



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY



Facultad de Ciencias
UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA

GENOTIPIFICACIÓN DE ROTAVIRUS MEDIANTE MÚLTIPLEX RT-PCR EN URUGUAY

Virginia Bengochea

Tesina de Grado, Licenciatura en Ciencias Biológicas

Tutor: Dra. Mabel Berois.

Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

Montevideo, Uruguay.

Año 2010

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer la oportunidad que se me brindó de incorporarme a la sección Virología de la Facultad de Ciencias y poder no solamente realizar mi pasantía de fin de carrera, sino que además pasar a formar parte de un grupo humano muy cálido. Por eso quiero agradecer al Dr. Juan Arbiza y a mis compañeros de laboratorio que desde el principio me hicieron sentir integrada al grupo.

Tengo que agradecer muy especialmente al Lic. Alvaro Alberti, que con dedicación y paciencia me enseñó todo lo que necesitaba para poder llevar adelante mi trabajo. Es un gran compañero que nunca faltó cuando lo necesite incluso a pesar de mis limitaciones de horarios por mi trabajo.

No me alcanzan las palabras para agradecer a la Dra. Mabel Berois, por su entrega incondicional, por su invaluable paciencia y comprensión, por haber sabido acompañar mis tiempos y marcarme los límites cuando fue preciso. Por todos los conocimientos transmitidos, por su forma de marcar el camino que uno debe recorrer para crecer profesionalmente de forma responsable y humana.

A mis compañeros de SUAT que sin su ayuda hubiera sido imposible para mí realizar ésta carrera. Siempre dispuestos a cambiarme las guardias, a esperarme cuando se me hacía tarde e incluso hasta estudiar conmigo.

A Paula y Marita, por su apoyo incondicional, su cariño y por estar siempre para darme un buen consejo. Por su apoyo profesional, por acompañarme.

A mi familia por todo su apoyo y su aliento. Por hacerme sentir en todo momento lo importante que era para ellos que yo pudiera estar en el camino que había elegido como forma de vida y que pudiera realizar mis sueños.

A Germán que fue mi compañero de vida durante toda mi carrera, con quien compartí cada etapa, los triunfos y las dificultades. Siempre a mi lado para darme una mano cuando pudiera y ayudarme a su manera en lo que estuviera a su alcance, aunque a veces solo fuera tener que escucharme, incluso sin comprender del todo lo que relataba. Por hacerse cargo de nuestras cosas cuando yo debí dedicarme por completo a mi trabajo.

Muchas gracias a todos, no hubiera podido sin su apoyo, no valdría la pena si no tuviera tanta gente con quien compartirlo!!

Indice

Resumen.....	4
1. Introducción	
1.1 Los Rotavirus.....	6
1.2 Aspectos generales de la enfermedad.....	8
1.3 Clasificación y estructura del virus.....	10
1.4 Proteínas virales.....	14
1.5 Epidemiología Molecular.....	19
1.6 Vacunas.....	21
2. Objetivos	
2.1 Generales.....	23
2.1 Específicos.....	23
3. Materiales y Métodos	
3.1 Extracción de ARN viral.....	25
3.2 Genotipificación de VP7 mediante multiplex RT-PCR.....	25
3.3 Tipificación de G12.....	27
3.4 Genotipificación de VP4 mediante multiplex RT-PCR.....	27
3.5 PCR Anidada para VP7 y VP4.....	29
3.6 Análisis de ácidos nucleicos mediante electroforesis.....	29
3.7 Secuenciación de los productos de PCR.....	29
3.8 Análisis de las secuencias.....	29
4. Resultados	
4.1 Extracción de ARN viral.....	31
4.2 Genotipificación de VP7 y VP4.....	32
4.3 Análisis filogenético del gen VP7.....	37
4.4 Análisis filogenético del gen VP4.....	39
5. Discusión.....	41
6. Bibliografía.....	46
7. Abreviaturas.....	51

Resumen

Rotavirus es el mayor agente causal de la diarrea severa en niños menores de 5 años, con importantes consecuencias a nivel de morbilidad y mortalidad, estimándose unas 600.000 muertes por año en todo el mundo a causa de esta enfermedad por Rotavirus.

El material genético de Rotavirus esta compuesto por 11 segmentos de ARN doble hebra, que codifican para 12 proteínas, de las cuáles seis son estructurales. Dos de ellas, VP7 y VP4 conforman la superficie externa del virus y presentan gran variabilidad genética asociada a un mecanismo de evasión a la respuesta inmune del huésped. Por este motivo a la fecha se conocen más de 20 genotipos distintos de VP7 (G-tipos) y más de 30 distintos para VP4 (P-tipos). Los estudios epidemiológicos de Rotavirus se orientan hacia la genotipificación de estas dos proteínas con el fin de determinar cuáles son los G-tipos y P-tipos predominantes lo que se convierte en una clasificación binomial del virus al mismo tiempo que permite conocer su evolución en el tiempo. Dichos estudios han revelado una predominancia de los G-tipos G1, G2, G3 y G4 asociados con los P-tipos P[8] y P[4] y en los últimos años se ha constatado la presencia con importante relevancia de G9, G5 y la aparición por primera vez de G12. El objetivo del presente trabajo fue llevar a cabo una caracterización genotípica tanto para G-tipo como para P-tipo de un grupo de 41 muestras de heces provenientes de pacientes pediátricos del Hospital Pereira Rossell pertenecientes al año 2002. La metodología de genotipificación utilizada está basada en una multiplex RT-PCR para VP7 y la puesta punto en el presente trabajo de la misma técnica para VP4. Los resultados de nuestro estudio revelaron que un 85,3% fueron G4, un 2,4% G1 (1 muestra) y un 58,5% son P[8]. En total un 48,7% de las muestras fueron G4P[8]. De las muestras genotipificadas, algunas se enviaron a secuenciar para verificar el genotipo obtenido y realizar además el estudio filogenético de las mismas de modo de obtener una aproximación del comportamiento evolutivo del virus circulante en nuestro país ese año y su relación con datos disponibles correspondientes a la región. La importancia de la continua vigilancia epidemiológica de Rotavirus reside en que nos aporta la información necesaria como base para el diseño de estrategias de control de la enfermedad así como el presunto desarrollo de vacunas efectivas.

INTRODUCCIÓN

1.1 Los Rotavirus

Varios son los agentes etiológicos que pueden ser la causa de diarrea severa en niños, como bacterias, virus, parásitos y productos alimenticios. La identificación a tiempo del causante permite poner en marcha el tratamiento adecuado en el paciente y evitar así el uso indebido de antibióticos cuando el agente sea viral. Estudios recientes sugieren que la mortalidad infantil mundial por diarrea disminuyó durante las últimas dos décadas, pero la proporción de hospitalizaciones por diarrea atribuibles a Rotavirus se ha visto incrementada. Varios factores probablemente expliquen este fenómeno como ser: a) el mejoramiento en los estados sanitarios y de higiene disminuyen el impacto de diarrea causada por bacterias y parásitos los cuáles son principalmente transmitidos a través de comida y agua contaminada, a diferencia de Rotavirus que a menudo también se extiende mediante el contacto persona-persona; b) una terapia basada en la adecuada hidratación oral para reponer la pérdida de fluidos corporales, factor de máxima importancia como responsable de la disminución de muertes por diarrea, sin embargo con respecto a la diarrea causada por Rotavirus esta terapia se dificulta debido a que la enfermedad también se ve acompañada de vómitos reiterados; c) Terapias antimicrobianas son efectivas cuando se trata de bacterias y parásitos, pero para infecciones por Rotavirus no hay tratamientos específicos disponibles [1-4].

Independientemente de la causa, las enfermedades diarreicas: a) son la causa más común de enfermedad en niños en todo el mundo, b) son una de las seis principales causas de 10,6 millones de muertes que ocurren anualmente en niños menores de 5 años de edad, c) representan el 18% de éstas muertes (es decir, más de 2 millones), con el mayor número de víctimas en los países en desarrollo [3]. Estudios basados en datos obtenidos en hospitales de Asia, África y America Latina indican que entre el 25% y el 55% de las hospitalizaciones por enfermedad diarreica en niños menores de 5 años son a causa de infecciones por Rotavirus y el 80% de la muertes totales por esta causa ocurren en los países pobres de Asia y África [1, 5-7].

En nuestro país Rotavirus es una causa importante de morbilidad y responsable de diarrea intrahospitalaria en niños, en la cuál un estudio publicado en el 2006 asoció a Rotavirus como el causante de la misma en aproximadamente un 40% en total. En este mismo estudio se observó que en niños pertenecientes al Hospital Pereira Rossell, hospitalizados con diarrea aguda, Rotavirus estaba asociado entre el 14 al 37% de los casos y un estudio realizado en población mutal asoció diarrea causada por Rotavirus en el 45% de los casos estudiados [8].

En 1973 Bishop y colaboradores identificaron por primera vez a Rotavirus humano asociado a diarrea severa en lactantes y niños a partir de biopsias duodenales mediante microscopía electrónica [9]. A partir de ahí rápidamente se detectó Rotavirus en muchos países, en heces de pacientes pediátricos con enfermedad diarreica y pronto se estableció como el principal agente viral causante de la diarrea aguda en lactantes y niños pequeños en países en desarrollo y desarrollados incluso superando en importancia a otros agentes etiológicos [5, 10, 11] (Fig. 1).

