



UNIVERSIDAD  
DE LA REPUBLICA  
URUGUAY

Universidad de la República,  
Facultad de Ciencias



Facultad de Ciencias  
UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA

# **Estudio epidemiológico de la proteína VP7 de Rotavirus Humano circulantes en Uruguay.**

Tesina de grado  
Licenciatura en Bioquímica

Álvaro Alberti

**Tutor:** Dra. Mabel Berois  
**Co-tutor:** Dr. Juan Arbiza

Montevideo 2008

# Índice

<b>Resumen.....</b>	<b>4</b>
<b>1. Introducción</b>	
1.1 La enfermedad.....	5
1.2 Clasificación de los Rotavirus.....	8
1.3 Estructura del Virus.....	10
1.4 La proteína VP7.....	14
1.5 Epidemiología molecular.....	15
1.6 Vacunas contra Rotavirus.....	16
<b>2. Objetivos</b>	
2.1 Generales.....	18
2.2 Específicos.....	18
<b>3. Materiales y Métodos</b>	
3.1 Muestras.....	19
3.2 Extracción del ARN viral.....	19
3.3 Electroforesis en agarosa 1%.....	19
3.4 Genotipificación del gen de VP7 (G-tipo).....	20
3.5 Amplificación del gen de VP7.....	21
3.6 Detección de los productos de genotipificación y amplificación de VP7.....	22
3.7 Purificación y secuenciado.....	22
3.8 Análisis de las secuencias.....	22
<b>4. Resultados</b>	
4.1 Extracción del ARN viral y screening.....	23
4.2 Genotipificación (G- tipo).....	24

4.3 Amplificación del gen de VP7.....	25
4.4 Análisis filogenético de las G9.....	26
4.5 Análisis de secuencias codificantes G9.....	27
4.6 Análisis filogenético de las G2.....	30
4.7 Análisis de secuencias codificantes G2.....	31
<b>5. Discusión.....</b>	<b>33</b>
<b>6. Bibliografía.....</b>	<b>37</b>
<b>7. Abreviaturas.....</b>	<b>41</b>
<b>8. Agradecimientos.....</b>	<b>42</b>

## Resumen

La diarrea neonatal es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en niños menores de 5 años a nivel mundial. Dentro de los posibles agentes causales de esta enfermedad los Rotavirus (RV) son la segunda más importante y la primera de origen viral. El material genético de RV esta compuesto de 11 segmentos de ARN doble hebra, los cuales codifican para 12 proteínas, seis no estructurales y seis estructurales. Dos proteínas VP4 y VP7 recubren la superficie externa del virus y son los principales blancos a la hora de la generación de la respuesta inmune adaptativa por parte del huésped. La variabilidad genética de estas proteínas como mecanismo de evasión de dicha respuesta inmune ha determinado que a la fecha se conozcan mas de 20 genotipos distintos de VP7 (G-tipos) y mas de 14 variables de VP4 (P-tipos) en humanos. La mayor parte de los estudios epidemiológicos de RV se han centrado en la genotipificación de estas dos proteínas principalmente de VP7 con el fin de evaluar los G-tipos y P-tipos predominantes y su posible evolución en el tiempo. A nivel mundial en humanos los genotipos predominantes son G1, G2, G3 y G4 asociados principalmente a los P-tipos, P[8] y P[4] sin embargo en estos últimos años G9 ha adquirido relevada trascendencia en dicho contexto. En el presente se aplicaron dos metodologías distintas ampliamente utilizadas en análisis epidemiológicos de RV para evaluar G-tipos circulantes en el período 2006-2007. Una de éstas metodogías se basa en una Semi-nested PCR, método descrito por Gouvea et al 1990 [20] y la segunda consta de la amplificación y análisis de la secuencia del gen de VP7 o parte del mismo. Se procesaron 23 muestras positivas de RV provenientes del Hospital CASMU de Montevideo y se constataron los genotipos G2(30%) y G9(70%) sin detectar otros genotipos mas comunes como G1, G3 y G4 y se destaca la detección por primera vez en nuestro país de G9 además de ser la mas prevalente en este estudio. En cuanto las metodologías aplicadas, se obtuvieron resultados contradictorios en la aplicación del método descrito por Gouvea et al mientras que gracias a la amplificación y secuenciado del gen se pudieron confirmar los G-tipos de cada una de ellas y posteriormente llevar a cabo análisis filogenéticos y evaluar las sustituciones aminoacídicas de posible relevancia epidemiológica.

# 1. Introducción

## 1.1 La Enfermedad

La diarrea aguda es una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad infantil a nivel mundial. Actualmente se estima que es responsable del 12% de las muertes de menores de 5 años y por tanto es la segunda causa más importante de mortalidad en todo el mundo, teniendo principal incidencia en países subdesarrollados o en desarrollo. Según esto la cantidad de casos fatales en todo el mundo alcanzaría la cifra de 2 millones por año [OPS].

Los agentes etiológicos que pueden causar esta enfermedad son variados e incluyen bacterias, virus, parásitos y productos alimenticios; y la pronta determinación del causante en cada caso es de vital importancia para determinar el procedimiento a seguir. De este modo se evitan los tratamientos con costosos antibióticos en caso de ser innecesario, por ejemplo cuando el agente causante es de origen viral.

Los Rotavirus son una de las principales causas de enfermedades diarreicas en niños y animales jóvenes de todo el mundo y la principal causa de origen viral. Según los datos disponibles en la Región de las Américas, Rotavirus causa aproximadamente 75.000 hospitalizaciones y cerca de 15.000 muertes anuales [37]. A nivel global recientemente se ha recalculado la mortalidad considerando el aumento en la proporción de diarreas severas causadas por Rotavirus obteniéndose un estimado de 611.000 (rango 454.000-705.000) muertes asociadas a este agente (Fig. 1). El mismo estudio encontró



Figura 1. Enfermedad por Rotavirus: situación global (Adaptado de Parashar, 2006, [37])

que el 39% de las hospitalizaciones por diarrea en niños menores de 5 años son causadas por Rotavirus con muy ligeras diferencias entre países de distinto nivel de desarrollo. Se puede afirmar que un 95% de los niños son infectados por este agente al llegar a los 5 años de edad [37].

Rotavirus infecta de igual manera a niños provenientes de países desarrollados como en vías de desarrollo, sin embargo es en éstos últimos en los cuales se registran mayores índices de mortalidad asociado a un mal tratamiento a tiempo de la enfermedad o falta de cobertura médica de la población[25].(Fig. 2)

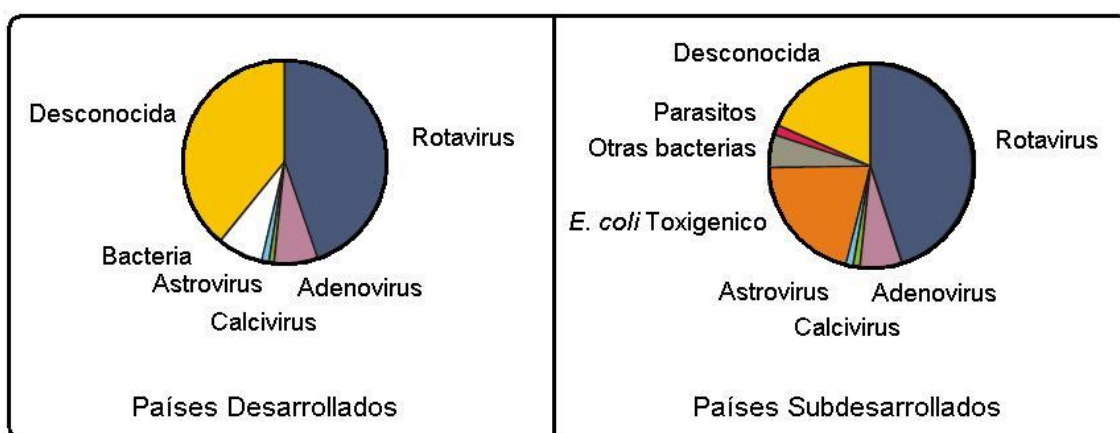


Figura 2. Estimación del rol de distintos agentes etiológicos causantes de diarrea aguda en niños en países desarrollados y subdesarrollados (Adaptado de Kapikian, 1993, [25])

Rotavirus fue reportado por primera vez en 1973, mediante el análisis por microscopía electrónica de biopsias duodenales provenientes de niños entre 6 y 9 meses de edad con diarrea aguda [8]. Inicialmente fue denominado de diferentes formas por distintos investigadores para luego llegar al nombre de “rotavirus” haciendo alusión a la semejanza con una rueda (del latín, *rota*) cuando era visto al microscopio electrónico. (Fig. 3)

La infección de RV se produce en individuos jóvenes principalmente y se encuentra asociada a diarreas acuosas no enterolíticas. El cuadro clínico causado por Rotavirus se caracteriza por fiebre y vómitos seguidos por deshidratación severa que puede durar de 8 a 14 días post-infección, pudiendo ocasionar la muerte [2, 46].

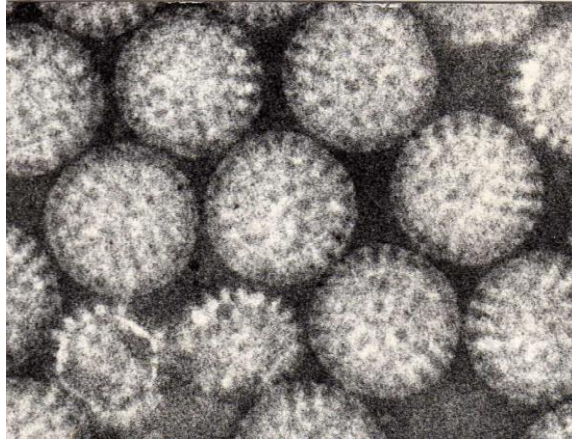


Figura 3. Partículas de Rotavirus Humano vistas al microscopio electrónico. Poseen un diámetro aproximado de 100µm. (Cedido por J. Cohen)

Los viriones infectan selectivamente los enterocitos maduros de la porción apical de las microvellosidades intestinales sin afectar las células de la cripta. Las células huésped son invadidas por el virus que se replica rápidamente y provoca la lisis celular y la atrofia de la microvellosidad. (Fig. 4) A medida que progresa la infección, las células infectadas son reemplazadas por células cuboidales inmaduras y secretorias de la cripta, incapaces de cumplir con las funciones normales de digestión y absorción, por lo que disminuye el transporte de glucosa asociado al sodio, se registran niveles anormalmente bajos de maltasa, sacarasa y lactasa, los que vuelven a la normalidad luego de 4 a 8 semanas post-infección.

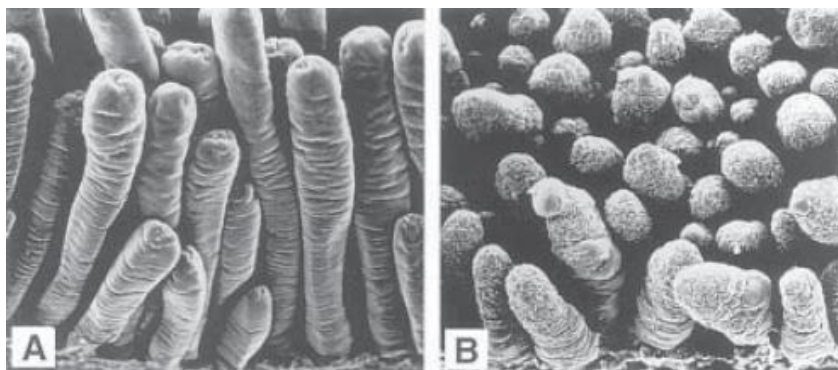


Figura 4. Zona apical de las microvellosidades intestinales de terneros gnotobioticos. (A) Animal control sin infección; (B) Animal infectado experimentalmente con Rotavirus. (Adaptado de Greenberg, Clark y Offit, 1994)

Esta serie de hechos provocan la pérdida de electrolitos y fluidos, que ocasionalmente llevan a la deshidratación severa y muerte [31].

Los viriones se excretan en grandes cantidades durante los episodios diarreicos (más de  $10^{10}$  partículas virales por gramo de materia fecal) por lo que se pueden detectar fácilmente por inmunoensayos o electroforesis del genoma viral, directamente de la materia fecal [8, 25, 29].

