ^c	12	No estructural	-	Interacción con NSP5, localizada en viroplasma

^a Escindido por tripsina o proteasa celular a VP5* + VP8*.

^b Péptido señal de escisión terminada.

^c Segundo ORF del segmento 11 de RNA.

La hebra positiva de cada segmento del genoma de rotavirus, rico en guanina y uracilo, contiene una secuencia cap m7GpppG(m)GP_y en su extremo 5' terminal, una serie de secuencias conservadas en la región 5' no codificante (GGC), un marco de lectura abierto (ORF) que codifica para la proteína, un codón de terminación y otra serie de secuencias conservadas en la región no codificante 3', que termina siempre en ACC (figura 5). No poseen señal de poliadenilación en el 3' terminal, en su lugar, tienen una secuencia consenso muy corta (GACC3') altamente conservada en los once segmentos del RNA viral. La naturaleza segmentada del genoma de rotavirus constituye la base fundamental para el estudio y caracterización de las propiedades replicativas y antigénicas, así como del mecanismo más común de evolución de estos virus, denominado rearrreglo génico o "shift" (intercambio de genes entre cepas) (Estes y Kapikian, 2007; citados en Vizzi, 2009).

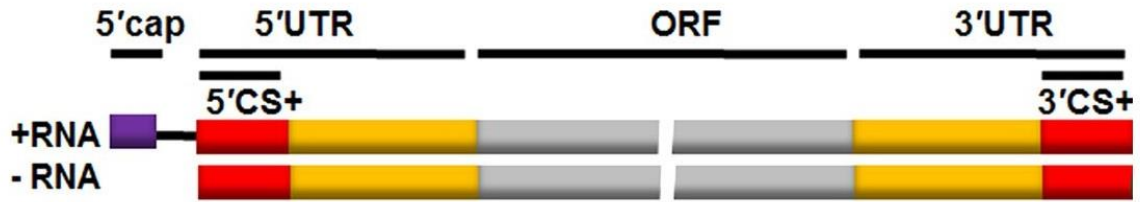


Figura 5. Representación de la estructura común a los once segmentos del genoma de Rotavirus. Cada segmento posee un marco de lectura abierto (ORF) que se muestra en gris, los extremos 5' y 3' regiones no codificantes (UTRs), que se muestran en amarillo, y las secuencias de consenso (CS) altamente conservadas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

Las regiones no codificantes (UTR) de los segmentos de ARN 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).

2.2.5. Ciclo de replicación viral

Los rotavirus tienen un tropismo muy específico, ya que únicamente infectan los enterocitos maduros de las puntas de las vellosidades del intestino delgado (yeyuno e íleon) (Estes y Kapikian, 2007; citados en McDonald y Patton, 2011), sin embargo *in vitro*, estos virus también muestran un tropismo restringido ya que, aunque pueden unirse a la superficie de una gran variedad de líneas celulares, sólo son capaces de infectar eficientemente aquellas derivadas de epitelio renal o intestinal (López *et al.*, 2007).

Este tropismo es debido, al menos en parte, a la interacción del virus con sus receptores celulares; aparentemente, la entrada de estos virus a la célula huésped es un proceso que se lleva a cabo en varios pasos, en el cual están involucrados diferentes dominios de las proteínas de superficie del virus, así como varios receptores celulares (López y Arias, 2004; citados en Rojas *et al.*, 2008).

Estudios sobre la forma de entrada de rotavirus a la célula huésped revelan que se trata de un proceso que incluye múltiples y complejas etapas (figura 6), en las que diferentes proteínas de la superficie del virus interactúan secuencialmente con diferentes moléculas de superficie celular, que actúan como receptores de unión y

de entrada. Dichas moléculas se han asociado con microdominios lipídicos de la membrana celular. El requisito de varias moléculas celulares, que podrían necesitar estar presentes y organizadas de una determinada manera, podría explicar el tropismo celular y tisular de estos virus (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 caveola, 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 y se activa la transcripción que depende de la RNA polimerasa viral (VP1). Los transcritos virales recién sintetizados tienen dos funciones; por una parte funcionan como mRNAs que dirigen la síntesis de las seis proteínas estructurales (VP1-VP4, VP6 y VP7) y las seis proteínas no estructurales (NSP1-NSP6) del virus y por la otra, sirven como templados para la síntesis de la cadena negativa (que es complementaria al RNAm) y da lugar al RNA de doble cadena (dsRNA) que constituye el genoma viral (Estes y Kapikian, 2007; citados en Rojas *et al.*, 2008).

Las proteínas virales recién sintetizadas son reclutadas en viroplasmias (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 MA104, 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).