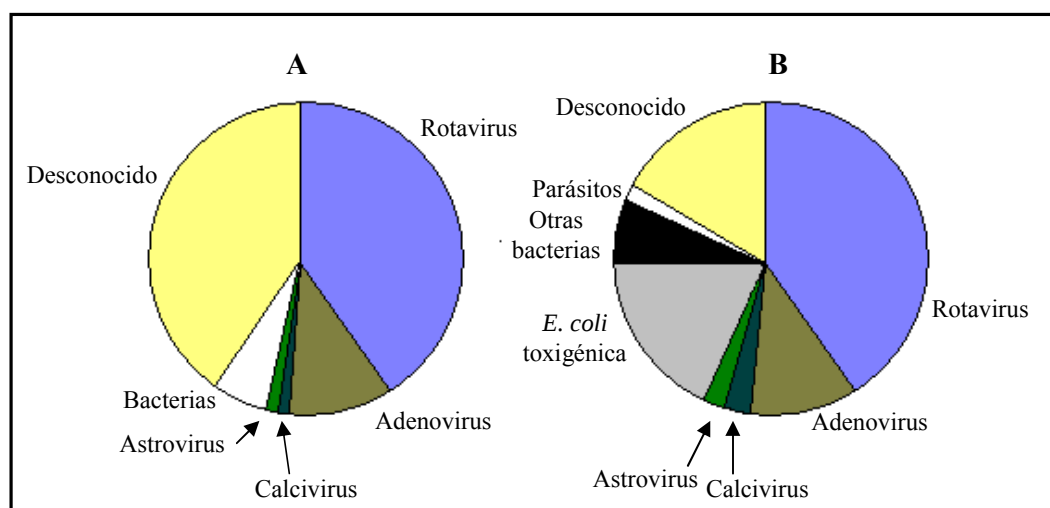


Fig. 1. Estimación de los distintos agentes etiológicos como causantes de diarrea aguda en niños que requirieron hospitalización en países desarrollados (A) y en desarrollo (B). Extraído y adaptado de Kapikian, A., 1993 [10].

Por este motivo se generó un gran interés en evaluar los serotipos y genotipos circulantes con el fin de diseñar estrategias de control y prevención de la enfermedad incluyendo el desarrollo de una vacuna eficaz y segura. Al día de hoy varias vacunas tentativas han sido evaluadas de las cuáles algunas debieron ser retiradas de circulación debido a los efectos colaterales que tenían asociadas. Sin embargo otras han demostrado ser eficaces y se están usando actualmente en todo el mundo. De todas formas debida a la alta variabilidad que el virus presenta existe una continua vigilancia de la evolución del mismo lo que implica el desarrollo continuo de nuevas vacunas que abarquen la mayor cantidad de genotipos circulantes aportando la seguridad requerida.

1.2 Aspectos generales de la enfermedad

Se estima que para la edad de 5 años, el 95% de los niños han sido infectados por Rotavirus, con un pico de incidencia de la enfermedad en niños de entre 6 y 24 meses de edad, de los cuáles 1 de cada 5 realiza consulta médica, 1 de cada 50 es hospitalizado y 1 cada 250, muere. En adultos la enfermedad por lo general es asintomática aunque se ha reportado hasta un 31% de pacientes con diarrea infectados por Rotavirus [12-16].

Las observaciones revelan que la enfermedad en niños ocurre principalmente en los meses más fríos y húmedos del año en países de clima templado y en países tropicales ocurre durante todo el año [10, 11, 17, 18]. El cuadro clínico se caracteriza por diarrea, vómitos, fiebre y la deshidratación es la consecuencia más importante causante de una enfermedad severa que en algunos casos conducirá a la muerte del paciente sobre todo en aquellos con factores de riesgo como la desnutrición [5, 19] y puede transformarse en una enfermedad crónica en niños inmuno comprometidos [20].

Rotavirus es transmitido por la vía fecal-oral y probablemente la infección se adquiere de un hermano mayor, padre o madre portadores de una infección subclínica ya que la presencia de Rotavirus en el tracto intestinal antes y después del cese de la diarrea ha sido bien documentada [5, 21]. Sin embargo aún se discute la posibilidad de la ruta respiratoria como vía de transmisión ya que existe cierta evidencia que la avalaría [22].

La resistencia a la inactivación física (junto con el gran número de partículas virales presentes en heces) pueden contribuir a la transmisión eficiente del virus. Esto se deduce de la observación de la estabilidad de Rotavirus humano y animal a la temperatura ambiente y de la baja dosis infecciosa necesaria en humanos [5, 23]. Otros estudios sugieren la contaminación del medio ambiente como fuente de infección debido a que la habilidad de Rotavirus para sobrevivir en varias superficies bajo diferentes condiciones contribuyen a su amplia diseminación [24]. Estas características son responsables de la persistencia de la infección por Rotavirus descrita en salas de recién nacidos y de la alta frecuencia de infecciones intrahospitalarias observadas [5]. Dado que muchos antígenos de neutralización de las cepas de Rotavirus humano se han encontrado también en animales y viceversa, ha llevado a considerar la transmisión interespecie y la reasociación de segmentos genómicos como una de las fuerzas impulsoras de la evolución del virus. La infección de humanos a partir de animales es un evento raro aunque se han reportado cepas originadas de la reasociación humano-animal que se vuelven muy prevalentes como las humano-bovino de la India y las humano-cerdo de Brasil. [22, 25, 26].

El período de incubación de la enfermedad diarreica ha sido estimado en menos de 48 horas [5]. Rotavirus infecta las células intestinales maduras que cubren las terminaciones medias y distales de las vellosidades y provoca una disfunción y muerte de los enterocitos. La histopatología de los intestinos infectados muestra atrofia de las vellosidades y pérdida de su borde, debida a la eliminación de los enterocitos maduros y a la infiltración mononuclear de la lámina propia (Fig. 2). A medida que avanza la infección, las células infectadas son reemplazadas por células cuboides inmaduras y secretorias de la cripta, incapaces de cumplir las funciones normales de digestión y absorción. La diarrea es provocada por diferentes componentes, ocurre un aumento de la secreción de agua y sales y una disminución de la absorción de los nutrientes a nivel intestinal. El conocimiento de las modificaciones intracelulares inducidas por Rotavirus permite entender la patogénesis ligada a la infección. Rotavirus para poder multiplicarse y ser exitoso debe, entre otras cosas, provocar cambios en los balances iónicos de la célula. Una vez que el virus se replica mata la célula a través de mecanismos activados por esta modificación iónica. Las partículas liberadas por la lisis celular infectan células contiguas para así continuar su ciclo.

A nivel de los balances iónicos los primeros estudios realizados mostraron que dentro de la célula infectada, existen modificaciones en las concentraciones de potasio, cloruro y sodio y en particular de calcio, ya que este virus es muy sensible a la concentración de calcio, necesaria para la integridad de la capa más externa de la cápside. Los estudios revelan que la proteína responsable de las alteraciones en las concentraciones iónicas es la proteína viral no estructural NSP4 que actúa como una enterotoxina. Esta proteína al ser liberada al lumen del intestino se une a un receptor celular y dispara una señal de transducción que incrementa el nivel de calcio intracelular, debido a la movilización del mismo desde el retículo endoplasmático hacia el citoplasma que estimula secreción de cloro y de esta forma decrece la absorción de sodio y agua [5].

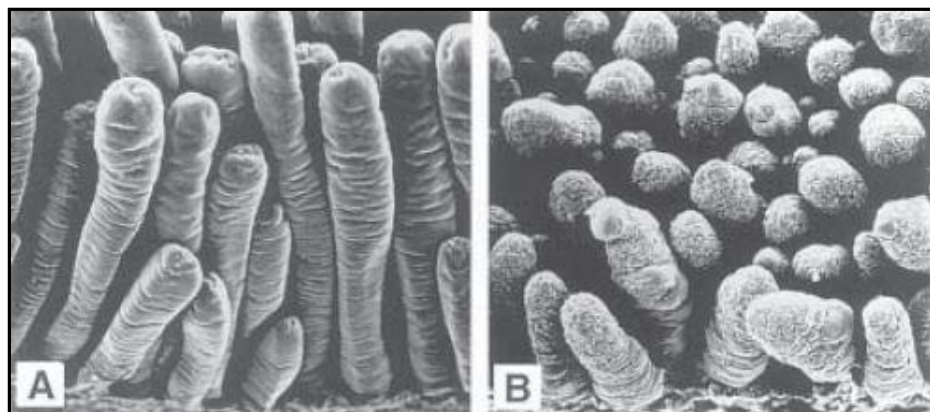


Fig. 2. Células del intestino delgado medio de terneros gnotobioticos. (A) Animal control sin infección; (B) Animal infectado experimentalmente con Rotavirus. (Adaptado de Greenberg, Clark y Offit, 1994) [27].

1.3 Clasificación y estructura del virus.

Rotavirus pertenece a la familia *Reoviridae*, que también posee otros 11 géneros y que en su conjunto presentan un amplio rango de huéspedes desde vertebrados, invertebrados, plantas e incluso un género es capaz de infectar organismos del reino Fungi [28]. El género Rotavirus es un agente etiológico tanto de animales como de humanos y tienen una apariencia parecida a una rueda, cuando es visualizado por microscopio electrónico y de ahí surge su denominación (del Latín Rota: rueda). (Fig. 3.)