Los episodios por Rotavirus ocurren principalmente en los meses más fríos y menos húmedos del año en los países de clima templado sin embargo la estacionalidad es menos marcada en países con clima tropical [9, 10, 25].

## 1.2 Clasificación de los Rotavirus

Los Rotavirus (RV) están clasificados como un género dentro de la familia *Reoviridae*, la cual contiene además de este otros ocho géneros [17]. Los Rotavirus se caracterizan por poseer una triple cápside viral sin envuelta lipídica y su genoma está compuesto por 11 segmentos de ARN doble hebra cada uno de los cuales codifica para una proteína a excepción del segmento 11 que posee dos marcos de lectura abiertos. El genoma viral entonces contiene información para la expresión de 12 proteínas, seis estructurales (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7) y seis no estructurales (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 Y NSP6) [17].

De acuerdo a la reactividad específica de VP6 los Rotavirus se clasifican en 7 grupos distintos (A, B, C, D, E, F, G) siendo A el grupo más común en humanos dentro del cual a su vez se distinguen los subgrupos I, II, I + II y no-I no-II, de acuerdo a la reactividad de VP6 contra dos anticuerpos monoclonales.

Debido a la importancia inmunogénica de las proteínas de la cápside externa VP4 y VP7, los RV de grupo A se clasifican mediante un sistema binario de acuerdo a la variabilidad genética y antigénica de ambas proteínas.

Las variantes de VP7 se denominan G-tipos (glicoproteína) de las cuales al menos 15 han sido descritas, y las de VP4, P-tipos (proteasa sensible) de las cuales 14 se conocen al menos a la fecha.



Por tanto la clasificación completa de una variante de RV, tanto en animales como en humanos, incluye determinar grupo, subgrupo, G-tipo y P-tipo del mismo [17, 24].

El tamaño total del genoma de Rotavirus grupo A es de aproximadamente 18,5 kpb, distribuido en sus 11 segmentos genómicos, siendo el mayor de 3302 pb (segmento 1) y el menor de 667 pb (segmento 11).

Cada uno de los segmentos se encuentra diferenciado en tres regiones, la región no traducible (UTR) 5', la región no traducible 3' y el marco de lectura abierto (ORF) [40, 41].

Cuando son analizados por electroforesis en poliacrilamida (PAGE) en el cual estos 11 segmentos se separan por longitud, los mismos exhiben un patrón de corrida o electroferotipo particular determinado por cuatro grupos o clusters lo que permite la rápida identificación de los mismos (Fig. 5)

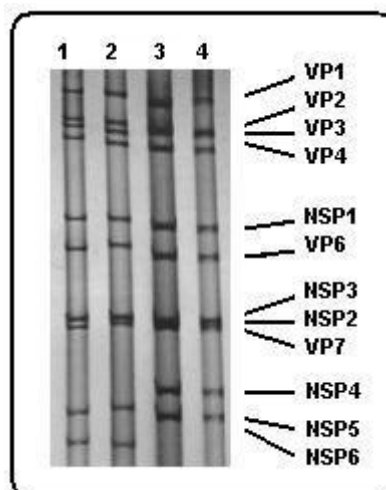


Figura 5. Patrones electroforéticos largos (1 y 2) y cortos (3 y 4) de Rotavirus grupo A detectados en heces de adultos. Electroforesis en poliacrilamida (PAGE) 7.5%, teñido con nitrato de plata. (Adaptado de Estes 2007 [17])

El primer cluster esta formado por los segmentos 1 al 4, luego vienen dos segmentos de longitud media (5 y 6), un grupo de tres segmentos (7, 8 y 9) y por ultimo los dos segmentos más cortos (10 y 11).

Dentro de este patrón se pueden observar cepas en las cuales los últimos dos segmentos (10 y 11) migran menos que el resto y se clasifican en electroferotipos cortos diferenciándolos de los largos. Inicialmente se observó que los electroferotipos cortos se correlacionaban con el subtipo I; mientras que

los electroferotipos largos con el subgrupo II. Sin embargo debido a la cantidad de excepciones a la regla que han surgido en numerosos estudios, el posible vínculo entre estas características no está del todo claro [32, 35].

Cuando un perfil de electroforesis no está representado por el típico (4-2-3-2), se puede estar tratando de un grupo no A o de un virus que ha sufrido rearrreglos entre sus propios segmentos génicos. Las cepas del grupo B generalmente muestran un patrón (4-2-2-3), las del subgrupo C un patrón (4-3-2-2) y virus que poseen rearrreglos en sus genomas han sido más frecuentemente aislados de pacientes inmunodeficientes, niños con infecciones crónicas o animales [7, 35, 43].

El análisis de las cepas de Rotavirus por PAGE ha sido una técnica muy utilizada por la rapidez y sencillez con la que permite detectar este virus y por ello es una herramienta que al día de hoy se continúa utilizando en estudios de monitoreo.

### **1.3 Estructura del virus.**

Los Rotavirus son virus sin envoltura lipídica y están formados por tres cápsidas concéntricas de unos 75nm de diámetro. La capa más interna o core del virión está constituida por un arreglo de la proteína VP2, la capa intermedia por la VP6 y la más externa por la VP7. De esta última se extienden 60 espículas (VP4) que se ubican rodeando los vértices de la estructura icosaédrica. (Fig. 6)

Las proteínas estructurales VP1, VP2 y VP3 forman el core del virus y las tres poseen afinidad por el ARN si bien solamente VP1 muestra reconocimiento secuencia-específico de dicho ARN. Numerosos estudios muestran que VP1 es la ARN polimerasa del virus y por tanto tiene un rol preponderante en la transcripción como en la replicación [13, 14]. Todas las secuencias de VP1 estudiadas contienen los cuatro motivos conservados en las ARN polimerasas ARN-dependientes [14, 36] sin embargo estudios de reconstrucción han revelado que VP1 requiere de VP2 para llevar a cabo dicha actividad replicasa [41].

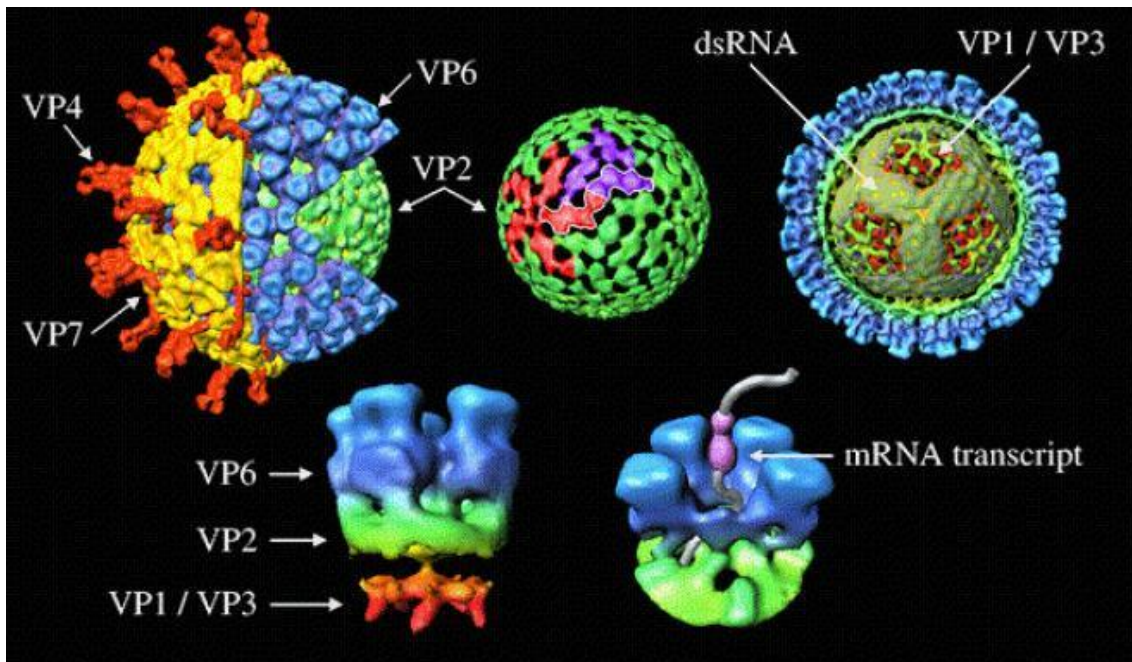


Figura 6. Imagen de la organización proteica de las partículas de Rotavirus obtenidas por criomicroscopía electrónica. En el centro se muestra la organización de VP1, VP2 y VP3 en el core del virión y luego su asociación con VP6 (azul) para formar la doble capa proteica (DLP). En la superficie externa VP7 (amarillo) y VP4 en espículas (rojo) completan la triple capa proteica (TLP). (Adaptado de Lawton, Estes y Prasad, 1997[28])

VP2 interactúa con el ARN doble hebra de manera inespecífica [26] y se cree que es este hecho el que la hace indispensable en el momento de la replicación [41]. Además se sabe que de todas las proteínas estructurales, VP2 es la única que tiene la capacidad de auto ensamblarse en su forma icosaédrica nativa, cuando es expresada en células de insecto [27], lo que sugiere que VP2 jugaría un rol importante en el ensamblaje del virión interactuando con el resto de las proteínas estructurales.

La tercer proteína del core VP3, posee actividad metiltransferasa y al mismo tiempo es una guaniltransferasa [30]. La misma une nucleótidos GTP e incorpora los CAPs a los extremos 5' del ARNm viral, el cual está desprovisto de cola poliA en su extremo 3'.

Durante la infección las proteínas virales se asocian en una región del citoplasma denominada viroplasma. A excepción de las dos glicoproteínas de superficie VP4 y VP7 ubicadas en el RE junto con NSP4, y de NSP1 y NSP3

(citoplasmáticas), el resto de las proteínas se agrupan en los viroplasmatas [17, 25].

NSP1 es una proteína poco conservada, la menos conservada de todas las proteínas virales (inclusive menos que VP4 y VP7) que se asocia con el citoesqueleto celular y con el extremo 5' del ARN viral. Se postula que formaría un complejo NSP1-ARNviral-NSP3 que facilitaría la llegada del material genético a los viroplasmatas, lugar donde a partir de ellos se llevaría a cabo la síntesis de ARN doble hebra que va a formar parte de las partículas virales nacientes [41].

Por su parte NSP3 es otra proteína que se ubica en el citoplasma y a la cual se le atribuyen varias funciones. Además de facilitar la función conjunta con NSP1 recién mencionada, NSP3 tiene la capacidad de interactuar con eIF4GI que es un factor de iniciación de la traducción eucarionte y también con una proteína que se une a las regiones poli-A del extremo 3' de los mensajeros celulares (PABP, poli-A binding protein). Se ha postulado que mediante esta interacción NSP3 puede desplazar la unión simultánea de la PABP con el factor eIF4GI *in vivo*, lo que favorecería la síntesis de proteínas virales e interferiría con la traducción de los ARNm celulares [42].

NSP2 es una proteína oligomérica con actividad NTPasa que se une preferentemente al ARN simple hebra e interacciona a su vez con otra proteína no estructural del virus como es NSP5. Se sabe que NSP5 es una fosfoproteína que se auto-ensambla en dímeros y posee actividad kinasa y junto con NSP5 y NSP6 forman la estructura básica de un viroplasma. Se cree que la expresión de NSP2 y NSP5 es suficiente para la formación al menos de los viroplasmatas [18, 39]. Por tanto, si bien el mecanismo por el cual estas proteínas interactúan entre ellas y con el ARN no se conoce del todo bien, se cree que cumplen un rol fundamental en el reclutamiento de los ARN doble hebra y de otras proteínas desde sus sitios de síntesis, la encapsidación del ARN y la traslocación de las partículas virales nacientes desde los viroplasmatas al ER.

La proteína NSP4 reside en el RE, posee un dominio transmembrana mediante el cual se mantiene unida a dicho organelo y un dominio carboxiterminal

orientado hacia el citoplasma a través del cual NSP4 interactúa con VP6 y media la transición de las partículas de doble capa desde los viroplasmatas al RE [4]. Por otra parte se sabe que NSP4 actúa como enterotoxina viral uniéndose a un receptor de membrana celular y aumentando así los niveles intracelulares de calcio, lo que genera la liberación de cloro y concomitante disminución de la absorción de sodio y agua [5].