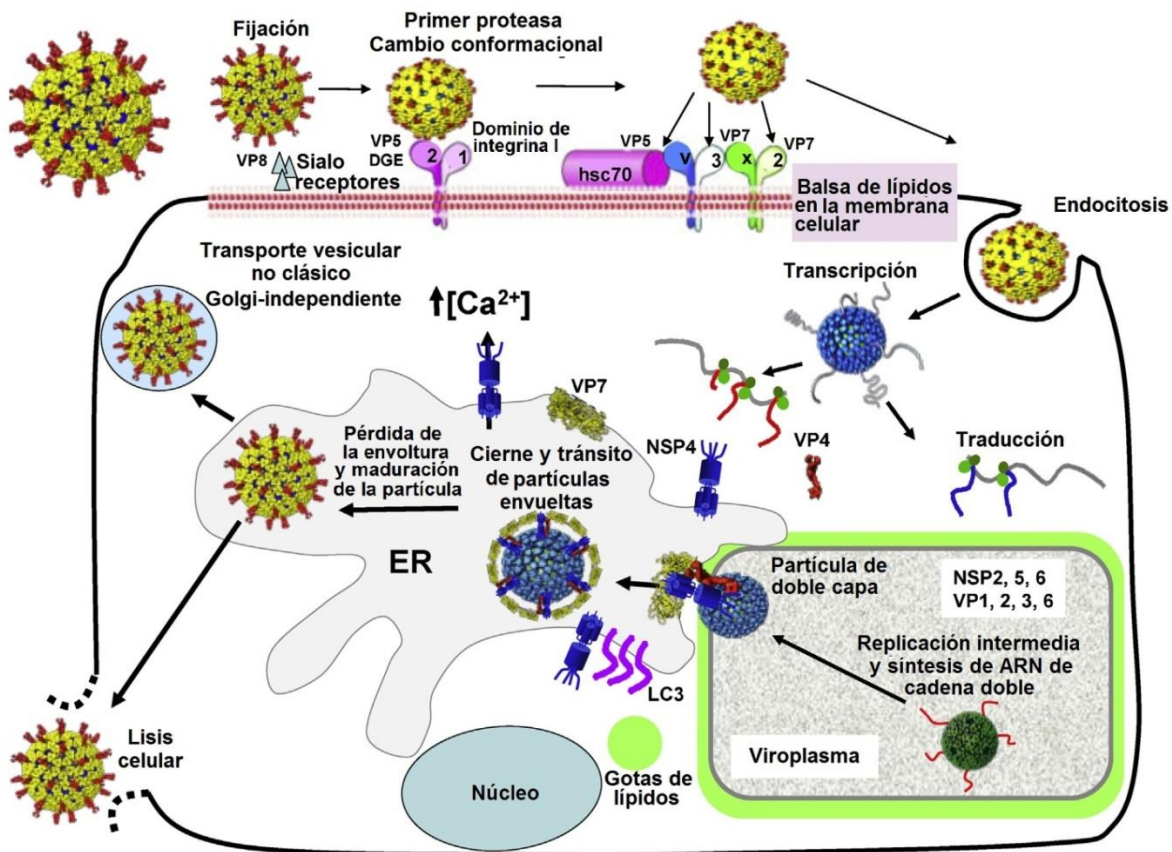


Figura 6. Ciclo de replicación de Rotavirus. Las partículas de triple capa (TLP) de Rotavirus inicialmente se adhieren a receptores con sialo-glicanos (o a grupos de antígenos histo-sangre) en la superficie de la célula huésped, seguido por interacciones con otros receptores celulares, incluyendo integrinas 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 viroplasmatas, 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 cápsida externa VP4 y VP7, convirtiendo

se 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).

2.2.5.1. 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) (Fiore *et al.*, 1991), 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; citado en Díaz-Salinas *et al.*, 2013).

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 $\alpha v\beta 3$ pueden unirse a rotavirus a través de otra proteína externa de VP7 (Coulson *et al.*, 1997; citado en Ruíz *et al.*, 2009).

2.2.5.2. Penetración y descubrimiento

Los rotavirus presentan tropismos específicos hacia células compatibles con la existencia de receptores de superficie que medían 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 inicial de algunas cepas virales de origen animal, denominadas sensibles a neuraminidasa (NS) depende de la presencia de ácido siálico sobre moléculas de la superficie celular. No obstante, esta interacción no es esencial, ya que muchas cepas animales y la mayoría de las humanas parecen interactuar con una molécula de superficie neuraminidasa-resistente (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; citados en Gutiérrez *et al.*, 2010).

Los rotavirus son internalizados 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 Simio [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 dynamin 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 dynamin 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 un virus NS, mediado por un receptor en la célula que contiene ácido siálico, entre el dominio VP8 (aa. 93-208) de la proteína VP4 de rotavirus y el receptor celular, induce cambios conformacionales en VP4 que permiten al virus interactuar con la integrina $\alpha 2\beta 1$ a través de la proteína 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, y la proteína VP7 con las integrinas $\alpha v\beta 3$ y $\alpha x\beta 2$ (López y Arias, 2006), las cuales funcionan como co-receptores y junto con VP6 mediarían la penetración del virus en la célula (Gualtero *et al.*, 2007).