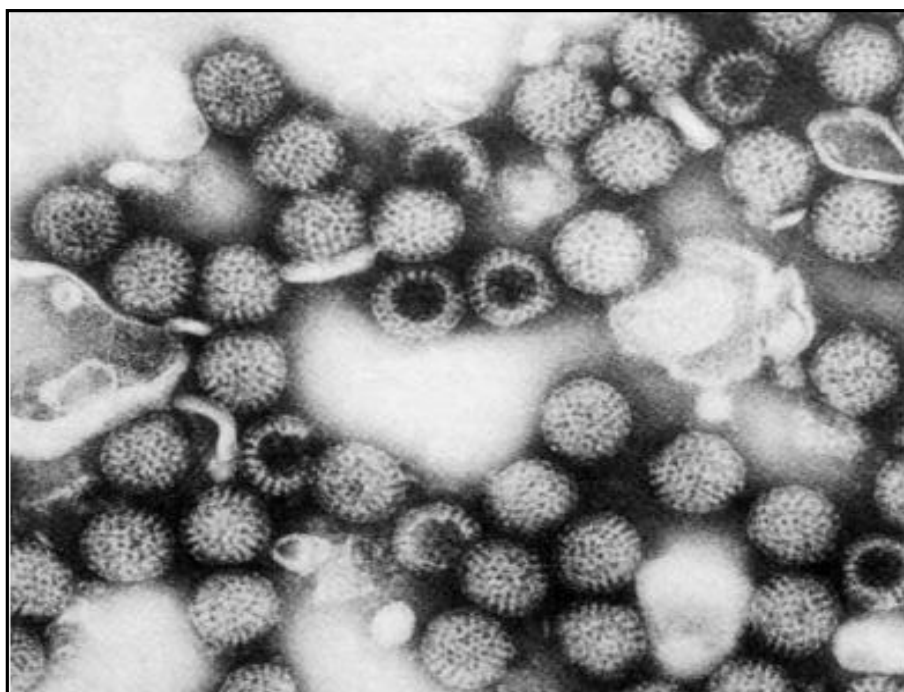


Fig. 3. Partículas de rotavirus humano, obtenidas a partir de muestras de pacientes infantiles con gastroenteritis, observadas mediante microscopía electrónica (EM). Adaptado de Kapikian et al. 1974. [29]

Las partículas maduras de Rotavirus poseen un diámetro aproximado de 100nm, sin envuelta lipídica con estructura icosaédrica, están conformados por tres cápsides concéntricas y por eso mediante técnicas de microscopía electrónica es posible observar tres morfologías distintas de viriones de Rotavirus. La partícula completa (TLP: Triple-layered-particle), la partícula carente de la capa más externa (DLP: Double-layered-particle), con una morfología rugosa debido a las subunidades triméricas de la cápside interna que se disponen en la periferia y la partícula de capa simple (SLP: Single-layered-particle) que solo muestra el *core* y que generalmente están agregados [5, 30] (Fig. 4).

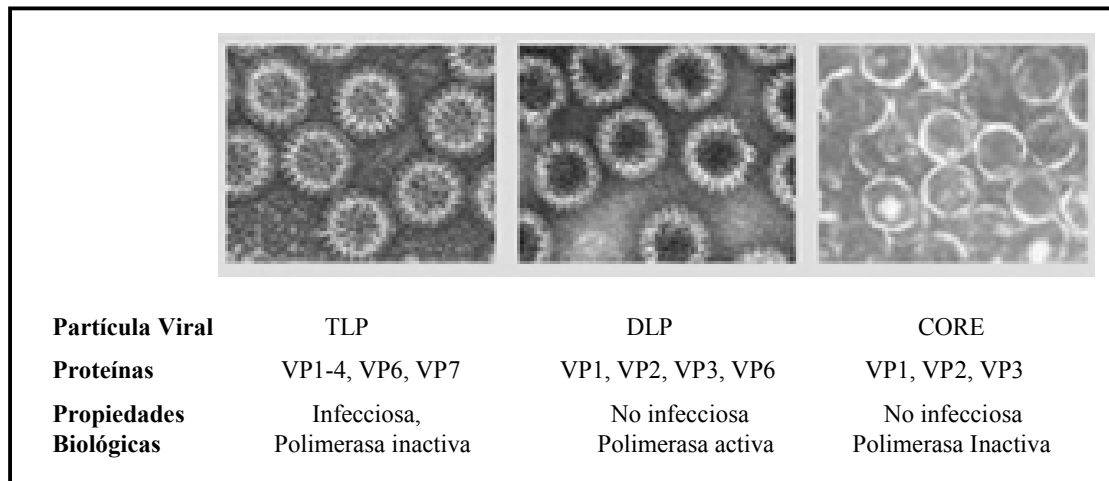


Fig. 4. Estructura y propiedades biológicas de las partículas de Rotavirus. Se observan al microscopio electrónico las tres morfologías características. Extraído de Estes, 2001 [30].

La capa interna (*core*) esta formada por la proteína VP2, la capa intermedia esta formada por la proteína VP6 y la capa externa por la proteína VP7. Desde la ultima capa se extienden 60 espículas de 11nm formadas por dímeros de la proteína VP4 rodeando los vértices de la estructura icosaédrica [5] (Fig. 5).

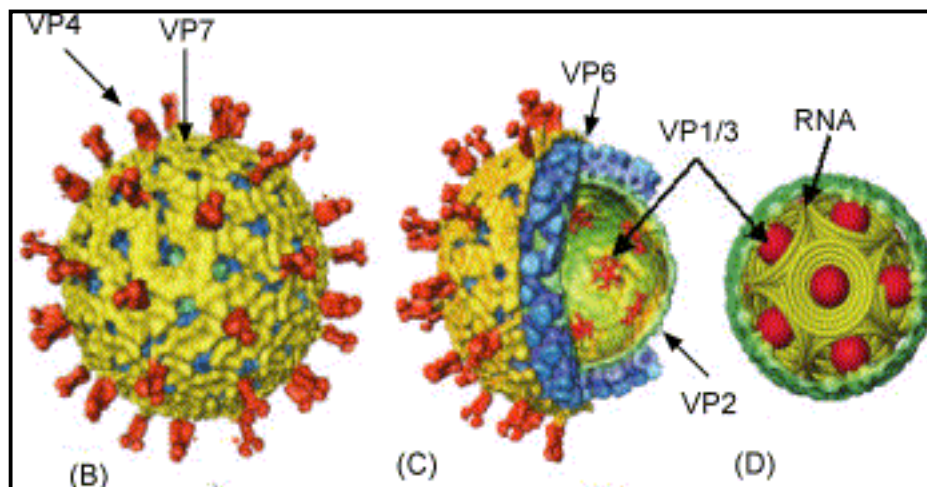


Fig. 5 Imágenes de Rotavirus obtenidas por criomicroscopía electrónica. Se aprecian la espículas (VP4 en rojo), la triple cápside proteica (VP7 en amarillo, VP6 en celeste y VP2 en verde) Extraído de Jayaram et al., 2004 [31].

El genoma contiene aproximadamente 18,5 kilo pares de bases (kpb) en 11 segmentos de ARN doble hebra cada uno de los cuáles codifica para una proteína a excepción del segmento 11 que presenta dos marcos abiertos de lectura solapados y por lo tanto puede codificar para dos proteínas.

En cada segmento de ARN se pueden identificar tres regiones, la región no codificante (UTR: untranslated region) 5', la región no codificante 3' y el marco de lectura abierto (ORF: Open Reading Frame) (Fig. 6).

Las longitudes de las regiones no codificantes pueden variar de segmento a segmento, pero todos contienen una secuencia consenso común en el extremo 5' y otra en el extremo 3' cuyas funciones aún no están del todo dilucidadas pero se cree que están implicadas en los mecanismos de transcripción, replicación, regulación y encapsidación de dichos genes. Los 11 genes de Rotavirus carecen de señal poliA, son ricos en A + U y cada hebra de ARNm positiva comienza con una 5'guanidina [5]. En total el genoma codifica para 12 proteínas, seis estructurales (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP7) y seis no estructurales (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5, NSP6) [5, 32]. Las proteínas estructurales son encontradas dentro de las partículas virales y las no estructurales las encontramos dentro de la célula infectada [5].