NSP4 es una enterotoxina multifuncional ya que además del mecanismo de inducción de diarrea por liberación de cloro se le atribuyen otras actividades que se cree convergen en el mismo evento. Se ha visto que NSP4 tiene la capacidad de bloquear transportadores de membrana de la familia de los SGLT-1 los cuales son responsables del co-transporte de sodio y glucosa al interior de los enterocitos, evento que contribuye a la pérdida de agua como consecuencia de un aumento en la presión osmótica en el lumen del intestino [5].

El mecanismo de inducción de diarrea por la enterotoxina es el utilizado para explicar la acción patológica de la infección por Rotavirus cuando no hay daños histopatológicos observables.

La cápside interna esta constituida por unidades trimericas de la proteína VP6, una proteína altamente estable e inmunogénica que constituye alrededor del 50% de la masa total del virión [17]. La misma cumple un rol fundamental en la estabilidad estructural dada su capacidad de interactuar tanto con las proteínas de la cápside externa como con las del core. La estructura cristalográfica de VP6 permitió determinar que hay una importante interacción de la misma con VP2, VP7 y VP4 y que las secuencias aminoacídicas de dichas zonas son las más conservadas [34].

En la superficie de los RV la cápside externa esta formada por la glicoproteína VP7 y alrededor de 60 espículas constituidas por dímeros de la proteína VP4. La proteína VP4 constituye un 1.5% de la masa del virión, presenta actividad de hemaglutinina, porta epítopes neutralizantes específicos y participa activamente en la adsorción y penetración del virus a la célula [17, 34, 39]. Durante la infección esta proteína es clivada por enzimas proteolíticas

presentes en el tracto gastrointestinal (pancreatina y tripsina) de modo que se generan dos peptidos estructurales VP5\* y VP8\* los cuales se sabe que aumentan la infectividad viral facilitando el proceso de ingreso al huésped. Anticuerpos contra VP4 o VP8\*, neutralizan el virus *in vitro* e inducen inmunidad protectora en ratones, cerdos y bovinos [16].

#### 1. 4 La proteína VP7

VP7 es la segunda proteína más abundante del virión, posee un peso molecular de aproximadamente 38 KDa y representa el 30% de la masa del mismo. Recubre la superficie externa del virus junto con VP4 y esta codificada por el noveno segmento de ARN. VP7 es un proteína glicosidada únicamente por residuos de manosa [3, 17] y mientras es glicosidada es insertada en la membrana del RE donde aguarda su interacción junto con VP4 con las recién formadas DLPs para formar las TLPs [17].

Numerosos estudios genéticos y de especificidad antigénica llevados a cabo con cepas reordenantes indicaron que la mayor proporción de anticuerpos en sueros hiperinmunes eran dirigidos hacia esta proteína [17].

De acuerdo a la reactividad de VP7 en estudios serológicos se han podido constatar a la fecha al menos 15 variantes o serotipos de esta proteína. En estudios posteriores se ha podido verificar que para la misma existe una correlación entre serotipo y genotipo, lo cual no esta tan claro para VP4 [44].

El análisis de las secuencias de VP7 sobre los distintos serotipos reveló un alto grado de conservación en donde se evidencian nueve regiones variables: VR1-VR9 (aa 9-20, 25-32, 37-53, 65-76, **87-100**, 119-132, **141-150**, **208-224**, **235-242**) particularmente los sitios subrayados se encuentran relacionados con los principales sitios antigénicos de la proteína denominados A, B, C y F respectivamente<sub>(Fig. 7)</sub> [17]. La respuesta inmune, principalmente de anticuerpos neutralizantes, generada en la infección primaria es dirigida principalmente en forma homotípica hacia la proteína VP7 convirtiéndose en heterotípica luego de una reinfección con un mismo o diferente genotipo y la misma se asocia con protección para el huésped [19].

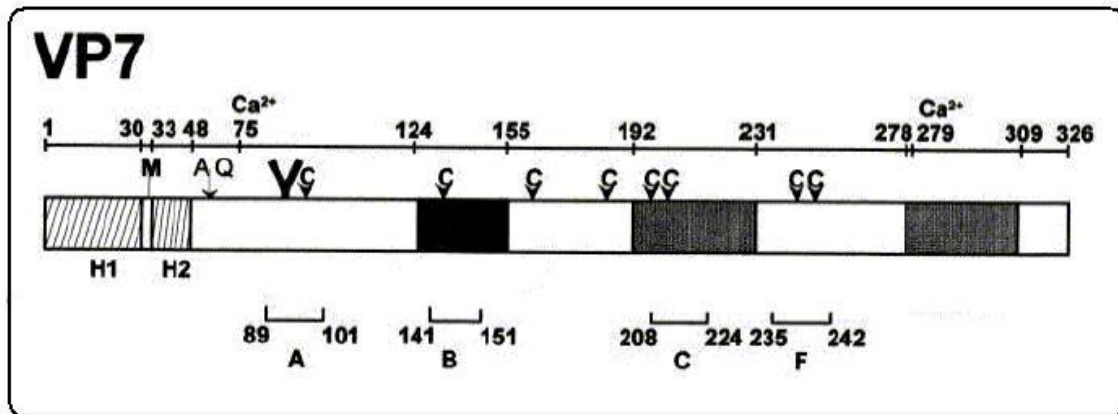


Figura 7. Esquema de propiedades estructurales y antigénicas de la VP7. Los dominios hidrofóbicos H1 y H2, las cisteínas conservadas (C), señal de corte de proteasas (↓), sitios de unión a calcio, segundo marco de lectura abierto (M), sitios de glicosilación (Y), y regiones de los epítopes neutralizantes A, B, C, F. (Extraído de Estes 2007, [17])

### 1.5 Epidemiología molecular

Debido a la importancia inmunogénica y al alto grado de diversidad tanto de VP7 como de VP4 gran parte de los estudios se han focalizado en la epidemiología molecular de estas dos proteínas, mas aún cuando el avance en técnicas y metodologías de biología molecular han facilitado enormemente el estudio de las mismas y permiten hoy caracterizar las cepas circulantes mediante análisis de secuenciado de los genes relevantes. Gracias a que VP7 y VP4 son codificadas por distintos segmentos de RNA (RNA 9 y RNA 4 respectivamente), varias combinaciones de G y P-tipos pueden ser observadas en vivo con la distinción de que existen combinaciones entre ambas que se observan en mayor porcentaje en cada especie huésped. A la fecha 15 G-genotipos han sido formalmente demostrados de los cuales 11 fueron detectados en humanos al menos en una ocasión (G1-G6, G8-G12) asociados principalmente a los P- tipos P[8] y P[4] [44] En la revisión global más reciente de estudios de tipificación, Santos y Hoshino describen la distribución temporal y geográfica de los tipos P y G revisando estudios de 52 países en cinco continentes con muestras colectadas entre 1973 y 2003. Las combinaciones de los tipos G1, G2, G3 y G4 con los tipos P[8] y P[4], previamente individualizados como los tipos humanos más comunes, representaron más del 88% de las cepas en todo el mundo [44] (Fig. 8).

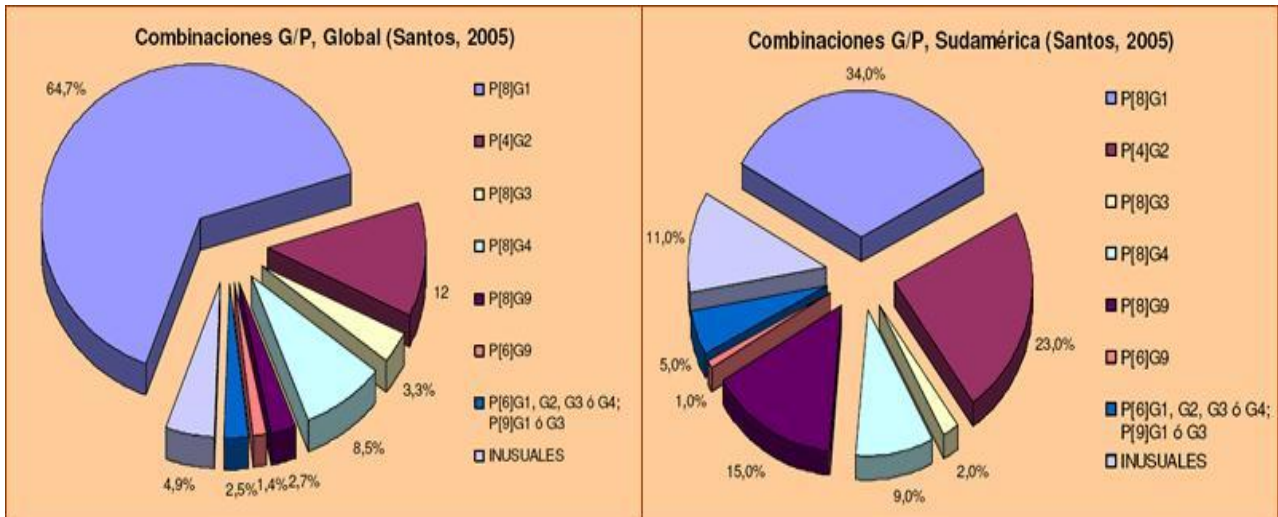


Figura 8. Distribución porcentual de las combinaciones G/P observadas en cepas de Rotavirus Humano, entre 1973 y 2003 en los 5 continentes y en Sudamérica. (Santos et al, 2005, [44])

En Sudamérica la situación refleja predominancias similares a las que se ven a nivel global, sin embargo en los últimos años se observaron genotipos poco comunes como G5 el cual llegó a tener gran importancia epidemiológica en Río de Janeiro, Brasil y luego llegó a 0% de incidencia en el año 1997 [45]. Por su parte en Argentina G9 llegó a ser el genotipo predominante (aproximadamente 50%) en los años 2005, 2006 [12] además de la aparición este último año de G12 el cual fue reportado por primera vez en humanos en este país [11]. En tanto en Paraguay recientemente se publicó que el 36,2% de los casos de Rotavirus estudiados pertenecen a G9 [38]. En nuestro país particularmente existe un antecedente en epidemiología de Rotavirus en cepas aisladas en el período 1996-1999 el cual constató la presencia G1 (64,7%), G2 (29,4%) y G4 (5,9%) y en el que no se observaron G-tipos poco comunes como G9 o G5 los cuales ya se encontraban circulando en la región para ese período de tiempo [6].

## 1.6 Vacunas contra Rotavirus

Los países subdesarrollados son los más asociados a mortalidad en casos de infecciones por Rotavirus y es por tanto, donde más se necesita del desarrollo de una vacuna que cubra con alta efectividad la diversidad de cepas circulantes. Para ello es de suma importancia mantener una relevancia



epidemiológica actualizada de los G y P genotipos que circulan en cada región, porque como ya se menciono las proteínas VP4 y principalmente VP7 son los blancos hacia los cuales se dirigen los anticuerpos neutralizantes en el momento de la generación de la respuesta inmune por parte del huésped [17].

Diversas metodologías se han utilizado para la producción de vacunas contra este virus, las primeras estrategias utilizadas eran cepas no-humanas atenuadas (P[1]G6) y (P[5]G6), con resultados controversiales en cuanto a su efectividad principalmente en Latinoamérica. Luego aparece una vacuna pentavalente (Rotashield) de origen humano-mono Rhesus que cubre los G y P-tipos G1, G2, G3 y G4 y P[8] y que en el año 1999 es retirada del mercado por asociación a intususcepción en niños vacunados en Estados Unidos. Actualmente se cuenta con dos vacunas disponibles contra Rotavirus; la primera (Rotarix RIX4414) lanzada en el año 2004 por GSK Biologicals, consta de una cepa Humana atenuada (G1P1A[8]) y ha mostrado altos niveles de protección (87%) en Brasil, Venezuela y México entre otros países donde la misma fue probada, sin vincularse a casos de intususcepción.