Adicionalmente la participación de glicoproteínas, glicolípidos y colesterol en la infección por rotavirus sugiere que el(los) receptor(es) viral(es) podría(n) formar parte de microdominios glicosfingolipídicos llamados *rafts* o balsas lipídicas (Arias *et al.*, 2001). Éstas servirían como plataforma para facilitar una interacción de las moléculas antes descritas, que funcionarían de receptor celular para la entrada de rotavirus a las células. El requerimiento de diferentes moléculas celulares que deberían estar presentes y organizadas en una manera precisa podría explicar el tropismo celular y tisular de estos virus (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).

2.2.5.3. Síntesis de la cadena positiva (RNAm)

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

2.2.5.4. 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). Dos proteínas (no estructurales) virales codificadas (NSP), 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 éstas 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 viroplasmos 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 actividad 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 ARN 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 viroplasmos, a las cuales se les ha nombrado VLS (estructuras como viroplasma) (Fabbretti *et al.*, 1999; citado en Contin *et al.*, 2010). Esta propiedad depende 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 Ca²⁺ intracelular de los almacenes, actuando como una vioporina (Hyser *et al.*, 2012), lo cual eleva los niveles de Ca²⁺ 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 Ca²⁺, 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 Ca²⁺.

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 viroplasma; sus interacciones parecen ser requeridas para la formación de viroplasma funcionales y la producción de progenie viral infecciosa (Gaunt *et al.*, 2013). La formación de los viroplasma 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 los rotavirus, poco se sabe acerca de sus dinámicas de formación (Carreño-Torres *et al.*, 2010).

2.2.5.5. 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 ssARN) (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).

2.2.5.6. Maduración y liberación de los viriones

Una vez formados los DLP's, éstos salen de los viroplasma 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 ésta 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).

2.2.6. 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 al 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; citado en Díaz *et al.*, 2009).

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 (Na^+ y 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; Ousingawat *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; citado en Ruíz *et al.*, 2009; 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 la 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 éstas 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).

2.2.7. 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 (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 del 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 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 Ca^{2+} y aumenta los secuestrados de 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 Ca^{2+} puede ser responsable de la muerte celular inducida por la infección (Ruíz *et al.*, 2009).

Un aumento constante en la concentración de Ca^{2+} intracelular induce la actividad de proteasas, lipasas, y endonucleasas. La activación de proteasas dependientes de 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 Ca^{2+} , provoca fragmentación del DNA el cual es un evento importante en la apoptosis (Dorado *et al.*, 2003).

La entrada masiva de 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 Ca^{2+} a través de varios canales iónicos creando un círculo vicioso que lleva consecuentemente a la muerte celular (Olanow, 1993).

2.2.8. Determinación del genotipo a partir de VP4 y VP7

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 en base a ellas 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^a; Trojnar *et al.*, 2013; Yeon *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^b).

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^b; 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^a); G3 y G14 con P[12] en equinos (Papp *et al.*, 2013^b); G3 con P[3] y P[9] en perros y gatos (Matthijnssens *et al.*, 2011^b) y en conejos G3 con P[14] y P[22] (tabla 4) (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).

Tabla 4. Genotipos comunes VP7 (G) y VP4 (P) de RVA 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]

2.3. Rotavirus en conejos

RVA 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 orofecal, 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 éste 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, 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: enterotiflitis catarral, hemorrágico o necrótico 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 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 signos entéricos, 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 ELISA, tinción negativa de Microscopía Electrónica (Nsem) y a través de técnicas moleculares como RT-PCR, secuenciación y análisis filogenéticos (Lavazza *et al.*, 2008).

2.3.1. Identificación de Rotavirus en conejos

LRV perteneciente al grupo A, subgrupo I, ha sido aislada en Canadá (LRV) (Petric *et al.*, 1978), Japón (R-2) (Sato *et al.*, 1982), Italia (82/311F) (Castrucci *et al.*, 1985), Estados Unidos (ALA, C-11, BAP-2) (Conner *et al.*, 1988; Ciarlet *et al.*, 1997), Hungría (Banyai *et al.*, 2005), China (N-5) (Guo *et al.*, 2012), y Corea (Yeon *et al.*, 2013), 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.

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 LRV R-2, todas las cepas LRV poseen especificidad de SG I. Todas las cepas LRV analizados hasta la actualidad pertenecen al genogrupo NSP4A (KUN-like) (Ciarlet *et al.*, 2000; Martella *et al.*, 2003).

Hasta hoy en día, únicamente se han analizado dos genomas completos de RVA Lapine: RVA/Rabbit-tc/CHN/N5/1992/G3P[14] y RVA/Rabbit-tc/ITA/30/96/1996/G3P[14] (Guo *et al.*, 2012; Matthijnssens *et al.*, 2006; citados en Ghosh y Kobayashi, 2014).