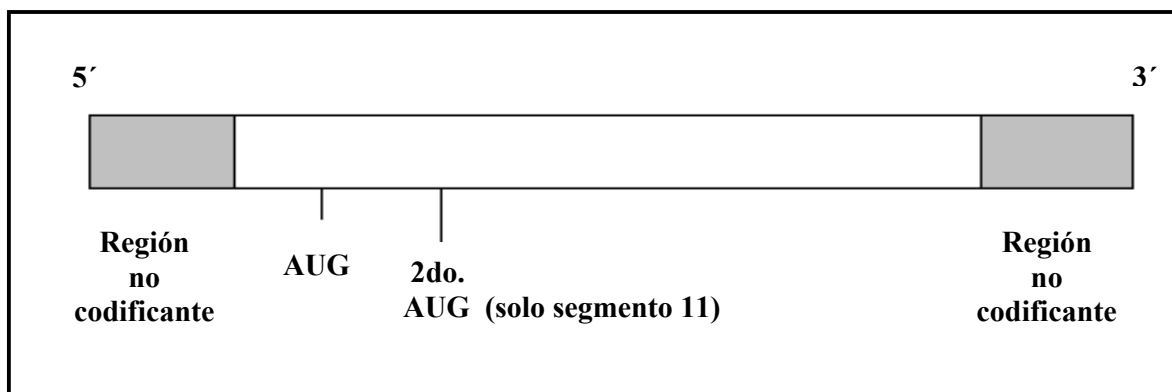


Fig. 6. Estructura general de los genes de Rotavirus. Adaptado de Estes, M. and Kapikian, A., 2007 [5].

Los Rotavirus se clasifican en serogrupos, subgrupos y serotipos según sus características serológicas. Se conocen 7 serogrupos diferentes según los epítopes presentes en la proteína VP6, a cada uno de los cuáles se les asigna una letra A-G. Los grupos A, B y C han sido aislados tanto en animales como en humanos y los grupos D, E, F y G solo se han aislado en animales [5]. Los Rotavirus pertenecientes al Grupo A son los más frecuentes tanto en humanos como en varias especies animales. Dentro del grupo A de Rotavirus encontramos subgrupos I, II, I + II y no-I no-II de acuerdo a la presencia o ausencia de distintos epítopes inmunorreactivos frente a determinados anticuerpos monoclonales contra VP6 [33].

Además Rotavirus es el único agente conocido de mamíferos o aves que contiene 11 segmentos de ARN doble hebra y los mismos pueden ser separados por electroforesis en geles de poliácridamida (PAGE), que revela un patrón de migración diferencial de los 11 segmentos.

Este perfil diferencial de bandas se denomina electroferotipo (E-tipo) y está organizado en cuatro grupos (Fig. 7 (A)). Para Rotavirus del grupo A en el primer grupo de bandas encontramos los segmentos 1 al 4, en el siguiente encontramos los segmentos 5 y 6, el tercer grupo tiene 3 segmentos (7, 8 y 9) y por último encontramos los dos segmentos mas cortos (10 y 11). Estos dos últimos segmentos a su vez pueden presentar dos patrones diferentes de migración que determinan electroferotipos largos y cortos. Sin embargo, ambos electroferotipos también pueden exhibir diferencias en la migración de otros segmentos [5, 32, 34]. Debido a éste patrón diferencial de migración de los segmentos genómicos, ésta técnica se convierte en una buena herramienta de diagnostico molecular rápido para este virus (Fig. 7 (B)).

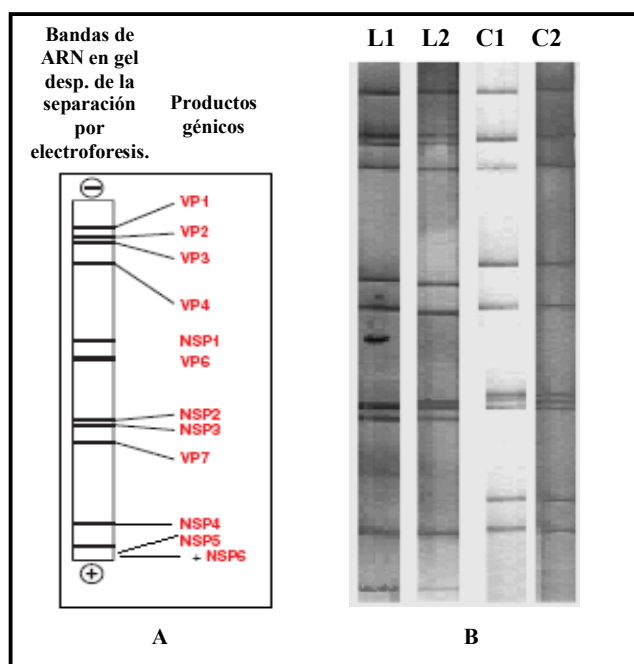


Fig. 7 Genoma de Rotavirus y sus productos génicos. A) El diagrama muestra el patrón típico de los segmentos de ARN de Rotavirus en un gel después de una separación electroforética y las proteínas codificadas por cada segmento. Adaptado de Carter, J., 2007 [35]. B) Se aprecian electroferotipos de Rotavirus grupo A: corto (C1 y C2) y largo (L1 y L2). Gentileza del curso de Virología General de la Facultad de Ciencias.

Los Rotavirus del grupo A pueden clasificarse en base a las proteínas externas de la cápside VP7 y VP4 que en ensayos de neutralización han demostrado ser altamente reactivas frente a anticuerpos neutralizantes de la infección. Esta variabilidad antigénica se refleja en una variabilidad genética asociada a un mecanismo de evasión a la respuesta inmune del huésped. Por este motivo a la fecha se conocen más de 20 genotipos distintos de VP7 denominados G-tipos debido a que es una glicoproteína y más de 30 genotipos distintos para VP4 denominados P-tipos haciendo referencia a su sensibilidad a proteasas. Los estudios epidemiológicos de Rotavirus se orientan hacia la genotipificación de estas dos proteínas con el fin de determinar cuáles son los G-tipos y P-tipos predominantes lo que se convierte en una clasificación binomial del virus, al mismo tiempo que permite conocer su evolución en el tiempo [36].

1.4 Proteínas virales

Complejo VP1-VP2-VP3

El complejo proteico formado por VP1, VP2 y VP3 conforman el *core* del virus y poseen afinidad por el ARN. Estas son las proteínas de mayor tamaño y se encuentran hacia el interior del virión. La cápside interna (VP2) está asociada con el genoma y con 12 copias de VP1 y VP3 que son enzimas [35]. VP1 presenta reconocimiento secuencia-específico al ARN y hay estudios *in vitro* que demuestran que presenta actividad replicasa por lo que es la polimerasa viral que sintetiza la doble cadena de ARN a partir del ARNm y se ha demostrado que requiere de VP2 para llevar a cabo dicha actividad [37]. Mientras que VP3 presenta actividad guaniltransferasa y metiltransferasa y es la que incorpora el CAP al ARNm. Hay una copia de VP1 y VP3 asociadas a la capa interna en cada uno de los 12 vértices del icosaedro [34, 35]. (Fig. 5.). VP2 es la proteína que conforma la capa interna y se ha demostrado que es la única capaz de auto ensamblarse cuando se expresa en células de insectos [38], lo que sugiere que VP2 podría ser quien dirige el ensamblaje de la demás proteínas virales. A su vez, nunca se ha encontrado ARN doble hebra libre en la célula infectada por lo que se cree que la transcripción ocurre dentro del *core* del virus [34].

Proteína VP6

Esta proteína conforma la capa intermedia de la triple cápside y constituye el 51% de todas las proteínas del virión. Si bien se generan muchos anticuerpos durante la respuesta inmune del huésped, dirigidos contra ésta proteína y por eso son blanco de muchos ensayos de detección del virus, los anticuerpos anti-VP6 no son neutralizantes [5, 36, 39].

Ésta proteína se dispone en rearreglos triméricos y forma una estructura que también es icosaédrica. En sistemas recombinantes se ha visto que la incorporación de VP6 sobre la capa de VP2 conforman lo que denominamos *Virus Like Particles* (VLPs) con una mayor homogeneidad morfológica y gran estabilidad, lo que sugiere que VP6 juega un rol muy importante en la integridad estructural de la cápside [5].

Ésta proteína interacciona con VP2, VP7 y VP4 a través de secuencias aminoacídicas que se ha demostrado que son las más conservadas [40].

VP6 está relacionada con la actividad transcripcional de las partículas de doble cápside debido que solo éstas son transcripcionalmente activas, aunque su rol es meramente estructural ya que no se une al ácido nucleico [5, 41].

Proteínas no estructurales

Durante la infección las proteínas virales se localizan en una región del citoplasma denominada viroplasma, excepto VP7 y NSP4, que están en el Retículo Endoplasmático (RE), NSP1 y NSP3 que están en el citoplasma asociadas al citoesqueleto y VP4 en la superficie celular.

NSP1 es la proteína más variable dentro de las cepas de Rotavirus. Su estructura primaria revela una región conservada con motivos en dedos de Zinc y se demostró que se une preferencialmente al extremo 5' del ARNm viral. También se ha demostrado que NSP3 interacciona con el factor eIF4G1 que es un factor celular de inicio de la traducción por lo que su unión a este factor interfiere con la síntesis proteica celular y favorece la del virus [5].

La proteína NSP2 es oligomérica y tiene actividad NTPasa que se une preferentemente al ARN simple hebra e interacciona con la proteína NSP5. NSP5 junto con NSP6 son codificadas por el gen 11 que posee dos marcos de lectura. Se cree que estas proteínas están implicadas en la replicación viral ya que interactúan con NSP2 y el complejo VP1/VP2/VP3 [5]. Estas tres proteínas no estructurales conforman la estructura básica del viroplasma aunque se cree que NSP2 y NSP5 son suficientes para la formación del mismo [42, 43]. Por lo tanto jugarían un rol fundamental en la translocación de las partículas virales en formación desde el viroplasma hacia el RE.