La segunda vacuna lanzada en el 2006 por Merck Reserch Co. (Rotateq) es una vacuna heptavalente que contiene G1, G2, G3, G4, G6, P[6] y P[8] que ha sido probada en numerosos estudios y ha arrojado datos que reflejan alto grado de protección principalmente contra la diarrea aguda (98%), sin ser relacionado a intususcepción [15].

Si bien ambas vacunas que actualmente se encuentran en el mercado han mostrado ser efectivas contra cepas pertenecientes a otros G-tipos (G5 y G9) el crecimiento que ha manifestado principalmente G9 en la región de Latinoamérica y la aparición por primera vez de G12 en Argentina exige, en cierto modo, a tenerlas en cuenta en vacunas que en este momento se encuentran en procesos de desarrollo y a continuar la vigilancia epidemiológica de cepas de Rotavirus circulantes en la región.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Generales**

Por lo anterior expuesto, el objetivo general que se plantea en el presente es el de optimizar una metodología de estudio fiable y rápida para la detección y clasificación de la proteína VP7 de Rotavirus humano, dada la importancia inmunogénica y epidemiológica que la misma posee y posteriormente abordar un análisis de las cepas circulantes en nuestro país en el período 2006 – 2007.

### **2.2 Específicos**

Para ello los objetivos específicos son:

- Realizar la extracción y detección de Rotavirus de 23 muestras aisladas en el país en el período 2006-2007.
- Genotipificar la proteína VP7 por el método descrito por Gouvea et al, 1990 [20].
- Amplificar una sección de la proteína VP7 y compararlo con secuencias de referencia para deducir a que G-tipo corresponden.
- Comparar ambos métodos desde el punto de vista de los resultados obtenidos y la simplicidad de las técnicas utilizadas.
- Alinear las secuencias nucleotídicas y realizar su análisis filogenético.
- Deducir la secuencia proteica de cada una de ellas y analizar las sustituciones aminoacídicas que puedan tener mas relevancia epidemiológica comparándolas entre sí y con secuencias de referencia.

### **3. Materiales y Métodos**

#### **3.1 Muestras**

Las muestras de heces fueron recolectadas en el Hospital Británico de Montevideo, Uruguay; provenientes de pacientes que ingresaron a dicha clínica por tratamiento de diarrea. Para el presente estudio, 23 fueron las muestras de heces con las que se contó, todas provenientes de un brote de esta enfermedad en el período 2006-2007, de las cuales 18 pudieron ser detectadas como positivas para Rotavirus por electroforesis en geles de Agarosa 1% (ver sección 3.3).

#### **3.2 Extracción del ARN viral**

La extracción del ARN se realizó con TRIzol<sup>®</sup> siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente; se toman 0.2gr de muestra fecal y se resuspenden en 1ml de buffer fosfato salino (PBS, pH 7,4). De la misma se toman 200 $\mu$ L y se le agregan 500 $\mu$ L de TRIzol<sup>®</sup> (una breve homogenización), mas 0.1mL de cloroformo. Luego de centrifugar se descarta la fase fenólica y se recupera solamente la fase acuosa (superior) la cual contiene el ARN viral, se precipita el mismo mediante el agregado de alcohol isopropilico (0.25mL). Para obtener el pellet, se centrifuga por 10 minutos y se desecha la fase acuosa, luego de un lavado con etanol, el ARN se resuspende por ultimo en 25 $\mu$ L de agua estéril a 56 °C.

#### **3.3 Electroforesis en agarosa 1%**

Las muestras positivas pueden ser fácilmente detectadas mediante la visualización del patrón de bandas característico de Rotavirus en geles de agarosa (ver sección 1.2). Con este fin, se prepararon geles de agarosa 1% y se sembraron 8-10 $\mu$ L de cada muestra, utilizando el buffer de corrida TBE 1X

y el agente intercalante Bromuro de Etidio para visualizar los segmentos de ARN.

### 3.4 Genotipificación del gen de VP7 (G-tipo) por Multiplex seminested PCR.

A partir del ARN doble hebra se realizó en primera instancia una RT-PCR OneStep utilizando la enzima Superscript II (Invitrogen Inc) y la polimerasa Taq Pol (Invitrogen Inc.) junto con su respectivo Buffer Tris-HCL (20mM, pH 8.4), KCL (50mM) y MgCl<sub>2</sub> (1.5mM), según lo indica el fabricante. Se alcanzó un volumen final de 50μL, agregando la mix de dNTPs (0.2mM), los primers Beg y End (0.2μM), DTT (50mM), Dimetilsulfóxido (DMSO) 7%, agua y 1μL de cada extracción de ARN. El ciclado se llevó a cabo en Termociclador (Thermo) del siguiente modo: RT; (42°C) por 50min, desactivación (94°C) 3min; PCR; 30 ciclos de: desnaturalización (94°C) 1 minuto, hibridación (42 °C) 1 minuto y polimerización (72°C) 2 minutos. Por ultimo 72 °C por 10 minutos.

A partir del amplicón de la proteína VP7 generado (1062pb) se realizo una Multiplex-PCR con un pool de primers internos para detectar los genotipos G1, G2, G3, G4, G5 y G9 con el primer consenso 9Con1(+). (Tabla 1 y Fig. 9)

Para ello se utilizó la enzima Taq Pol (Invitrogen Inc.), junto con: MgCl<sub>2</sub> (1.5mM), Buffer Tris-HCL (20mM, pH 8.4), KCL (50mM), dNTPs (0.2mM) y el pool de 7 primers (0.2μM) cada uno y se llevó a un volumen final de 50μL.

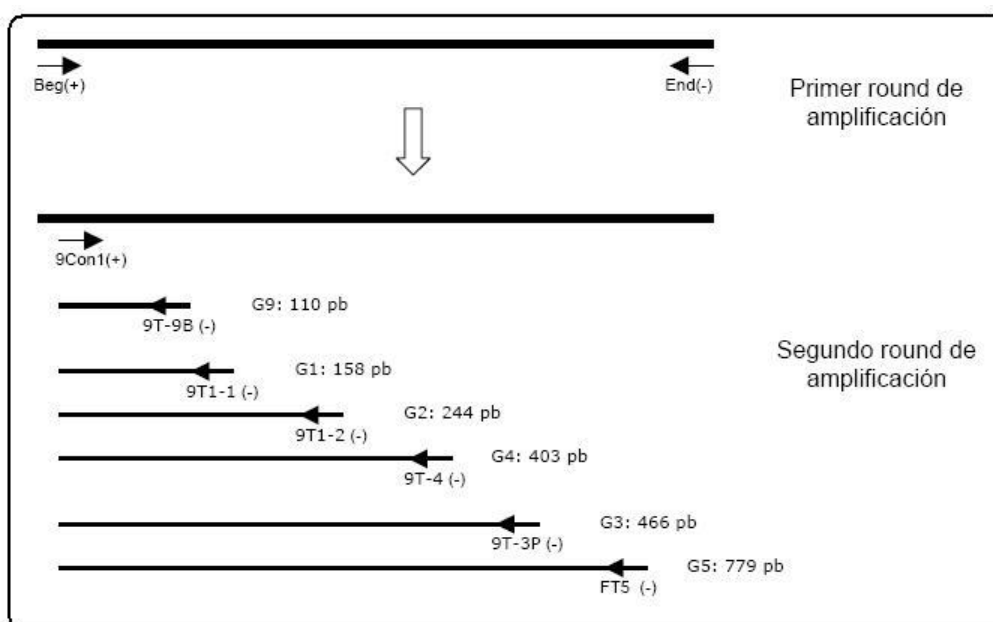


Figura 9. Esquema utilizado en la Genotipificación del gen de VP7 (G-tipos). (Adaptado de Gouvea, 1990 [20])

Nombre y polaridad	Secuencia	Posición nucleotídica
Beg (+)	5´ GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG 3´	1 al 28
End (-)	5´GGTCACATCATACAATTCTAATCTAAG 3´	1036 al 1062
9Con1 (+)	5´TAGCTCCTTTTAAATGTATGG 3´	37 al 56
G1(-)	5´TCTTGTCAAAGCAAATAATG 3´	176 al 195
G2(-)	5´GTTAGAAATGATTCTCCACT 3´	262 al 281
G3(-)	5´GTCCAGTTGCAGTGTTAGC 3´	484 al 503
G4(-)	5´GGGTCGATGGAAAATTCT 3´	423 al 440
G5(-)	5´CATGTA CTGTTGTTAGCTC 3´	760 al 779
G9(-)	5´TATAAAGTCCATTGCAC 3´	131 al 147

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la G- tipificación [Adaptado de Gouvea 1990]

### 3.5 Amplificación del gen de VP7

El ARN junto con los primers Beg y End (1µM), es desnaturalizado a 99 °C durante 10 minutos en un volumen de 10µL. A continuación los mismos se dejan en hielo otros 10 minutos, luego se adicionan una mezcla conteniendo los 4 dNTPs (0.5mM) y la retrotranscriptasa Superscript II (Invitrogen Inc.) junto con su Buffer Tris-HCL (50mM, pH 8.3); KCL (75mM); MgCl<sub>2</sub> (3mM) y el DTT (100mM) tal cual lo indica el fabricante. Llevado a un volumen final de 20µL la retrotranscripción se lleva a cabo en termociclador (Thermo) por 60 minutos a 42°C, con ulterior desactivación enzimática por 15 minutos a 70°C.

Posteriormente la PCR se prepara a partir de 5 µL de producto de RT, los primers Beg y End (0.20µM), los 4 dNTPs (0.20mM) y la polimerasa Taq Pol (Invitrogen Inc.) junto con su respectivo Buffer Tris-HCL (20mM, pH 8.4), KCL (50mM) y MgCl<sub>2</sub> (2µM), según lo indica el fabricante. Luego de llevar a 50 µL de volumen final el ciclado se realizo de la siguiente forma, 40 ciclos de: desnaturalización (94°C) 45 segundos, hibridación (50°C) 45 segundos y polimerización (72°C) 1 minuto. Por ultimo se desactiva la enzima a 72 °C por 10 minutos.

### **3.6 Detección de los productos de genotipificación y amplificación de VP7**

La detección de los productos de PCR tanto de la genotipificación como de la amplificación del gen de VP7 se realizó mediante geles de agarosa 1,5% y 1% respectivamente. En ambos casos el volumen de siembra fue 8µL, se corrieron en buffer de corrida TBE 1X y se visualizaron las bandas con Bromuro de Etidio.

### **3.7 Purificación y secuenciado**

Los amplicones de VP7 fueron purificados y secuenciados mediante el servicio de secuenciado automático de MacroGen Inc.

### **3.8 Análisis de las secuencias**

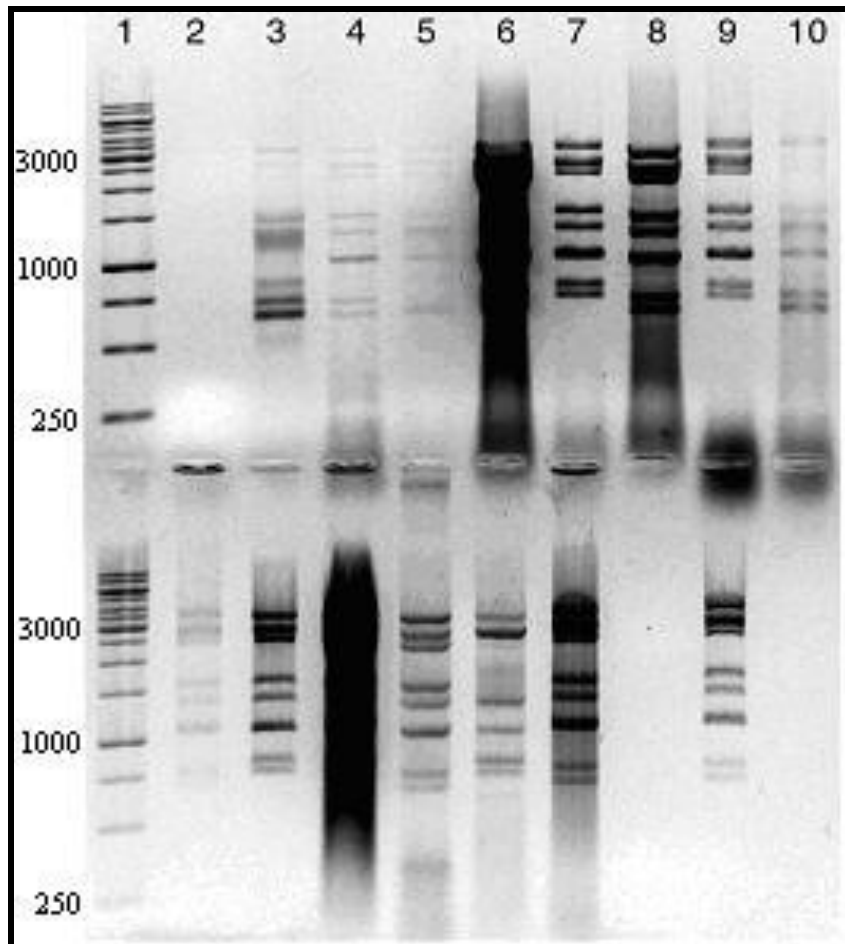
El alineamiento de las secuencias se realizó mediante el software ClustalX en el programa BioEdit ver. 7.0. y los árboles filogenéticos mediante MEGA.