En un estudio realizado por Nieddu *et al.*, (2000), donde el objetivo fue estimar a través de microscopía electrónica (ME) 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 éste porcentaje, rotavirus fue identificado en el 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 dos o tres 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 complejo – enteritis del conejo de cría intensiva tiene una etiología determinada por muchos factores diferentes, en donde agentes víricos, bacterianos y parasitarios pueden aparecer contemporáneamente 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 del grupo 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 ABIPRISM 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.

Banyai *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 grupo A cepa Lapine con un electroferotipo súper corto, detectado en un brote de enteritis fatal en un criadero comercial de Hungría. Sobre la base de la secuencia y análisis filogenético de las proteínas VP7, VP4 y NSP4, su cepa lapine 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. Llegan a la conclusión de 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 microscopía electrónica de tinción negativa (Nsem), en muestras de conejos que mostraban ya sea una enteropatía o lesiones atribuibles: impactación cecal, dilatación intestinal, enterotiflitis, 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.

3. Planteamiento del problema

Un número limitado de estudios han investigado las características moleculares de las cepas de Rotavirus en conejos, con pocas cepas Lapine aisladas y parcialmente caracterizadas. Dichos estudios demuestran que P [14] y P [22] son los genotipos VP4 más típicos que se encuentran en LRV, así como el genotipo G3 por parte de VP7, además, análisis de las cepas a puesto de manifiesto una homogeneidad antigénica / genética sustancial de LRV.

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 en humanos y en algunos mamíferos, sin embargo su estudio en conejos es escaso.

La secuenciación y análisis filogenético de las cepas de Rotavirus es fundamental para determinar la situación epidemiológica actual del virus, así como para el esclarecimiento de los patrones de la evolución y para analizar detalladamente los eventos de reordenamiento genético que generan la transmisión interespecies del virus.

4. Justificación

Rotavirus es un agente patógeno considerado una de las principales causas de gastroenteritis viral aguda en conejos, puede causar cuadros entéricos principalmente en conejos post-destete y también está implicado en la etiología de brotes de enteritis graves en asociación con bacterias, parásitos y otros virus (Martella *et al.*, 2004; Lavazza *et al.*, 2008).

En nuestro país, el Estado de México es la entidad de mayor producción cunícola, presenta un inventario de 65,000 vientres, y en él se producen aproximadamente 54,600 toneladas de carne de conejo al año, siendo los municipios de mayor producción Amecameca, Jilotepec, Atlacomulco y Texcoco, además de la zona del Valle de Toluca.

Rotavirus ha sido detectado en conejos de la zona sur-oriente del Estado de México a través de RT-PCR (Reynoso, 2014), sin embargo se desconoce tanto la cepa como sus características genotípicas, por tanto se enfatiza la importancia de identificar los genotipos de rotavirus en conejos de dicha zona.

Los estudios sobre la diversidad genética de rotavirus se han basado principalmente en los genes que codifican las proteínas VP6, para la determinación del grupo, VP7 para el genotipo G y VP4 para el genotipo P.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Identificar los genotipos de rotavirus de conejos de la zona sur-oriente del Estado de México.

5.2. Objetivos Específicos

1. Amplificar los genes VP4 y VP7 de rotavirus en conejos de la región sur-oriente del Estado de México por RT-PCR.
2. Realizar la filogenia de los fragmentos amplificados, con los reportados a nivel mundial.

6. Hipótesis

Rotavirus en conejos de la zona sur-oriente del Estado de México pertenece a la cepa Lapine y posee el genotipo G3 P[14].

7. Material y método

7.1. Diseño de estudio

Tipo de investigación

El presente estudio fue observacional, 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

Fue población cunícola de la región sur-oriente del Estado de México, la cual se encuentra conformada por 13 municipios: Valle de Chalco, Chalco, Temamatla, Cocotitlan, Tlalmanalco, Juchitepec, Tenango del Aire, Ayapango, Amecameca, Atlautla, Ozumba, Tepetlixpa y Ecatzingo.

Unidad de análisis

Fueron conejos sin manifestaciones de enfermedad diarreica y conejos con signología entérica de entre 25 a 60 días de edad.

Tipo de muestreo

No probabilístico por conveniencia.

Lugar del estudio

Laboratorio de Biotecnología, Biología Molecular y Genética de la 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.

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.

Periodo

El presente estudio se llevó a cabo en el periodo comprendido entre el mes de Agosto de 2015 al mes de Noviembre de 2016.

Toma de muestra

Una vez seleccionados los conejos, se realizó la toma de muestras para proceder a su análisis a través de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR), para la detección de rotavirus.