NSP4 es una de las dos proteínas glicosiladas que presenta el virus y se localiza en el RE. Es una proteína transmembrana y su dominio citoplasmático interacciona con las partículas de doble capa mediante un reconocimiento con VP6 [5, 44]. También interacciona con VP4 y así media la gemación de las partículas de doble capa hacia el interior del RE donde adquieren de forma temporal una bícapa lipídica que luego pierden en su viaje dentro del RE al mismo tiempo que se ensamblan las proteínas de la capa externa por un mecanismo aún desconocido resultando en las partículas virales maduras con tres capas proteicas que serán liberadas al medio mediante lisis celular [5, 44].

La proteína NSP4 además como ya se mencionó anteriormente actúa como una enterotoxina que afecta los niveles de calcio intracelular generando un desbalance iónico que resulta en la generación de la diarrea y explica la acción patológica de la infección por Rotavirus y sus daños histopatológicos (Fig. 2) [5, 27].

Las proteínas VP4 y VP7

La superficie externa del virus está conformada por 780 copias de la proteína VP7 organizadas en trímeros y 60 dímeros de VP4 a modo de proyecciones. (Fig. 5)

La VP7 es la segunda proteína más abundante del virión constituyendo el 30% de la partícula viral con un peso molecular de aproximadamente 38 KDa, esta codificada por el noveno segmento. El ORF de 326 aa empieza con un codón de inicio con una secuencia Kozak débil y un segundo ORF con una secuencia consenso Kozak fuerte que se encuentra a 30 codones de distancia (M). A continuación encontramos regiones hidrofóbicas (H1 Y H2) y en algunas cepas se puede encontrar un tercer ORF después de H2 [5, 45]. Es traducida y glicosilada con oligosacáridos de manosa mientras se inserta en la membrana del RE, dirigida por una señal en su extremo amino terminal [46]. La maduración de la proteína requiere además la formación de puentes disulfuro intramoleculares [47] y de la presencia de iones calcio [48]. Al igual que VP4 posee motivos que son reconocidos por las integrinas por lo que participa en la adsorción del virus aunque en menor medida [49].

La glicoproteína VP7 es muy antigénica y se ha demostrado que induce la formación de anticuerpos neutralizantes. En su estructura genética distinguimos 9 regiones variables: VR1 – VR9, de las cuáles VR5, VR7, VR8 y VR9 se correlacionan con las regiones de los epítopes neutralizantes A, B, C y F respectivamente [5] (Fig. 8)

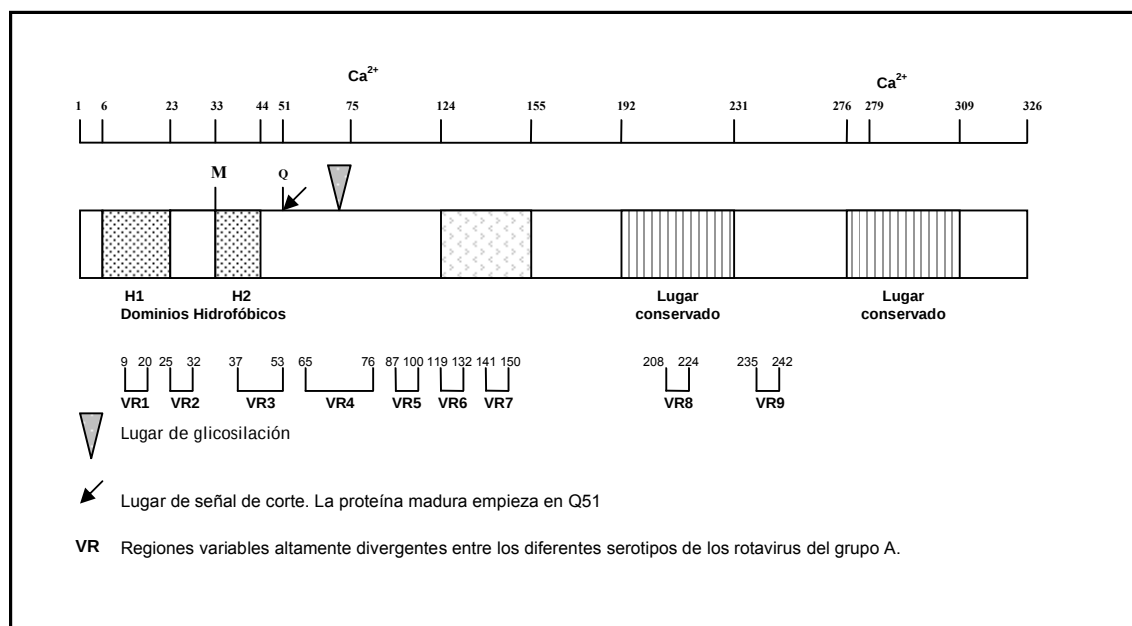


Fig. 8. Esquema de la estructura genética de VP7. Se observan los dominios hidrofóbicos H1 y H2, la señal de corte de las proteasas, sitios de unión al Ca²⁺, segundo marco abierto de lectura (M), lugar de glicosilación.

Adaptado de Estes, 2001 [50]

La proteína VP4 constituye un 1,5% de la masa del virión y está codificada por el segmento genómico 4 y no es glicosilada. Posee actividad hemaglutinina, porta epítopes neutralizantes específicos y participa activamente de la adsorción y penetración del virus a la célula [5, 40, 51].

En el curso de la infección VP4 es clivada por proteasas residentes del tracto intestinal (pancreatina y tripsina) dando lugar a dos proteínas estructurales VP8* (extremo amino terminal, aminoácidos 1-247) y VP5* (extremo carboxilo terminal aminoácidos 248-776), las cuales quedan asociadas al virión [5] (Fig. 9). Este clivaje aumenta la infectividad viral facilitando el proceso de ingreso al huésped y al parecer estabiliza el ensamblado de la espícula, confiriendo el orden adecuado a la estructura icosaédrica. De este modo la proteólisis se convierte en un paso fundamental en la eficiente internalización del virus en las células y cabe destacar que Rotavirus infecta enterocitos en el intestino delgado que es rico en proteasas [31].

Algunos trabajos han demostrado que la entrada de Rotavirus a la célula implica varias etapas que involucra receptores que contienen ácido siálico en los primeros pasos e integrinas en pasos post adhesión [52-55].

El análisis de las sub-unidades VP5* y VP8* han demostrado que VP8* es la que posee los sitios antigénicos que especifican para los serotipos, mientras que la porción restante de VP8* y VP5* contienen sitios responsables de la reactividad cruzada [56].

Anticuerpos llevados a cabo contra VP4, neutralizan el virus *in vitro* e inducen inmunidad protectora en ratones, cerdos y bovinos [57]

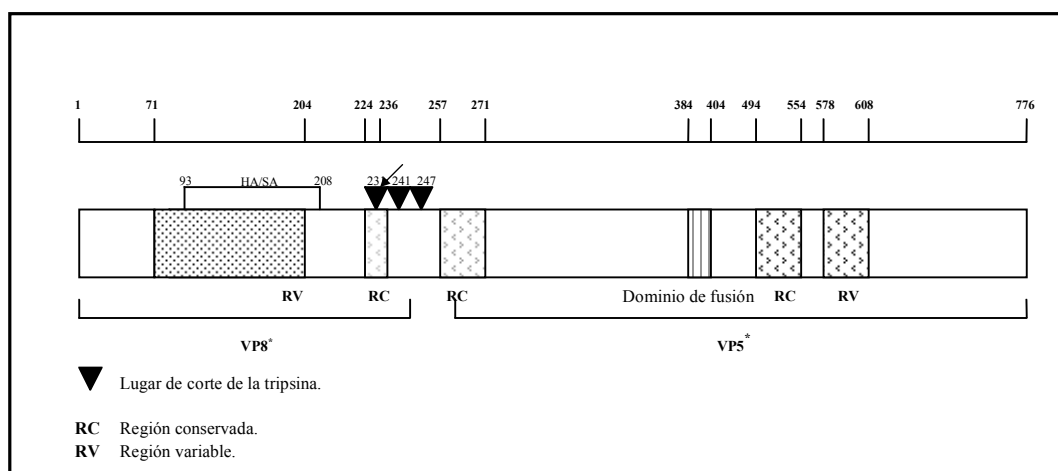


Fig. 9. Esquema de la estructura genética de VP4. Se observan los dominios neutralizantes, los dominios de hemaglutinación y de unión al ácido siálico (HA/SA). En el codón 394 se encuentra el epítipo neutralizante para anticuerpos monoclonales [58, 59]

Gracias a los análisis de la secuencia nucleotídica y aminoacídica se han podido identificar los lugares exactos del procesamiento proteolítico. Se reconocen tres regiones de corte de la tripsina (arginina 231, arginina 241, arginina 247) siendo las argininas 241 y 247 altamente conservadas en todas las cepas de Rotavirus al igual que la región comprendida entre los aminoácidos 284 al 401 [60]. La mayor variación se encuentra entre los aminoácidos 71 y 204 de la subunidad VP8* y los análisis de secuencia han correlacionado los P-tipos con los aminoácidos 84 y 180 [56, 61]. Al principio los serotipos de VP4 fueron descritos por su reactividad diferencial a Anticuerpos Monoclonales (AcMo) o suero hiperinmune. Pero la falta de reactivos suficientes para la inmensa diversidad descrita para ésta proteína obligó a que las nuevas variantes sean descritas en base a su secuencia nucleotídicas y aminoacídica. Por lo tanto existe en este sentido una denominación dual para esta proteína, los serotipos P son designados con letras y números y los genotipos P designados con números entre corchetes. Por ejemplo el genotipo P[8] puede pertenecer al serotipo P1A. Actualmente hay más de 30 genotipos descritos como ya se mencionó anteriormente [36, 41, 62, 63].