Todas las secuencias del presente se tradujeron a su correspondiente secuencia aminoacídica en el software en línea [www.expasy.com/translate](http://www.expasy.com/translate).

## 4. Resultados

### 4.1 Extracción del ARN viral y screening

Para llevar a cabo el estudio epidemiológico de VP7 de Rotavirus se partió de 23 muestras de heces provenientes de niños ingresados en el Hospital Británico de Montevideo con síntomas de diarrea, en el período de tiempo 2006–2007. El total de las muestras habían sido diagnosticadas como positivas para Rotavirus en el laboratorio de dicha institución sin embargo de éstas, 20 (74%) pudieron ser confirmadas como positivas por medio de extracción con Trizol® y sembrado en agarosa 1%. (Fig. 10)

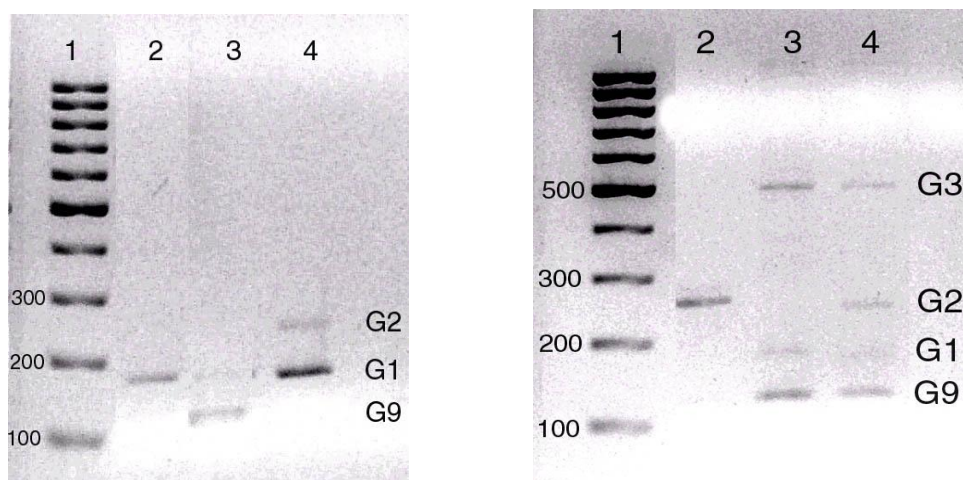


**Figura 10.** Perfiles de Rotavirus en agarosa 1%. Los clusters característicos de este virus permiten la detección mediante este método. Se visualizan electroferotipos cortos (arriba carriles 7 y 9, abajo carriles 3, 6 y 9) y largos presentes en el resto de las muestras. En el carril 1 tanto arriba como abajo se sembró el marcador de peso molecular, a la izquierda del mismo se indican algunos tamaños de bandas en pares de base.

A las 20 muestras positivas confirmadas por agarosa se las nombró URU0602, 0603, 0604, 0605, 0607, 0609, 0610, 0611, 0612, 0613, 0614, 0615, 0616, 0617, 0618, 6019, 0620, 0621, 0622, 0701 y a partir de estas es que se continúa el estudio.

#### 4.2 Genotipificación (G- tipo)

Para la genotipificación del gen de VP7 se utilizó una Multiplex seminested PCR, método descrito por Gouvea et al [20] del cual se comentan los detalles en la sección 3.4. A partir de las 20 muestras positivas, 11 pudieron ser genotipificadas (55%) por este método con resultados contradictorios en algunas muestras y no tanto así en otras. Tal es el caso de las muestras 0613, 0615, 0620 y 0621, algunas de ellas parecían poseer múltiples G-tipos mientras que otras mostraban distintos G-tipos cuando se intentaba confirmar el resultado aún manteniendo todos los parámetros intactos. (Fig. 11)



**Figura 11.** Geles de agarosa 1% con los resultados de la genotipificación. Muestras 0613, 0620, 0621 correspondientes a los carriles 2 al 4 respectivamente en ambos geles. **Izquierda.** Primer experimento **Derecha.** Experimento de confirmación. En ambos casos se sembró en el carril 1 un marcador de peso molecular (100pb) y las bandas se visualizaron con Bromuro de Etidio.

La muestra 0613 aparece como G1 en el primer experimento y como G2 en la confirmación (carril 2). La muestra 0620 aparece como G9 en el primer experimento y como G9/G1/G3 en la confirmación (carril 3) y por su parte en la muestra 0621 se observan los G-tipos G1/G2 en el primer experimento y



G2/G3/G9 en el segundo (carril 4). El resto de los resultados obtenidos por este método se resumen en la tabla 2.

### 4.3 Amplificación del gen de VP7

A partir de las 20 muestras positivas se realizó una RT-PCR con los primers Beg y End (ver sección 3.5) y se lograron amplificar y secuenciar 17 (85%) segmentos parciales de VP7, con una longitud de 855pb (un 80% de la secuencia completa) los cuales abarcan los principales sitios antigénicos de la proteína. Luego de secuenciadas las mismas fueron comparadas con secuencias de G-tipos conocidos en GeneBank y se pudo constatar la aparición de G9 en 12 de ellas (70%) y de G2 en las 5 restantes (30%) sin registrarse otros genotipos mas comunes en humanos como lo son G1, G3 y G4. (Ver tabla 2)

Muestra	Electroferotipo	Resultado de la genotipificación del gen de VP7 (G-tipo)		Amplificación del gen de VP7
		Resultado	Confirmación	G- tipo
Uru0602	Largo	-	-	G9
Uru0603	Largo	G9	G9	G9
Uru0604	Largo	G9	G9	G9
Uru0605	Largo	G9	G9	G9
Uru0607	Largo	-	-	G9
Uru0609	Largo	G9	G9	G9
Uru0610	Largo	-	-	-
Uru0611	Largo	-	-	-
Uru0612	Largo	-	G9	G9
Uru0613	<b>Corto</b>	G1	G2	G2
Uru0614	Largo	-	-	-
Uru0615	<b>Corto</b>	G1/G2	G1/G2	G2
Uru0616	Largo	-	-	G9
Uru0617	Largo	-	-	G9
Uru0618	<b>Corto</b>	G2	G2	G2
Uru0619	Largo	-	-	G9
Uru0620	Largo	G9	G9/G1/G3	G9
Uru0621	<b>Corto</b>	G1/G2	G2/G9/G3	G2
Uru0622	Largo	G9	-	G9
Uru0701	<b>Corto</b>	-	-	G2

**Tabla 2.** Resultados de la Genotipificación (izq) y de los G-tipos obtenidos por comparación de los amplicones de VP7 con secuencias del GeneBank.

La amplificación de parte del gen de VP7 nos permitió recuperar datos de los G-tipos de 6 muestras que no habíamos podido recabar por genotipificación (muestras 0602, 0607, 0616, 0617, 0619 y 0701) además de aclararnos el panorama en lo que respecta a aquellas muestras conflictivas antes mencionadas.

#### **4.4 Análisis filogenético de las G9**

El análisis filogenético de las G9 junto con otras cepas de referencia agrupa las secuencias aisladas en este trabajo en dos clusters, uno de ellos particularmente el formado por las secuencias Uru0603 y Uru0604 se encuentra íntimamente relacionado con otras cepas G9 aisladas en la región en un período de tiempo similar (Fig. 12). Estas dos muestras presentan alto grado de similaridad con secuencias de Argentina y Paraguay, particularmente Uru0603 es idéntica a nivel nucleotídico a una cepa aislada en Argentina en el 2004 (DQ885358) en el fragmento estudiado.

El resto de las secuencias forman otro cluster bien diferenciado del resto con un alto grado de homología entre ellas (menos de 1% divergencia) apoyado por un valor estadístico de 92% en 500 réplicas de Bootstrap. Las mismas no parecen relacionarse con cepas de la región, sin embargo son mas similares a otras aisladas en el continente Europeo y Asiático, presentando niveles de homología entre ( $99.5 \pm 0.2\%$ )

Según la bibliografía consultada, al momento se han descrito 6 sublinajes de VP7 genotipo G9 dada la diversidad dentro del mismo, de las cuales se han incluido un representante de cada uno (a excepción del IV) en el presente análisis. Mediante esto se pudo constatar que las secuencias del presente trabajo todas pertenecen al sublinaje III al igual que el resto de las cepas que circulan en la región.

Con el fin de corroborar los clusters observados, se llevaron a cabo análisis filogenéticos con un mayor número de secuencias parciales de G9, pero con una longitud menor, principalmente aisladas en Argentina y Brasil (análisis no mostrado) y los mismos reflejan lo que se observa en la figura 12 sin modificaciones apreciables, confirmando la relación existente entre estas secuencias.

#### 4.5 Análisis de secuencias codificantes G9.

Las secuencias de VP7 del genotipo G9 obtenidas de 789 nucleótidos abarcan un tramo importante de la misma desde el aminoácido 45 al 308 el cual incluye 6 de las 8 regiones hipervariables de la proteína. El estudio de éstas representa fielmente lo que se ve en la filogenia construida. Un alto grado de homología entre 10 de las 12 cepas con menos de 1% de divergencia. Mientras tanto Uru0603 y Uru0604 que aparecen como bastante distintas al resto, son altamente similares a nivel aminoacídico entre sí (menos de 1% divergencia) compartiendo varias de las modificaciones que las diferencian del resto. Si comparamos ambas cepas con el resto, una Ser sustituye una Pro en la posición 46 y un Asp en lugar de un Asn en la posición 100, sustitución ésta última que cae dentro de la región A y por tanto podría tener implicancias inmunogénicas. (Fig 13) Interesantemente cepas aisladas en Argentina en el año 1999 (de las primeras G9 aisladas en la región) presentaban en la posición 100 una Asn al igual que el grupo de 10 secuencias que agrupan juntas de este trabajo y la aparición de Asp en Uru0603 y Uru0604 también se observó en cepas Argentinas aisladas a posteriori en el año 2004. Además ha sido publicado que la Ser46 es una seña característica encontrada en todas la G9P[8] Argentinas en un brote del 2004 [47], característica que como se mencionó comparten Uru0603 y Uru0604

Por otra parte, Uru0603 y Uru0604 poseen solamente dos aminoácidos distintos entre sí, particularmente uno de ellos en la posición 290 (Trp/Arg) diferencia a Uru0604 de todas las demás.

En la figura 13 se comparan las secuencias G9 de este trabajo entre sí y con la cepa de referencia 116E (linaje II) aislada en el año 1985 en el continente Asiático. La divergencia de estas con respecto a la de referencia alcanza un valor de  $7.4 \pm 0.5\%$ , teniendo en cuenta además que muchas de estas sustituciones abarcan los principales sitios antigénicos de VP7.