Ante mortem

Se colectaron muestras de al menos 1ml de heces líquidas o bien 2g de heces blandas o sólidas y se colocaron en viales Eppendorf[®], los cuales fueron transportados en refrigeración al laboratorio, donde se mantuvieron en congelación a -75°C, hasta su posterior análisis.

Post mortem

En animales muertos dentro de un periodo no mayor a dos horas o bien animales con cuadro clínico entérico sacrificados de forma humanitaria (Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995, Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres) (Anexo 1), se les realizó necropsia utilizando instrumental y guantes estériles para cada caso.

Se tomaron muestras de heces y muestras de porciones de intestino delgado, mismas que fueron colectadas y conservadas de la forma anteriormente descrita.

Procesamiento de la muestra

Se estandarizaron las condiciones de la técnica de RT-PCR para la amplificación de los genes VP4 y VP7 de rotavirus.

Se emplearon los primers reportados por Gentsch *et al.*, (1992), para la amplificación de un fragmento de 876 pares de bases (pb) que codifica para la proteína VP4.

El gen VP7 se amplificó en su totalidad (1062 pb), se utilizaron los primers reportados por Gouvea *et al.*, (1990).

Para la extracción del RNA viral se utilizó el GeneJET Viral DNA and RNA Purification kit (Thermo Scientific™), de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Anexo 2).

Una vez obtenido el RNA viral, se realizó una RT-PCR de un solo paso, empleando el kit comercial SuperScript® III One Step RT-PCR with Platinum® Taq (Invitrogen™).

Los productos de PCR fueron colocados en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio y se llevó a cabo el proceso de electroforesis, con un tiempo de 30 minutos a 100 Volts. Los productos amplificados fueron visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta.

Se llevó a cabo el proceso de clonación empleando el kit comercial pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega™).

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 se compararon en una alineación múltiple de secuencias incluyendo las reportadas a nivel mundial para la realización del análisis molecular y filogenético utilizando el software MEGA 6 (PSU, EE.UU.) (Tamura *et al.*, 2013). Como

herramienta complementaria para la asignación de genotipos, se utilizó el programa de genotipado automático RotaC 2.0 para rotavirus grupo A disponible en <http://rotac.regatools.be/> (Maes *et al.*, 2009). Para visualizar las relaciones filogenéticas entre las secuencias, se construyó una parsimonia estadística de Network 4.5.1.6.

8. Resultados

Se muestrearon los 13 municipios que conforman la zona sur-oriente del Estado de México, visitando de 2 a 3 granjas de producción cunícola por municipio (figuras 7 y 8). Se colectaron y procesaron un total de 127 muestras (tabla 5), de las cuales se detectó rotavirus en 5 de ellas.

Tabla 5. Relación de las muestras colectadas para la detección de rotavirus.

Estado	Número de muestras	Identificación de RV
Conejos con signología entérica y/o diarrea	42	5
Conejos sin manifestación de diarrea	85	0
Total	127	5



Fig. 7a



Fig. 7b

Figura 7a y 7b: Producciones cunícolas muestreadas.



Fig. 8a



Fig. 8b

Figura 8a y 8b: Conejos muestreados.

8.1. Gen que codifica la proteína VP7, genotipo G

Se amplificó el gen VP7 en su totalidad (1062pb) (figura 9), a partir de muestras de heces provenientes de conejos con signología entérica.

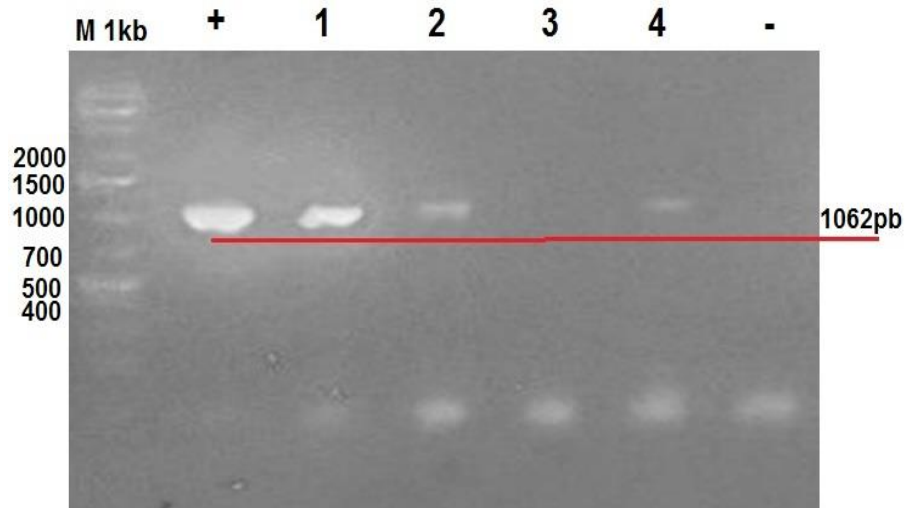


Figura 9. Gel de agarosa 2%, amplificación de fragmentos de 1062pb de VP7 de RV. Poso 1: marcador de peso molecular 1 Kb; poso 2: control positivo (vacuna); posos 3 - 6: muestras de conejos; poso 7: control negativo.

Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados, posteriormente se realizó una comparación de porcentajes de identidad en GenBank (figura 10).

Figura 11. Árbol filogenético de secuencias de aminoácidos de VP7, donde se muestran las asociaciones de diversos hospederos de RV y su origen geográfico. RV-MEX-VP7 reportado en este estudio.

Para VP4 se llevó a cabo el proceso de clonación; se realizó la purificación, ligación, transformación y plaqueado (figura 14) de las bacterias con DNA recombinante.



Figura 14. Caja con medio LB sólido con ampicilina, X-gal e IPTG's, donde se llevó a cabo el crecimiento de bacterias con vector pGEM clonado, se observan colonias con inserto (blancas) y colonias sin inserto (azules).

Se seleccionaron algunas colonias con inserto y se probaron mediante PCR (figura 15) para verificar que contuvieran el fragmento clonado.

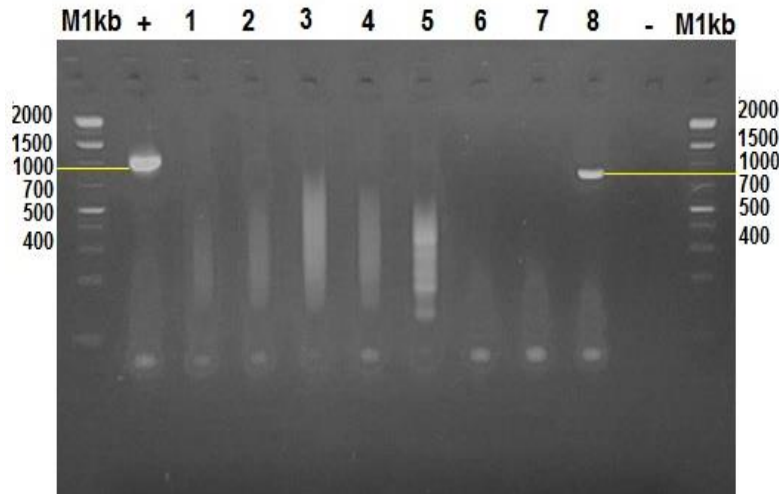


Figura 15. Gel de agarosa 2% donde se muestra la amplificación de un fragmento de 876pb de VP4 de RV, a partir de PCR de colonias con inserto.

Se llevó a cabo la purificación y secuenciación de los productos de PCR, posteriormente se realizó una comparación de porcentajes de identidad en GenBank, donde se obtuvo como resultado que las secuencias obtenidas en este estudio poseen identidades del 93 al 97% con rotavirus genotipo P[8] aislados a partir de humanos.

Se realizó un alineamiento múltiple de secuencias y construcción de un árbol filogenético en MEGA 6 (figura 16), donde se incluyeron las secuencias reportadas en GenBank con mayores porcentajes de identidad con la secuencia obtenida en este estudio, así como todas las secuencias reportadas de VP4 de RV aislados a partir de conejos y secuencias de distintos genotipos P.

8.2. Productos

Parte de los resultados obtenidos en este estudio se tomaron para la realización de un artículo el cual se encuentra en proceso de traducción. Posteriormente será enviado a la revista Virus Research, Revista Internacional de Virología Molecular y Celular, la cual se encuentra en el índice de Journal Citation Reports (JCR), con un factor de impacto de 2.5.

9. Discusión general

Las enfermedades entéricas tienen un papel importante en la producción cunícola, ya que pueden generar graves pérdidas económicas debido a la mortalidad, depresión del crecimiento y disminución del índice de conversión alimenticia. El síndrome entérico es una de las enfermedades más importantes en los conejos, especialmente por su relación al impacto productivo y económico. Entre los diferentes patógenos que se pueden encontrar en los conejos con cuadros entéricos, los virus parecen tener un papel importante, pero no definitivo (Lavazza y Capucci, 2008). Rotavirus sólo fue detectado en 5 de las 42 muestras provenientes de conejos con signología entérica, lo cual representa el 11.90% de identificación, esto sugiere que el papel de rotavirus en conejos con cuadros entéricos no es determinante. Los hallazgos aquí presentados refuerzan la hipótesis de que la enteritis infecciosa en conejos es de origen multifactorial, con diferentes agentes patógenos que actúan sinérgicamente para inducir gastroenteritis, tal y como indican Bányai *et al.*, (2005), Lavazza *et al.*, (2008), Licois, (2004) y Nieddu *et al.*, (2000).