VP7 y VP4 interaccionan íntimamente en la superficie del virión y se ha observado que en Rotavirus reordenantes, la reactividad de VP4 contra AcMo está influenciada por la proteína VP7 que la acompañe [64].

La respuesta inmune, principalmente los 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. Sin embargo la generación de anticuerpos neutralizantes hacia VP4 es desde la primera infección una inmunidad mas heterotípica [65].

1.5 Epidemiología Molecular

Rotavirus al igual que otros virus ARN tiene una alta tasa de mutación nucleotídica lo que contribuye a la generación de la diversidad observada para los G y P tipos. Mucha de ésta diversidad esta asociada a una diferencia en la reactividad a distintos AcMo por lo tanto esta variación antigénica y por consiguiente genética, estaría relacionada a un mecanismo de evasión a la respuesta inmune del huésped [63]. Sin embargo hay otros eventos que también son responsables de la generación de diversidad de ambas proteínas como ser transmisión inter-especie, recombinación intragénica y reordenamiento. Este último mecanismo ha sido de vital relevancia ya que debido a que el genoma de Rotavirus es segmentado poseen la capacidad de reordenar genes provenientes de distintos parentales cuando infectan una misma célula, convirtiéndolo en el principal mecanismo de generación de diversidad, teniendo en cuenta además que las proteínas VP7 y VP4 están codificadas por segmentos diferentes (segmentos 9 y 4 respectivamente) lo que aumenta la cantidad de combinaciones posibles [62, 66]. A pesar de la potencialidad de éste gran número de combinaciones posibles para genotipos G y P, se han encontrado combinaciones de genes más frecuentes.

Para G tipos existe una correspondencia entre serotipo y genotipo, pero no ocurre lo mismo para los P tipos donde algunos genotipos no tienen un serotipo asociado (al momento 14 P serotipos se han descrito) [41, 63].

Durante los años ochenta y noventa los genotipos G1-G4 eran los principalmente identificados en los trabajos de epidemiología a nivel mundial [67]. Un estudio epidemiológico reciente describe la distribución global de los P y G tipos para 52 países con muestras que comprenden el período 1973 – 2003. En éste estudio las combinaciones de los tipos G1, G2, G3 y G4 con los tipos P[8] y P[4] son las más comunes, representando mas del 88% de las cepas en todo el mundo.[63] (Fig. 10)

En Sudamérica si bien las predominancias son similares al comportamiento global, en los últimos años se han detectado genotipos poco comunes como G5 en Brasil [68], G9 fue predominante en Argentina en los años 2005, 2006 [69] y también en éste país, el genotipo G12 fue detectado por primera vez en humanos fuera de Asia y Estados Unidos, combinadas con P[9] [69]. Otras revisiones realizadas en Sudamérica también describen como son los comportamientos de las predominancias año a año. Por ejemplo un estudio realizado en Paraguay con cepas que comprenden los años 2002 – 2005 revelan una predominancia de G4P[8] en el año 2002, seguida de G9P[8] y G1P[8] en los años siguientes [13]. En este estudio no se detecto G3 el cuál a juzgar por los resultados de varios estudios realizados en la región, ha sido paulatinamente desplazado,

por los genotipos emergentes. Otro estudio recientemente publicado con muestras de Argentina de los años 2006 y 2007 detectaron una predominancia de G9P[8] seguida de G2P[4] y una baja frecuencia de G4P[8], además de que detectaron cepas G4P[6] de origen porcino [70].

En nuestro país varias instancias de caracterización genética de Rotavirus han permitido observar como han sido las predominancias genotípicas en diferentes períodos [32, 71]. Uno de los estudios abarca cepas aisladas en el período 1996-1999 en el que se constata la presencia de G1 (64,7%), G2 (29,4%) y G4 (5,9%) pero no se detecta ningún G9 ni G5 que ya se encontraban circulando en la región en ese período. Además cabe destacar que en este estudio se describió una inserción aminoacídica en las muestras G4 [71]. Otro estudio epidemiológico se realizó con muestras aisladas en el período 2006 – 2007 donde se constató la circulación de G9 (70%) y de G2 (30%) [32]. Para VP4 no hay antecedentes de estudios epidemiológicos publicados para cepas aisladas pertenecientes a nuestro país.

En suma la tendencia del virus de ir variando sus predominancias genotípicas con el tiempo nos exige una continua vigilancia de las mismas cuando pensamos en el diseño de estrategias de prevención de la enfermedad.

El estudio epidemiológico de Rotavirus fue abordado al principio mediante ensayos de ELISA, que permiten determinar los serotipos, pero requiere una gran cantidad de reactivos específicos que no siempre están disponibles [72], por este motivo la serotipificación ha sido progresivamente sustituida por la genotipificación mediante RT-PCR y si fuera necesario se completa el estudio con secuenciación automática de los productos de PCR resultantes.

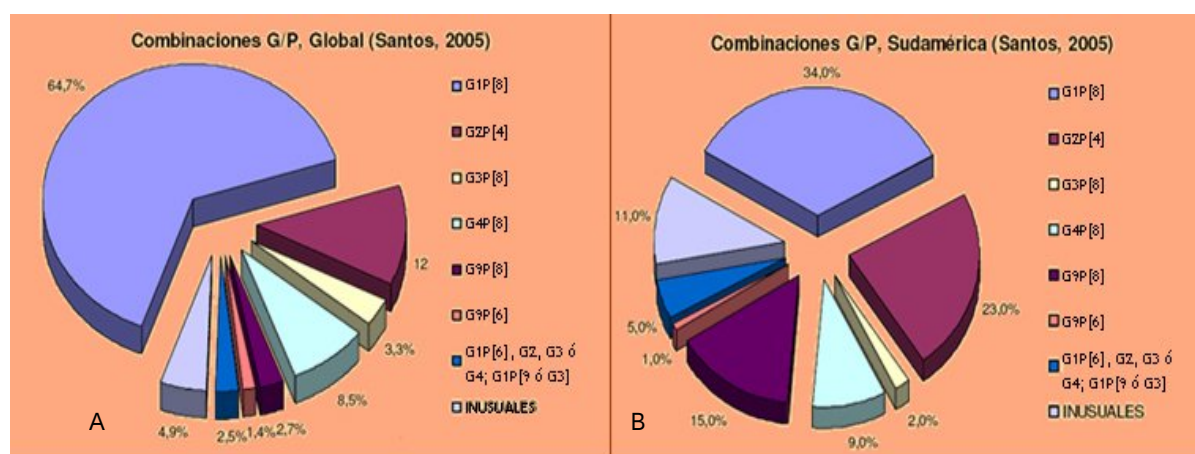


Fig. 10. Distribución porcentual de las combinaciones G/P observadas en cepas de Rotavirus Humano, entre 1973 y 2003 en los 5 continentes (A) y en Sudamérica (B). Adaptado de Santos, 2005 [63]

1.6 Vacunas

El desarrollo de una vacuna efectiva y segura que proteja contra la infección por Rotavirus es el principal objetivo como estrategia preventiva sobre todo en países subdesarrollados, considerando que el virus es muy resistente a los productos químicos y altas temperaturas [23, 73].

La exposición por primera vez al virus en un niño, produce una respuesta inmunológica específica a los antígenos de la cápside. Esta respuesta luego se amplía gracias a las siguientes exposiciones y protegerá contra mas serotipos [5]. VP7 y VP4 son las proteínas estructurales que definen el serotipo y son consideradas críticas para el desarrollo de una vacuna porque son el objetivo de anticuerpos neutralizantes tanto en protección serotipo-específica como de reacción cruzada [74].

La implementación de un programa de vacunación efectivo debe tener en cuenta la distribución geográfica de las cepas prevalentes y por eso la identificación de los G y P tipos mas comunes para evaluar su inclusión en las vacunas, es una prioridad. Incluso después de la introducción de una vacuna candidata, el monitoreo de las cepas circulantes permite detectar la presión que la vacuna pueda ejercer generando nuevas cepas de Rotavirus [75].

A lo largo de la elaboración de una vacuna contra Rotavirus, se han utilizado diversas estrategias para el desarrollo de la misma. El uso de Rotavirus atenuado en una vacuna oral puede ser logrado por diferentes caminos. El abordaje mas ampliamente utilizado implica la inmunización de niños con Rotavirus animal los cuáles son considerados naturalmente atenuados para humanos cuando se suministran por vía oral [76]. Recientemente fueron desarrollados y evaluados, Rotavirus humano atenuados por pasaje en cultivos celulares y mas reciente aún es la recuperación de Rotavirus de neonatos asintomáticos, los cuáles son naturalmente menos virulentos para el desarrollo de una vacuna oral candidata [75].