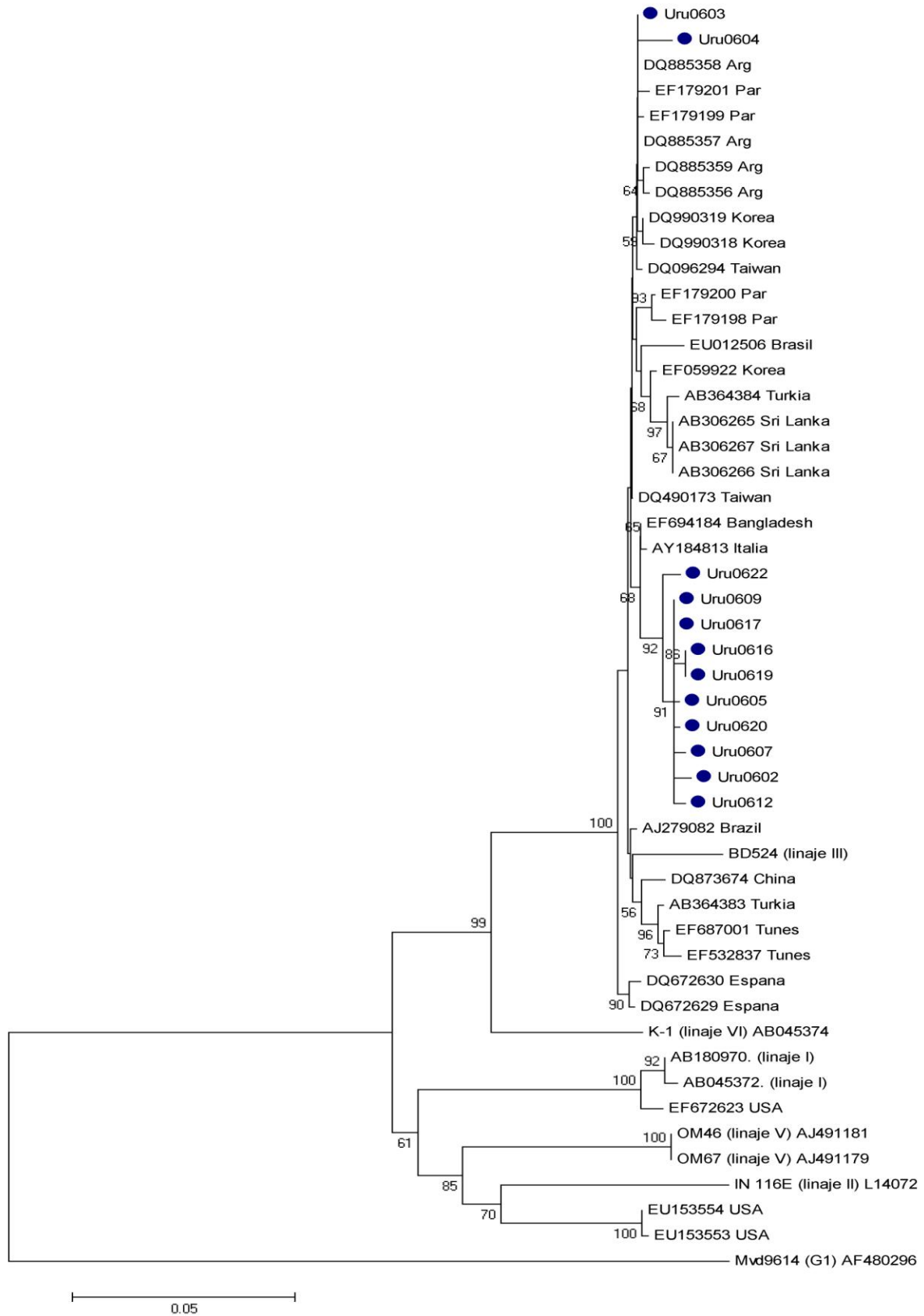


Figura 12. Análisis filogenético de las secuencias VP7 genotipo G9. El árbol fue construido usando el método de Neighbor-Joining y el cálculo de distancias mediante el algoritmo de Tajima-Nei. El soporte estadístico se realizó mediante 500 réplicas de Bootstrap, se indican los valores superiores a 50. Las secuencias de este trabajo se indican con un círculo.

		45	100	150	200	250	300
116E		SPFYKQWYGINVPEITGSMDFAYMNSOCEPFLRSTLCIYYPTEASTQCGDT <b>EMK</b> STLSQFLFRKGMPTGSSVYRREYTDIASPSIDPQFYCDYNYVTVKYNST <b>LEIDMS</b> SLADLLINEMTQNPMDIALYXYCO					
Urul602	..Y.....	..L.....	..A.....	..T.....	..M.....	..D.....	..T.....
Urul603	..S.....	..L.....	..A.....	..T.....	..D.....	..D.....	..T.....
Urul604	..S.....	..L.....	..A.....	..T.....	..D.....	..D.....	..T.....
Urul605	.....	..L.....	..A.....	..T.....	..M.....	..D.....	..T.....
Urul607	.....	..L.....	..A.....	..T.....	..M.....	..D.....	..T.....
Urul609	.....	..L.....	..A.....	..T.....	..M.....	..D.....	..T.....
Urul612	.....	..L.....	..A.....	..T.....	..M.....	..D.....	..T.....
Urul616	.....	..L.....	..A.....	..T.....	..M.....	..D.....	..T.....
Urul617	.....	..L.....	..A.....	..T.....	..M.....	..D.....	..T.....
Urul619	.....	..L.....	..A.....	..T.....	..M.....	..D.....	..T.....
Urul620	.....	..L.....	..V.....	..T.....	..M.....	..D.....	..T.....
Urul622	.....	..L.....	..A.....	..T.....	..M.....	..D.....	..T.....
116E	QNEBANKMISMGSCCTIKVCPFLNNQTLGIGCIPNNVTA <b>PEE</b> EVAN <b>NEK</b> LVTITD <b>V</b> VDGVN <b>HE</b> LDVPPN <b>ICT</b> LRNCRKLGSPRENWAKIQVGSSEVLDITADPNTT <b>PE</b> ERMMQINMKKMMQVFTYVVDYINQIV						
Urul602	..D.....	..L.....	..R.....	..S.....	..K.....	..I.....	..D.....
Urul603	..D.....	..L.....	..R.....	..S.....	..K.....	..I.....	..D.....
Urul604	..D.....	..L.....	..R.....	..S.....	..K.....	..I.....	..D.....
Urul605	..D.....	..L.....	..R.....	..S.....	..K.....	..I.....	..D.....
Urul607	..D.....	..L.....	..R.....	..S.....	..K.....	..I.....	..D.....
Urul609	..D.....	..L.....	..R.....	..S.....	..K.....	..I.....	..D.....
Urul612	..D.....	..L.....	..R.....	..S.....	..K.....	..I.....	..D.....
Urul616	..D.....	..L.....	..R.....	..S.....	..K.....	..I.....	..D.....
Urul617	..D.....	..L.....	..R.....	..S.....	..K.....	..I.....	..D.....
Urul619	..D.....	..L.....	..R.....	..S.....	..K.....	..I.....	..D.....
Urul620	..D.....	..L.....	..R.....	..S.....	..K.....	..I.....	..D.....
Urul622	..D.....	..L.....	..R.....	..S.....	..K.....	..I.....	..D.....

Figura 13. Secuencias aminoacídicas deducidas de los amplicones de VP7 (G9) comparadas con la cepa de referencia 116E aislada en 1985. Los aminoácidos señalados bajo los recuadros son los involucrados en las regiones A, B, C y F principales sitios antígenicos de la proteína

#### 4.6 Análisis filogenético de las G2

Las 5 secuencias G2 obtenidas en este trabajo muestran un alto grado de similitud entre si a nivel nucleotídico (99.5%). El análisis filogenético de las mismas con cepas de referencia y cepas aisladas en el país previamente muestra que todas las secuencias G2 de este trabajo forman un grupo monofilético con un apoyo estadístico de 71% (500 réplicas de Bootstrap), siendo Uru0618 de todas ellas la que mas cambios acumula (1% divergencia). (Fig. 14)

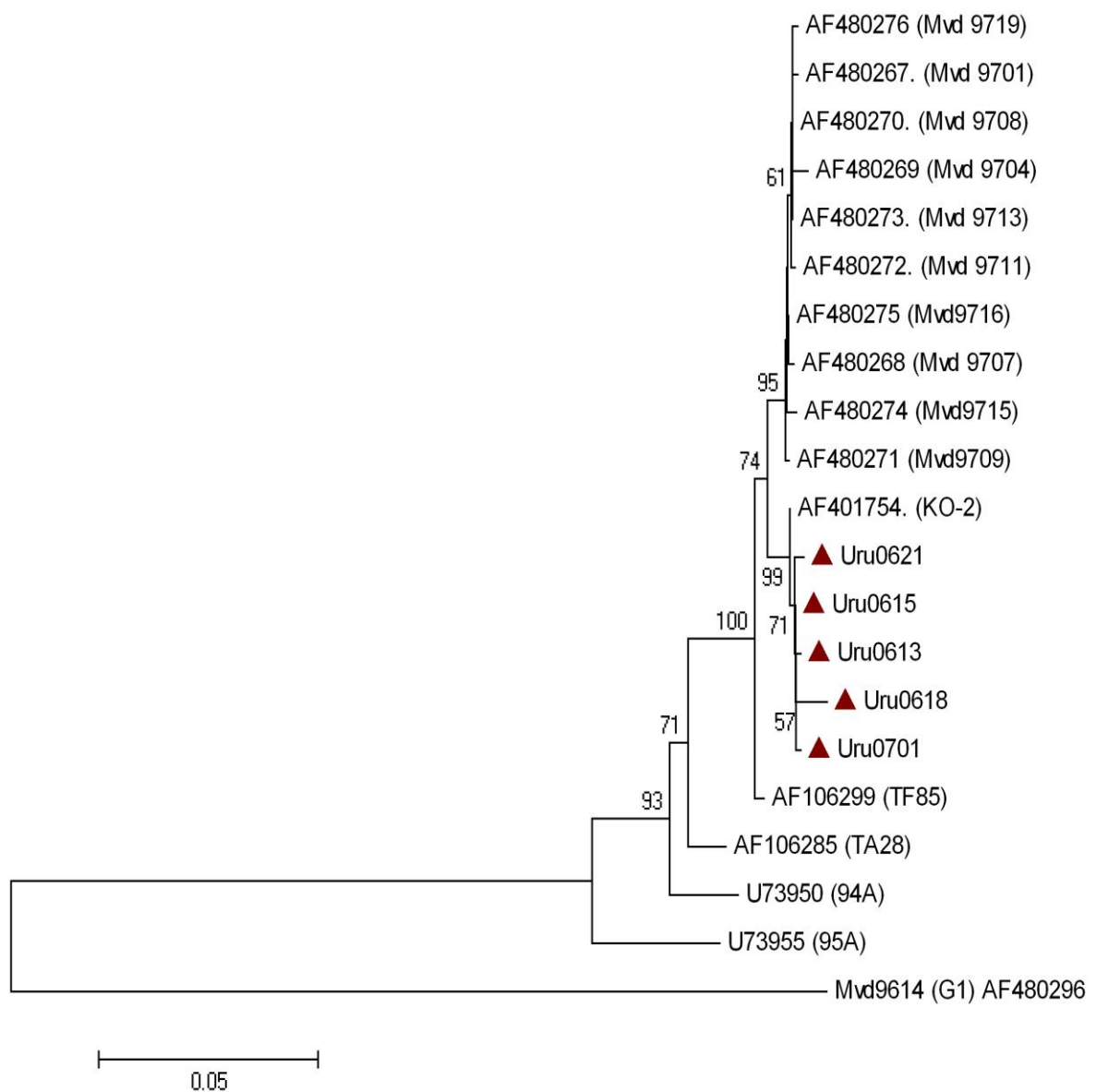


Figura 14. Análisis filogenético de las secuencias VP7 genotipo G2. El árbol fue construido usando el método de Neighbor-Joining y el cálculo de distancias mediante el algoritmo de Tajima-Nei. El soporte estadístico se realizó mediante 500 réplicas de Bootstrap, se indican los valores superiores a 50. Las secuencias de este trabajo se indican con un triángulo.

El grupo de secuencias del presente forman un cluster con la cepa de referencia KO-2 aislada en 2001, particularmente las muestras Uru0613 y Uru0615 presentan un solo nucleótido de divergencia en la región de estudio con respecto a ésta.

Las secuencias identificadas con Mvd, pertenecen a cepas G2 aisladas en Uruguay durante 1997 [6]. Las mismas agrupan todas juntas en un cluster con alto apoyo estadístico (95%) separadas en la filogenia de las respectivas aisladas en este trabajo.