Rotavirus en conejos pertenece a la cepa Lapine, grupo A, subgrupo I, y ha sido aislada en Canadá, Japón, Italia, Estados Unidos, Hungría, China y Corea. La gran mayoría han sido caracterizadas dentro del genotipo G3 de VP7, y P[14], P[22] de VP4. Los primeros resultados respecto al genotipado de VP7, mostraron que la secuencia obtenida pertenecía al genotipo G4 al poseer una identidad del 98% con un genotipo G4 de VP7 de RVH (Laird *et al.*, 2003), sin embargo tanto la construcción de distintos árboles filogenéticos (figuras 11 y 12), como la herramienta de genotipado RotaC 2.0, demostraron que la secuencia obtenida se asocia únicamente con genotipos G3, haciendo definitiva la caracterización genotípica de la secuencia obtenida en este estudio. Estos resultados sugieren que la secuencia de RV reportada por Laird *et al.*, (2003) podría estar erróneamente caracterizada como G4.

10. Conclusiones generales

Se identificó el genotipo de rotavirus G3 P[8] en conejos de la zona sur-oriental del Estado de México.

Debido a que dichos genotipos han sido reportados en distintos hospederos, se sugiere que los presentes hallazgos son resultado de eventos de reordenamiento genético.

Se considera la posibilidad de que LRV no sea endémica en granjas de producción cunícola en la zona sur-oriental del Estado de México.

Este es el primer reporte de la identificación de genotipos de rotavirus en conejos en México.

Este es el primer reporte donde se identifica del genotipo G3 P[8] de rotavirus en conejos en todo el mundo.

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.
- 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., 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.

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.

Bugaric, 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.

Carter, G., Wise, D., Flores, E. 2005. In: *A Concise Review of Veterinary Virology*. International Veterinary Information Service, Ithaca NY.

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.

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.

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 Ca²⁺ 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.

Dimmock, N., Easton, A., Leppard, K. 2007. Introduction to Modern Virology. Sixth edition. Blackwell Publishing. Department of Biological Sciences University of Warwick Coventry. ISBN 1-4051-3645-6.

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.

DRAE (Diccionario de la lengua española). 2014. 23ª edición. <http://dle.rae.es/?id=buVODur> Consultado el 17 de Diciembre de 2016.

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, P.M.; Griffin, D.E.; Lamb, R.A.; Martin, M.A.; Roizman, B.; Straus, S.E., 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.
- Fiore, L., Greenberg, H., Mackow, E. 1991. The VP8 of VP4 is the rhesus rotavirus hemagglutinin. *Virology*. Vol. 181. No. 2. Pp. 553–563.
- 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.
- 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.

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). 2015. Virus Taxonomy. EC 45. <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2015> Consultado el 17 de Diciembre de 2016.

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.
- King, A., Adams, M., Carstens, E., Lefkowitz, E. 2012. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*.
- 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.
- Laird A., Ibarra, V., Ruiz-Palacios, G., Guerrero, M., Glass, R., Gentsch, J. 2003. Unexpected detection of animal VP7 genes among common rotavirus strains isolated from children in Mexico. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 41. Pp. 4400-4403.
- 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.
- Lavazza, A., Capucci, L. 2008. Viral infection of rabbits. 9th World Rabbit Congress. 2008, June. Verona, Italy. *Pathology and Hygiene*. Pp. 879- 883.
- 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, 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.
- Licois, D. 2004. Domestic rabbit enteropathies. In: Proc. 8th World Rabbit Congress. September, 2004. Puebla, Mexico. Pp. 385-403.
- 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.
- López, T., Silva-Ayala, D., López, S., Arias, C. 2011. Replication of the Rotavirus Genome Requires an Active Ubiquitin-Proteasome System. *Virology Journal*. Vol. 85. No. 22. Pp. 11964–11971.
- Lorrot, M., Vasseur, M., 2007. How do the rotavirus NSP4 and bacterial enterotoxins lead differently to diarrhea? *Virology Journal*. Vol. 4. No. 31.
- 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.

Mahy, B., Meulen, V., Hodder, A. 2007. *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. 10th Edition. Vol. 1 Virology.

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^b. Rotavirus disease and vaccination: impact on genotype diversity. *Future Microbiology*. Vol. 4. No. 10. Pp. 1303 - 1316.

Matthijnsens, J., Ciarlet, M., Heiman, E., Arijs, I., Delbeke, T., McDonald, S., Palombo, E., Iturriza-Gomara, M., Maes, P., Patton, J., Rahman, M., Van Ranst, M. 2008. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin

between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1- like and bovine rotavirus strains. *Journal of Virology*. Vol. 82. No. 7. Pp. 3204 - 3219.

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^a. 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. 2009^a. 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^b. 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^a. 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.

Matthijssens, J., Van Ranst, M. 2012^b. 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., 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.

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.

Novoa, R., Calderita, G., Arranz, R., Fontana, J., Granzow, H., Risco, C. 2005. Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis. *Biologie cellulaire*. Vol. 97. No. 2. Pp. 147-142.