Las primeras vacunas evaluadas eran cepas no humanas atenuadas (G6P[1] y G6P[5]), con efectividad controversial sobre todo en Latinoamérica. Mas tarde se comienza a buscar el desarrollo de una vacuna a partir de un Rotavirus reordenante animal-humano que particularmente posea el gen de VP7 humano, de esta forma surge Rotashield de origen humano-mono Rhesus, tetravalente y que cubría G1, G2, G3 y G4 con P[8], sin embargo luego debió ser retirada del mercado por considerarse asociada al aumento de incidencia de intususcepción en niños vacunados en Estados Unidos [75].

Actualmente hay dos vacunas disponibles contra el virus, una monovalente y la otra multivalente. La primera fue desarrollada por GlaxoSmithKline llamada Rotarix®, lanzada al mercado en el año 2004. Esta basada en una cepa de Rotavirus humano de genotipo G1P[8], atenuada en cultivo celular [77]. El inconveniente que presenta es la eficacia en la protección hacia otras cepas como G2P[4], debido probablemente al grado de respuesta heterotípica generada. La segunda vacuna fue presentada en el año 2006 por Merk & Co. denominada Rotateq®, es una vacuna heptavalente reordenante humano-bovino que protege contra G1, G2, G3, G4, G6, P[6] y P[8] y se ha demostrado que su grado de protección puede alcanzar un 98%, sin estar relacionada con efectos adversos observados en intentos anteriores [75].

En nuestro país la vacunación contra Rotavirus no esta incluida en el esquema nacional de vacunación pero desde el año pasado está disponible Rotarix® para suministrarse de manera opcional y con costo. De todas formas es fundamental ampliar nuestros estudios epidemiológicos, para saber como ha sido la evolución del virus en nuestro país y cuáles son los genotipos mas dominantes, y así evaluar la efectividad de la vacuna circulante.

Si bien ambas vacunas han mostrado ser seguras y eficaces, no se ha podido demostrar cuán eficaces son con los G-tipos que en lo últimos años vienen aumentando su incidencia como por ejemplo G9 ni tampoco se ha podido probar su eficacia frente a otros que puedan surgir como por ejemplo G12. Justamente debido a este comportamiento que tiene el virus de ir variando sus predominancias genotípicas debido a su gran capacidad para generar diversidad y la presión que genera la propia respuesta inmune, es que es imprescindible mantener una conducta de vigilancia epidemiológica que nos permita orientar hacia donde debe estar dirigido el desarrollo de nuevas vacunas o la actualización de las que ya existen.

2. OBJETIVOS

2.1 Generales

El objetivo general del presente trabajo es la genotipificación de cepas de Rotavirus del Subgrupo A, circulantes en nuestro país en el año 2002, de modo de poder realizar la clasificación binomial de las mismas.

2.2 Específicos

- Extraer el ácido nucleico y detectar por electroforesis, 41 muestras de materia fecal de niños con dato clínico de diarrea aguda del Hospital Pereira Rossell durante el año 2002.
- Genotipificar la proteína VP7 por el método de Multiplex RT-PCR descrito por Gouvea y colaboradores, 1990 [78].
- Genotipificar mediante la optimización de la técnica de Multiplex RT-PCR para la proteína VP4, descrita por Gentsch y colaboradores, 1992 [79].
- Secuenciar algunas de las muestras amplificadas para cada una de las proteínas de modo de poder confirmar el genotipo obtenido mediante la técnica molecular.
- A partir de las muestras secuenciadas, compararlas con cepas de referencia y realizar su análisis filogenético.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Extracción de ARN viral

A partir de 41 muestras de materia fecal, colectadas de pacientes pediátricos del Hospital Pereira Rossell que se presentaron con dato clínico de diarrea aguda pertenecientes al año 2002 y conservadas a 20°C, se realizó la extracción del ARN con TRIzol® (Invitrogen, Inc.), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Se toman 0,2 gr de la muestra y se resuspenden en 1ml de buffer fosfato salino (PBS, pH 7,4). De la suspensión en buffer se toman 200 µl y se le agregan 500µl de TRIzol® más 100µl de cloroformo. Se centrifuga 15 minutos a 14.000 rpm y se recupera la fase acuosa donde se encuentra el ARN viral. Se le agregan 250 µl de isopropanol y se incuba 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se vuelve a centrifugar 10 minutos a 14.000 rpm para obtener el pellet. Se desecha la fase acuosa y se realiza un lavado con etanol 75%. Se resuspende el pellet conteniendo el ARN con 30 µl agua destilada estéril a 56°C.

3.2 Genotipificación de VP7 mediante *múltiplex* RT-PCR

El protocolo utilizado para la genotipificación esta basado en el propuesto por Gouvea y colaboradores [78]. Se toman 5 µl de la suspensión obtenida en la extracción conteniendo ARN doble hebra y se desnaturaliza a 97° C por 7 minutos junto con el par de oligonucleótidos Beg9-End9 (0,5 µl de cada uno) [78] (ver Tabla 1). Luego se realiza la RT-PCR “OneStep” utilizando la enzima Superscript II (100U/reacción) (Invitrogen Inc) y la polimerasa Taq Pol (1,25U/reacción) (Invitrogen Inc) con su Buffer Tris-HCL (20mM, pH 8.4), KCL (50mM) y MgCl₂ (1.5mM), de acuerdo a especificaciones del fabricante y dNTPs 0.1mM, y agua desionizada y estéril, alcanzando un volumen final de 50µl. Los detalles del ciclado son los siguientes: RT a 42° C por 60 minutos, inactivación a 94° C por 3 minutos, PCR: 30 ciclos de los cuáles cada uno comprende desnaturalización a 94° C por 1 minuto, hibridación a 50° C por 1 minuto y polimerización a 72°C por 2 minutos. Finalmente 7 minutos a 72° C.

A partir del producto de PCR obtenido de VP7 (1062pb) se llevó a cabo la *Múltiplex*-PCR con un grupo de oligonucleótidos internos para detectar los genotipos G1, G2, G3, G4, G5 y G9, con el primer consenso 9con1 [80] (Tabla 1 y Fig.11). El protocolo es el siguiente: en un volumen final de 50µl, se utilizó el enzima Taq Pol (1,25 unidades por reacción) (Invitrogen Inc), MgCl₂ (1.5mM), Buffer Tris-HCL (20mM, pH 8.4), KCL (50mM), los dNTPs (0.1mM), el grupo de oligonucleótidos 0.2mM cada uno y 2µl de una dilución 1:10 del producto de la primera Ronda de PCR. Ciclado: 3 minutos a 94° C, 30 ciclos de los cuáles cada uno comprende desnaturalización a 94° C por 1 minuto, hibridación a 42° C por 2 minuto y polimerización a 72° C por 1 minuto. Finalmente 7 minutos a 72° C.

En todas las experiencias se uso como control positivo una muestra perteneciente al CASMU del año 2008, del subgrupo A genotipo G9. Como control negativo se uso agua desionizada y estéril.

Tabla 1. Oligonucleótidos usados para genotipificar VP7 [69, 78, 80-82]

		Secuencia	Posición	Genotipo	Fragmento
Gen VP7	RA1 (Beg9)	5' GGC TTT AAA AGA GAG AAT TTC CGT CTG G 3'	1 - 28	1er. Round	1062 pb
	RA4 (End9)	5' GGT CAC ATC ATA CAA TTC TAA TCT AAG 3'	1062 - 1036		
	9con1	5' TAG CTC CTT TTA ATG TAT GG 3'	37 - 56	Consenso	
Pool Humanos Das	9T-1deg2	5' TYT WGT YAA RGC AAA TAA TG 3'	176 - 195	G1	158 pb c/ 9con1
	9T-2	5' GTT AGA AAT GAT TCT CCA CT 3'	262 - 281	G2	244 pb c/ 9con1
	9T-3	5' GTC CAG TTG CAG TGT AGT 3'	484 - 501	G3	466 pb c/ 9con1
	9T-4	5' GGG TCG ATG GAA AAT TCT 3'	423 - 440	G4	403 pb c/ 9con1
	9T-9B	5' TAT AAA GTC CAT TGC AC 3'	131 - 147	G9	110 pb c/ 9con1
Pool Animal	FT5	5' CAT GTA CTC GTT GTT ACG TC 3'	779 - 760	G5	723 pb c/ 9con1
	jrg226	5' TCG TCA TGC TGC CAT TTA 3'	173-190	G12	175 pb
	jrg227	5' GTC CAG TCG GGA TCA GTT 3'	327-344		
Nested VP7	RA2	5' GGA CCA AGA GAA AAC GTA GC 3'	805-824		257 pb c/ RA4