#### **4.7 Análisis de secuencias codificantes G2.**

El análisis de las secuencias de VP7 genotipo G2, confirma que la región amplificada (858 nucleótidos) corresponde a una sección importante de la proteína de estudio (aminoácidos 6 al 292) y que abarca los principales sitios antigénicos (A, B, C y F). Se constató una alta homología a nivel aminoacídico entre las 5 muestras G2 del presente trabajo (99.7% similaridad). Las muestras Uru015 y Uru0613 son idénticas a nivel aminoacídico y a su vez son idénticas a la cepa de referencia KO-2 dentro de la región estudiada, siendo con respecto a éstas últimas Uru0618 la mas divergente acumulando 6 cambios. (Fig. 15)

Las secuencias identificadas con Mvd presentan también un alto grado de homología a nivel proteico entre ellas y presentan cuatro cambios puntuales bien identificados cuando son comparadas con las amplificadas en este trabajo. De estos cuatro solamente uno (aa214) cae dentro de un sitio de interés antigénico en donde se sustituye un Asn por un Asp un aminoácido cargado negativamente que podría influir en la infectividad de este grupo de cepas. En cuanto a los cambios que presenta Uru0618 con el resto, se destaca la sustitución de Tyr6 por una Ser y Gly233 por un Asp, que si bien no se encuentran dentro de los sitios A, B, C y D pueden tener implicancias en la estructura proteica general dada la naturaleza de las sustituciones en particular.

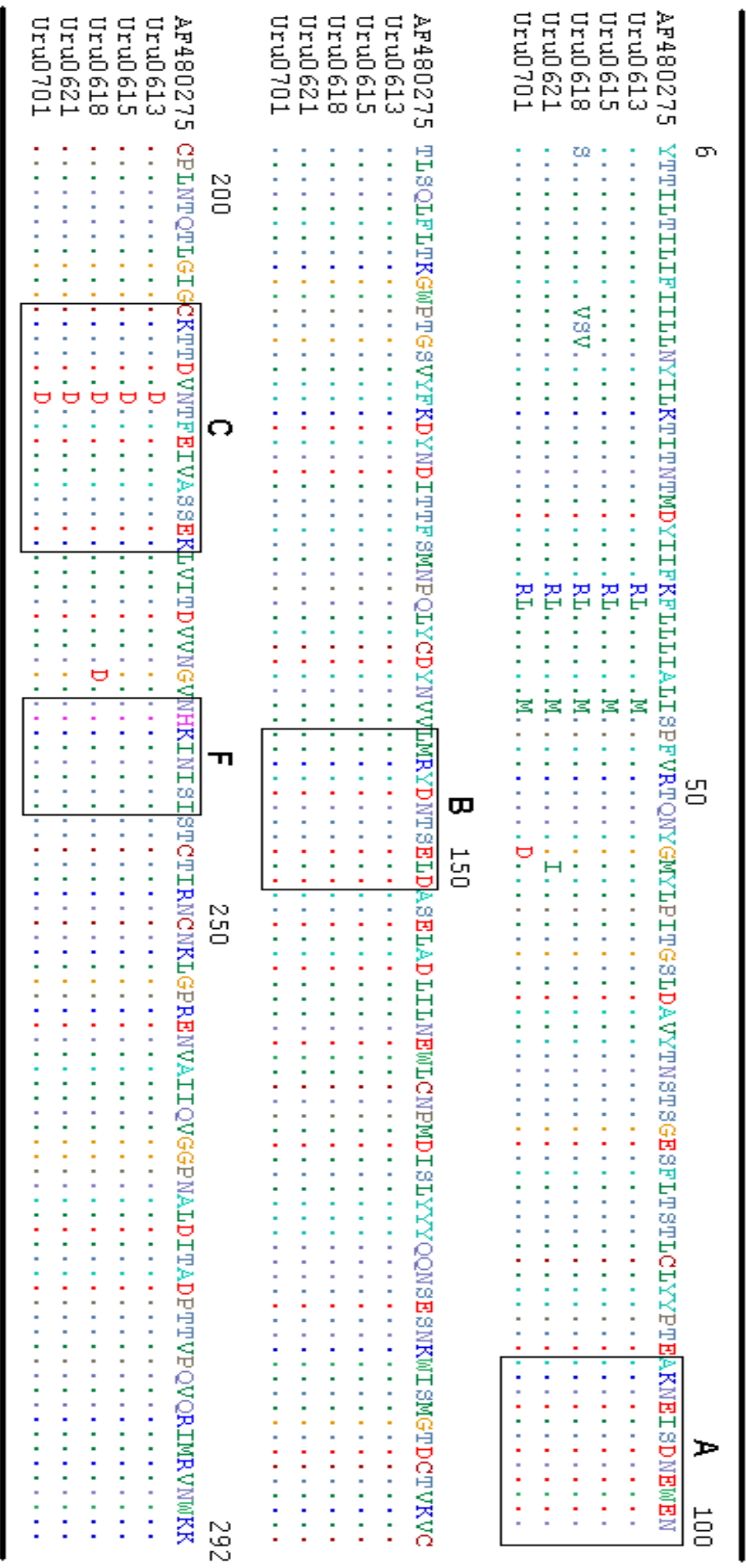


Figura 15. Secuencias aminoacídicas deducidas de los amplicones de VP7 (G2) comparadas con una de las cepas aisladas previamente en nuestro país en el año 1997. [Beróis et al, 2003]



## 5. Discusión.

A través de este trabajo varias observaciones se pudieron realizar detalladas a continuación. Primero de un total de 23 muestras que llegaron a nuestro laboratorio como positivas, 20 pudieron ser confirmadas por electroforesis (74%) ya que exhibían los patrones de bandas característicos de Rotavirus. Se observaron patrones electroforéticos cortos y largos. Es interesante notar que hubo una correlación de los patrones electroforéticos con los G-tipos, de modo que todas las cepas G9 poseían un electroferotipo largo y todas las G2 poseían electroferotipos cortos. Esta correlación entre G-tipo y patrón electroforético no siempre es observada, sin embargo ha sido reportado previamente que los genotipos G2 presentan en general un patrón corto de migración asociado a una UTR 3' de mayor longitud en el segmento 11 [21].

La genotipificación por el método de Multiplex semi-Nested PCR [20] ha sido una herramienta ampliamente utilizada en la caracterización de Rotavirus desde su aparición ya que ha revelado una mayor diversidad de este virus que la observada a priori mediante métodos serológicos.

Dada la naturaleza segmentada del genoma de Rotavirus, éstos pueden reordenar durante infecciones múltiples. Como los genes de VP7 y VP4 pueden segregarse de manera independiente durante el reordenamiento, diferentes combinaciones de G y P-tipos se pueden observar en cepas co-circulantes. Por su naturaleza de ARN, mutaciones puntuales se acumulan a una tasa alta que frecuentemente ocurren en regiones específicas que involucran la genotipificación tanto de VP7 como de VP4 y por tanto habitualmente producen la pérdida de complementariedad con los primers de genotipificación. Esto conduce a resultados conflictivos y comúnmente falsos, reportados por varios autores previamente, principalmente trabajando con los G-tipos G9, G10 y G12 [23]. Estos autores concluyen que se debe seguir una vigilancia en cuanto a la evolución de cada genotipo e ir constantemente probando los primers de tipificación con el fin de probar la efectividad de la misma cada cierto tiempo. En nuestro estudio particularmente este método arrojó resultados contradictorios en cuanto a los G-tipos de algunas de las muestras procesadas.

Los experimentos de confirmación arrojaban resultados distintos (ej: muestra Uru0613 ver Fig.11) y en otros casos como ser el de la muestras 20 y 21 parecían poseer varios G-tipos y por tanto se pensó en casos de infecciones mixtas, hipótesis que fue descartada luego de la amplificación.

La segunda metodología aplicada en el presente, el amplificar directamente VP7 o parte de la misma, no arrojó resultados satisfactorios al principio. Sí, se podía amplificar la misma de sobrenadantes de cultivos celulares infectados con Rotavirus pero no se podía a partir de la extracción de ARN proveniente de las heces. En este contexto se trabajó en la optimización de esta técnica, principalmente en las condiciones reductoras de la misma hasta que se lograron resultados positivos. A partir de esto, de las 20 muestras positivas, 17 se lograron amplificar y secuenciar en una porción considerable de la proteína que nos permitió avanzar en el análisis y conocer los G-tipos relacionados por medio de la comparación con cepas de referencia del GeneBank. Se constató la presencia de los genotipos G2 (30%) y G9 (70%) únicamente y no aparecieron genotipos comunes en humanos como G1, G3 o G4. En el único estudio publicado a la fecha referente a la situación epidemiológica de Rotavirus en nuestro país [6] entre 1996-1999 se había reportado la presencia de G1 (64%), G2(29%),y G4(6%) sin detectarse G9 un genotipo que viene siendo relevante en la región desde principio de década [11] y que particularmente en este trabajo fue ampliamente predominante con un 70% de los casos.

A través de la filogenia de las G9 de este trabajo se pudieron observar dos grupos bien diferenciados. Uno compuesto por 10 secuencias muy similares entre sí que no se relacionan con similares de la región sino que más bien se comparten características con cepas aisladas en Europa y Asia. Mientras tanto las dos restantes (Uru0603 y Uru0604) divergen muy poco entre sí y con cepas Argentinas del mismo período de tiempo. En pro de esto, las secuencias de aminoácidos deducidas confirmaron que éstas dos secuencias poseen en la posición 46 una Serina, previamente descrita como una sustitución que compartían exclusivamente las G9P[8] Argentinas del 2004 [47].

En tanto la filogenia de las G2 reveló un altísimo grado de homología entre todas las analizadas y particularmente con la secuencia de referencia KO-2 aislada en 2001 y reportada recientemente en un brote de diarreas causadas

por RV en adultos en Japon [22]. Las G2 aisladas en este trabajo, provenientes de un brote en el año 2006 son más similares a la cepa KO-2 que a cepas G2 aisladas en el país años anteriores.

Al comparar las filogenias de ambos G-tipos se observa que las cepas G9 son mucho más divergentes que las G2 tanto a nivel nucleotídico como aminoacídico. Esto se corresponde con lo observado a nivel global en donde la altísima diversidad de las cepas G9 a determinado que al momento 6 sublinajes se hayan descrito dentro del propio genotipo. Siendo el caso de VP7 una proteína se superficie del virus es válido considerar el hecho de la generación de diversidad, principalmente aminoacídica, como mecanismo de evasión de la respuesta inmune del huésped y por tanto se puede pensar en G9 como un genotipo más activo en ese sentido comparado con G2.

Actualmente G9 ocupa un papel protagónico en cuanto a la epidemiología de RV y diversos estudios han publicado la creciente incidencia del mismo a nivel mundial comparando la situación de estos últimos años con la situación de fines de la década pasada, llegando G9 a ser el segundo de mayor incidencia en el período 2001-2008 y alcanzando más de un 20 % de prevalencia en las Américas [1].

Por otra parte varios estudios han constatado un claro patron de similaridad entre cepas G9 de origen humano y cepas G9 de origen porcino, siendo una de las posibles explicaciones de esto la transmisión zoonotica desde el porcino al humano [33].

Por tanto, este trabajo resalta la importancia de saber que G9 circula en nuestro país siendo éste un genotipo que presenta un patrón de constante divergencia y que es activamente vigilado a nivel mundial; y a su vez la importancia de continuar realizando este tipo de análisis para seguir de cerca la evolución del mismo en esta región. A su vez, el hecho de que la aparición de éste genotipo en humanos pueda encontrar su explicación en una transmisión zoonótica plantea la interrogante de si otros genotipos aún no aislados en humanos que se sabe circulan en diversas especies animales puedan de aquí en más adquirir la misma trascendencia o quizás aún más, lo que podría acomplejar más el control de esta enfermedad.