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⁺ 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^a. 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^b. Global distribution of group A rotavirus strains in horses: a systematic review. *Vaccine*. Vol. 31. Pp. 5627-5633.

Parashar, U., Breese, J., Glass, R. 2003^a. The global burden of diarrhoeal disease in children. *Bulletin of the World Health Organization*. Vol. 81. No. 4. P. 236.

Parashar, U., Hummelman, G., Bresee, S., Miller, M., Glass, R. 2003^b. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 9. No. 5. Pp. 565 – 572.

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.

Paul, D., Bartenschlager, R. 2013. Architecture and biogenesis of plus-strand RNA virus replication factories. *World journal of virology*. Vol. 2. No. 2. Pp. 32-48.

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). 2016. Virus Classification. <http://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagenomics/virus-classification> Consultado el 17 de Diciembre de 2016.

Reynoso, E. 2014. Identificación molecular de Rotavirus en conejos de la zona Sur Oriente del Estado de México. Tesis de Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma del Estado de México, Centro Universitario UAEM Amecameca.

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 Ca²⁺ 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. 2012. 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.

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. D., Thouless, M. E., DiGiacomo, R. F. 1986. Rotavirus-associated diarrhoea in a commercial rabbitry. *Laboratory Animal Science*. Vol. 36. No. 2. Pp.149-152.

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.

Silvestri, L., Taraporewala, Z., Patton, J, 2004. Rotavirus replication: plus-sense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasm. *Journal of Virology*. Vol. 78. No. 14. Pp. 7763–7774.

Smith, A., Helenius, A. 2004. How Viruses Enter Animal Cells. *Science*. Vol. 304. No. 5668. Pp. 237-242.

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.

SOPT (Sistema de Observación y Prospectiva Tecnológica). 2010. Detección e identificación de agentes de guerra biológica. Estado del arte y tendencia futura. Ministerio de defensa.

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.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., Kumar, S. 2013. MEGA 6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. Vol. 30. Pp. 2725–2729.

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.

Tate, J., Burton, A., Boschi-Pinto, C., Steele, A., Duque, J., Parashar, U; WHO-coordinated Global Rotavirus Surveillance Network. 2012. 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*. Vol.12. Pp. 136-141.

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.

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.

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.

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.

Yeon, Kim., Eun, Lee., Jae, Oem., Seong, Kim., Kyoung, Lee., Myoung, Lee., Se, Park. 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.

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.

12. Anexos

12.1 Anexo 1. Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995, Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres (fragmento referente a conejos)

07-16-96 NORMA Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995, Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres.

5.6. Conejos.

- a) Insensibilización.- Se deberá realizar por desnucamiento como se indica en el "APENDICE G" (NORMATIVO).
- b) Sacrificio humanitario.- Desangrado por corte de yugular dentro de los 30 segundos después de la insensibilización.



12.2. Anexo 2. Instrucciones de uso del GeneJET Viral DNA and RNA Purification kit. Thermo Scientific™

- 1.- Colocar 50 μ l de líquido preparador de columnas en el centro de la columna.
- 2.- En un tubo eppendorf estéril, colocar 100 μ l de muestra, 200 μ l de solución de lisis, 50 μ l de proteinasa K y 5 μ l de carrier.
- 3.- Incubar 30 minutos a 56 °C (colocar eluyente en Thermo Shaker).
- 4.- Agregar al tubo 300 μ l de etanol (100%).
- 5.-Colocar en vortex 10 segundos.
- 6.- Incubar 3 minutos a temperatura ambiente.
- 7.- Centrifugar 10 segundos a -4°C a 13500rpm.
- 8.- Transferir sobrenadante a la columna.
- 9.- Centrifugar 1 minuto a -4°C a 13500rpm.
- 10.- Cambiar columna a un tubo nuevo.
- 11.- Agregar 700 μ l de solución de lavado 1.
- 12.- Centrifugar 1 minuto a -4°C a 13500rpm.
- 13.- Cambiar columna a un tubo nuevo.
- 14.- Agregar 500 μ l de solución de lavado 2.
- 15.- Centrifugar 1 minuto a -4°C a 13500rpm.
- 16.- Cambiar columna a un tubo nuevo.
- 17.- Agregar 500 μ l de solución de lavado 2.
- 18.- Centrifugar 1 minuto a -4°C a 13500rpm.
- 19.- Cambiar columna a un tubo nuevo.

- 20.- Centrifugar (solo) 3 minutos a -4°C a 13500rpm.
- 21.- Cambiar columna a tubo eppendorf nuevo estéril.
- 22.- Colocar $30\mu\text{l}$ de eluyente en el centro de la columna.
- 23.- Incubar por 2 minutos a temperatura ambiente.
- 24.- Centrifugar 1 minuto a -4°C a 13500rpm (realizar doble elución).