En conclusión, habiendo aplicado dos metodologías para llevar a cabo este estudio se observó que la amplificación de VP7 resultó ser más confiable y no menos rápida que la Genotipificación en nuestro caso particular, arrojando datos menos conflictivos y de los cuales además un mayor número de datos se pueden inferir a posteriori. Si bien los costos podrían ser levemente menores en el segundo caso, dada la exigencia de realizar experimentos confirmativos esta cualidad no quedaría tan marcada sobre la amplificación del gen de VP7. Un tema a tener en cuenta es que mediante el método de genotipificación se pueden obtener los G y P-tipos a la vez y eso es una clara ventaja, siempre y cuando se optimice y apruebe el correcto funcionamiento de los primers como se comentó anteriormente. Ventaja que en el caso puntual de este trabajo, no se aprovecha ya que éste se ocupó únicamente de caracterizar los G-tipos. Esto, sumado al hecho de que el poner a punto la técnica, evaluar mutaciones puntuales de las cepas y compararlas con los primers [23] no era el objetivo del mismo y excedía nuestras aspiraciones, llevó inclinar la balanza por la amplificación del gen de VP7 como método más efectivo. Esto no quiere decir que una metodología sea más correcta que la otra, sino que se debe poner en la balanza los pro y los contra en el momento de la planificación y en parte ese fue uno de los objetivos del presente trabajo, el elucidar tales patrones para tenerlos en cuenta en un futuro estudio epidemiológico.

Por otra parte, en cuanto a la epidemiología de VP7 de Rotavirus, si bien está claro que la cantidad de muestras no es la apropiada para inferir un resultado que abarque todo el país, el análisis epidemiológico presente indica que el genotipo G9 circula actualmente en Uruguay y que la situación no es la misma que hace una década. Esto promueve el continuar la vigilancia de Rotavirus en nuestro país y también el tener al genotipo G9 en activa consideración en la aplicación de futuras vacunas candidatas de modo de contribuir al control de una enfermedad que desde hace años afecta un sector de la población tan importante como ser los niños.

## 6. Bibliografía

1. *Global networks for surveillance of rotavirus gastroenteritis, 2001-200.* Wkly Epidemiol Rec, 2008. **83**(47): p. 421-5.
2. Anderson, E.J. and S.G. Weber, *Rotavirus infection in adults.* Lancet Infect Dis, 2004. **4**(2): p. 91-9.
3. Arias, C.F., S. Lopez, and R.T. Espejo, *Gene protein products of SA11 simian rotavirus genome.* J Virol, 1982. **41**(1): p. 42-50.
4. Au, K.S., et al., *Receptor activity of rotavirus nonstructural glycoprotein NS28.* J Virol, 1989. **63**(11): p. 4553-62.
5. Ball, J.M., et al., *Rotavirus NSP4: a multifunctional viral enterotoxin.* Viral Immunol, 2005. **18**(1): p. 27-40.
6. Berois, M., et al., *Genetic variation in the VP7 gene of human rotavirus isolated in Montevideo-Uruguay from 1996-1999.* J Med Virol, 2003. **71**(3): p. 456-62.
7. Besselaar, T.G., A. Rosenblatt, and A.H. Kidd, *Atypical rotavirus from South African neonates. Brief report.* Arch Virol, 1986. **87**(3-4): p. 327-30.
8. Bishop, R.F., et al., *Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis.* Lancet, 1973. **2**(7841): p. 1281-3.
9. Brandt, C.D., et al., *Rotavirus gastroenteritis and weather.* J Clin Microbiol, 1982. **16**(3): p. 478-82.
10. Callejas, D., et al., *[Effect of climatic factors on the epidemiology of rotavirus infection in children under 5 years of age in the city of Maracaibo, Venezuela].* Invest Clin, 1999. **40**(2): p. 81-94.
11. Castello, A.A., et al., *Rotavirus strain surveillance in Latin America: a review of the last nine years.* Pediatr Infect Dis J, 2004. **23**(10 Suppl): p. S168-72.
12. Castello, A.A., et al., *Molecular epidemiology of group A rotavirus diarrhea among children in Buenos Aires, Argentina, from 1999 to 2003 and emergence of the infrequent genotype G12.* J Clin Microbiol, 2006. **44**(6): p. 2046-50.

13. Cohen, J., *Ribonucleic acid polymerase activity associated with purified calf rotavirus*. J Gen Virol, 1977. **36**(3): p. 395-402.
14. Cohen, J., et al., *Nucleotide sequence of bovine rotavirus gene 1 and expression of the gene product in baculovirus*. Virology, 1989. **171**(1): p. 131-40.
15. Dennehy, P.H., *Rotavirus vaccines--an update*. Vaccine, 2007. **25**(16): p. 3137-41.
16. Estes, M.K., D.Y. Graham, and B.B. Mason, *Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms*. J Virol, 1981. **39**(3): p. 879-88.
17. Estes, M.K., A.Z. Kapikian, and A. Z., *Rotaviruses and their replication*. Fields Virology, 5th Edition (53), 2007.
18. Fabbretti, E., et al., *Two non-structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures in vivo*. J Gen Virol, 1999. **80** ( Pt 2): p. 333-9.
19. Gorrell, R.J. and R.F. Bishop, *Homotypic and heterotypic serum neutralizing antibody response to rotavirus proteins following natural primary infection and reinfection in children*. J Med Virol, 1999. **57**(2): p. 204-11.
20. Gouvea, V., et al., *Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens*. J Clin Microbiol, 1990. **28**(2): p. 276-82.
21. Heiman, E.M., et al., *Group A human rotavirus genomics: evidence that gene constellations are influenced by viral protein interactions*. J Virol, 2008. **82**(22): p. 11106-16.
22. Iijima, Y., et al., *An outbreak of rotavirus infection among adults in an institution for rehabilitation: long-term residence in a closed community as a risk factor for rotavirus illness*. Scand J Infect Dis, 2006. **38**(6-7): p. 490-6.
23. Iturriza-Gomara, M., G. Kang, and J. Gray, *Rotavirus genotyping: keeping up with an evolving population of human rotaviruses*. J Clin Virol, 2004. **31**(4): p. 259-65.

24. Jayaram, H., M.K. Estes, and B.V. Prasad, *Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication*. Virus Res, 2004. **101**(1): p. 67-81.
25. Kapikian, A.Z., *Viral gastroenteritis*. Jama, 1993. **269**(5): p. 627-30.
26. Labbe, M. and C.A. Baudoux P, et al. , *Identification of the nucleic acid binding domain of the rotavirus VP2 protein*. J Gen Virol, 1994. **75**: p. 3423-3430.
27. Labbe, M., et al., *Expression of rotavirus VP2 produces empty corelike particles*. J Virol, 1991. **65**(6): p. 2946-52.
28. Lawton, J.A., et al., *Three-dimensional structural analysis of recombinant rotavirus-like particles with intact and amino-terminal-deleted VP2: implications for the architecture of the VP2 capsid layer*. J Virol, 1997. **71**(10): p. 7353-60.
29. Lipson, S.M. and K.A. Zelinsky-Papez, *Comparison of four latex agglutination (LA) and three enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) for the detection of rotavirus in fecal specimens*. Am J Clin Pathol, 1989. **92**(5): p. 637-43.
30. Liu, M., N.M. Mattion, and M.K. Estes, *Rotavirus VP3 expressed in insect cells possesses guanylyltransferase activity*. Virology, 1992. **188**(1): p. 77-84.
31. Lundgren, O. and L. Svensson, *Pathogenesis of rotavirus diarrhea*. Microbes Infect, 2001. **3**(13): p. 1145-56.
32. Mansell, E.A. and J.T. Patton, *Rotavirus RNA replication: VP2, but not VP6, is necessary for viral replicase activity*. J Virol, 1990. **64**(10): p. 4988-96.
33. Martinez-Laso, J., et al., *Phylogeny of G9 rotavirus genotype: A possible explanation of its origin and evolution*. J Clin Virol, 2008.
34. Mathieu, M., et al., *Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: implications for the architecture of the virion*. Embo J, 2001. **20**(7): p. 1485-97.
35. Matsui, S.M., et al., *Sequence analysis of gene 11 equivalents from "short" and "super short" strains of rotavirus*. J Virol, 1990. **64**(1): p. 120-4.

36. Mattion, N.M., J. Cohen, and M.K. Estes, *The rotavirus proteins*. In: *Kapikian A, ed. . Viral Infections of the gastrointestinal tract*. New York: Marcel Dekker, 1994: p. 169-249.
37. Parashar, U., et al., *New breath for rotavirus vaccines*. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*, 2006. **3**: p. 159-165.
38. Parra, G.I., et al., *Diversity of group A rotavirus strains circulating in Paraguay from 2002 to 2005: detection of an atypical G1 in South America*. *J Clin Virol*, 2007. **40**(2): p. 135-41.
39. Patton, J.T., *Structure and function of the rotavirus RNA-binding proteins*. *J Gen Virol*, 1995. **76 ( Pt 11)**: p. 2633-44.
40. Patton, J.T. and E. Spencer, *Genome replication and packaging of segmented double-stranded RNA viruses*. *Virology*, 2000. **277**(2): p. 217-25.
41. Patton, J.T., et al., *Rotavirus RNA polymerase requires the core shell protein to synthesize the double-stranded RNA genome*. *J Virol*, 1997. **71**(12): p. 9618-26.
42. Piron, M., et al., *Identification of the RNA-binding, dimerization, and eIF4GI-binding domains of rotavirus nonstructural protein NSP3*. *J Virol*, 1999. **73**(7): p. 5411-21.
43. Pocock, D.H., *Isolation and characterization of two group A rotaviruses with unusual genome profiles*. *J Gen Virol*, 1987. **68 ( Pt 3)**: p. 653-60.
44. Santos, N. and Y. Hoshino, *Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine*. *Rev Med Virol*, 2005. **15**(1): p. 29-56.
45. Santos, N., et al., *Surveillance of rotavirus strains in Rio de Janeiro, Brazil, from 1997 to 1999*. *J Clin Microbiol*, 2003. **41**(7): p. 3399-402.
46. Staat, M.A., et al., *Clinical presentations of rotavirus infection among hospitalized children*. *Pediatr Infect Dis J*, 2002. **21**(3): p. 221-7.
47. Stupka, J.A., et al., *Detection of human rotavirus G9P[8] strains circulating in Argentina: phylogenetic analysis of VP7 and NSP4 genes*. *J Med Virol*, 2007. **79**(6): p. 838-42.



## 7. Abreviaturas.

<b>aa</b>	Aminoácidos
<b>ADN</b>	Ácido Desoxiribonucleico
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico
<b>dNTP</b>	Desoxinucleótidos trifosfato
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>μL</b>	Micro litros
<b>M</b>	Molar
<b>mM</b>	Mili Molar
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la Polimerasa
<b>RT</b>	Transcripción Reversa
<b>RE</b>	Retículo Endoplasmático
<b>PBS</b>	Buffer Fosfato Salino
<b>ORF</b>	Marco abierto de lectura

## **8. Agradecimientos**

Primero que nada agradecer al Dr. Juan Arbiza por haberme brindado la posibilidad de realizar este trabajo en la sección Virología de la Facultad de Ciencias y gracias a ello el poder trabajar en lo que a uno le interesa.

Agradezco profundamente a la Dra. Mabel Berois por su dedicación a mi formación, por la paciencia y el interés. Por la seriedad y claridad aplicada en cada concepto durante la orientación de este trabajo y principalmente por la gran calidad humana más que importante en mi formación no solo como investigador sino como persona.

Agradezco a la Dra. Adriana Delfraro por su colaboración en los análisis filogenéticos realizados en este trabajo y a la Dra Frabasile por las clases de End Note.

Al grupo de gente que integra la sección de Virología de la Facultad de Ciencias, por hacer de un ambiente de trabajo un lugar mas agradable y ameno en el cual uno se siente como en su casa. A muchos de ellos agradezco los conocimientos brindados y la paciencia en la cotidianidad.

Agradezco a mis amigos, a todos ellos por dar para adelante en las caídas, por compartir la sonrisa, por hacer las veces de familia, por ser familia.

A Guille, Juan y Amelia por hacerme sentir uno más, por el cariño y el afecto, un millón de gracias.

A Laura y Leo, no existen las palabras de agradecimiento, por ser hermanos y padres a la vez, por el amor.

Al final, dedico enteramente este trabajo con la importancia y trascendencia que para mi representa, a mi padre. Mis logros son y serán los tuyos.

**A todos, muchas gracias!**