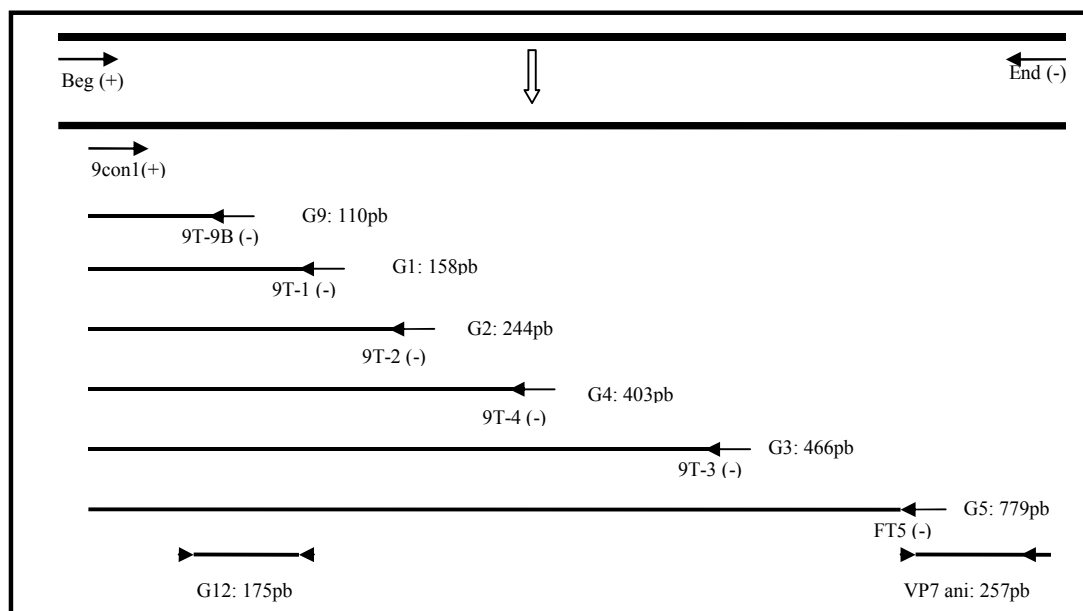


Fig.11. Oligonucleótidos para la amplificación y tipificación de VP7 mediante Multiplex RT-PCR y PCR anidada.

3.3 Tipificación de G12.

Aquellas muestras a las que no se les pudo asignar un G-tipo por ausencia de banda luego de la multiplex-RT PCR, fueron evaluadas para el genotipo G12 especialmente. Para ello se emplea un par de oligonucleótidos específicos: jrg226 y jrg227 (Fig. 11 y Tabla 1). Como molde de la PCR se usa el producto obtenido de la primera Ronda de PCR para VP7 de 1062 pb con Beg9 y End9. El protocolo usado es el mismo que la segunda Ronda de la Multiplex con un volumen final de 50µl [69].

3.4 Genotipificación de VP4 mediante *múltiplex* RT-PCR.

Se toman 5 µl de la suspensión obtenida en la extracción conteniendo ARN doble hebra y se desnaturaliza a 97°C por 7 minutos junto con el par de oligonucleótidos Con3dg y Con2dg (0,5 µl de cada uno) [79] (ver Tabla 2). Luego se realiza la RT-PCR “OneStep” utilizando la enzima Superscript II (100U/reacción) (Invitrogen Inc) y la polimerasa Taq Pol (1,25U/reacción) (Invitrogen Inc) con su Buffer Tris-HCL (20mM, pH 8.4), KCL (50mM) y MgCl₂ (1.5mM), de acuerdo a especificaciones del fabricante y dNTPs 0.1mM y agua desionizada y estéril, alcanzando un volumen final de 50µl. Los detalles del ciclado son los siguientes: RT a 42° C por 60 minutos, inactivación a 94° C por 3 minutos, PCR: 30 ciclos de los cuáles cada uno comprende desnaturalización a 94° C por 1 minuto, hibridación a 50° C por 1 minuto y polimerización a 72° C por 2 minutos. Finalmente 7 minutos a 72° C para la desactivación de la enzima.

A partir del producto de PCR obtenido de VP4 (876pb) se llevo a cabo la Múltiplex-PCR con un grupo de oligonucleótidos internos para detectar los P-tipos P[4], P[6], P[8], P[9] y P[10] [69, 79], con el oligonucleótido consenso Con3dg (Tabla 2 y Fig.12). El protocolo es el siguiente: en un volumen final de 50µl, se utilizó el enzima Taq Pol (1,25U/reacción) (Invitrogen Inc), MgCl₂ (1.5mM), Buffer Tris-HCL (20mM, pH 8.4), KCL (50mM), los dNTPs (0.1mM), oligonucleótidos 0.2mM cada uno y 2µl de una dilución 1:10 del producto de PCR de la primera Ronda. Ciclado: Idem a Multiplex de VP7.

Tabla 2. Oligonucleótidos usados para genotipificar VP4 [69, 79, 82, 83]

		Secuencia	Posición	Genotipo	Fragmento
Gen VP4	con2dg	5' ATT YCN GRC CAY TTA TAH CC 3'	868 - 887		
	con3dg	5' TGS YKW SBY TMA TTT ATA GAC A 3'	11 - 32		876 pb
Pool Humano	2T-1	5' CTA TTG TTA GAG GTT AGA GTC 3'	474 - 494	P4	483 pb c/ con3dg
	3T-1	5' TGT TGA TTA GTT GGA TTC AA 3'	259 - 278	P6	267 pb c/ con3dg
	4T-1	5' TGA GAC ATG CAA TTG GAC 3'	385 - 402	P9	391 pb c/ con3dg
	5T-1	5' ATC ATA GTT AGT AGT CGG 3'	575 - 594	P10	583 pb c/ con3dg
Pool Humano	jrg237	5' TCT ACT GGG TTA ACG TGC 3'	339 - 356	P8	345 pb c/ con3dg
Nested VP4	con1dg	5' YTR CCA CCM ATK CAR AAT AC 3'	686 -705		201 pb c/ con2dg

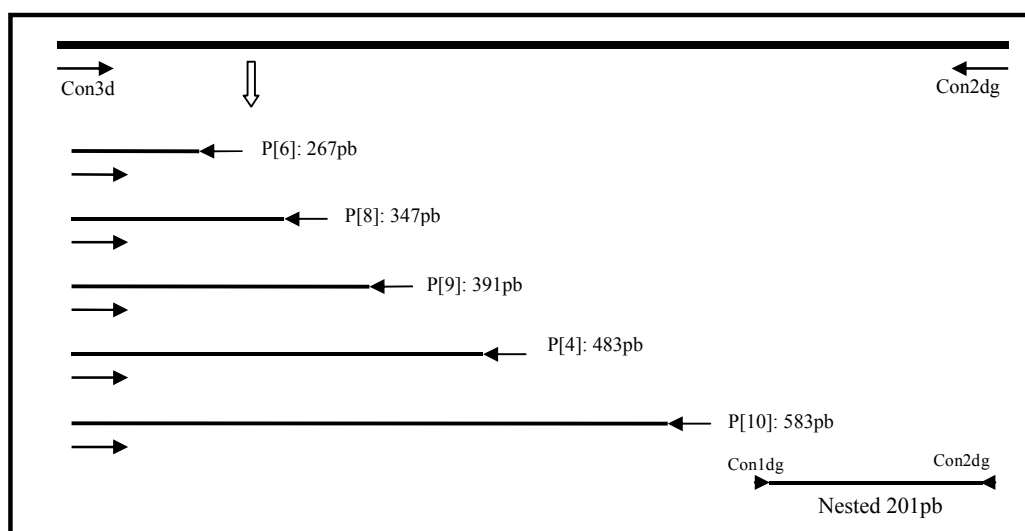


Fig.12. Oligonucleótidos para la amplificación y tipificación de VP4 mediante Multiplex RT-PCR y PCR anidada.

3.5 PCR anidada para VP7 y VP4

En los casos en los que no se pudo asignar genotipo G o P buscados, se realizó una PCR anidada con oligonucleótidos diseñados contra secuencias conservadas internas, a partir de la 1era. Ronda de amplificación de VP7 y/o VP4. De esta forma se pudo discriminar entre muestras G o P no tipificables (NT) cuando ésta PCR anidada es positiva y muestras no amplificables (NA) en los casos en que es negativa. Una vez mas el detalle del protocolo es idéntico al utilizado en la multiplex salvo que para VP7 se usa el par de oligonucleótidos RA2 junto con End9 [82] y en el caso de VP4 se emplea Con1dg [83] junto con Con2dg (ver Figs. 11 y 12 y Tablas 1 y 2).

3.6 Análisis de ácidos nucleicos mediante electroforésis

Con el fin de poder controlar la extracción del ARN se realiza un corrida electroforética en un gel de agarosa 1%. Se siembran 8µl de muestra con un buffer de corrida TBE (Tris-Borato-EDTA) y para su visualización se utiliza el agente intercalante Bromuro de Etidio. De esta forma las muestras positivas podrán ser detectadas de acuerdo al patrón característico del ARN de Rotavirus (ver sección 1.3).

Tanto los productos de amplificación de ambas Multiplex RT-PCR (para VP7 y para VP4) como de la genotipificación de G12 y de las PCR anidadas, fueron analizados en geles de agarosa al 1,5% en un buffer de corrida TBE 1X y visualizadas por tinción con Bromuro de Etidio.

3.7 Secuenciación de los productos de PCR

Del total de los productos de PCR obtenidos en ambas multiplex (VP7 y VP4) se seleccionaron aleatoriamente, 3 del gen VP7 y 3 del gen VP4 y fueron enviados a MacroGen Inc. (Korea) para su purificación y secuenciado automático.

3.8 Análisis de las secuencias

Las secuencias se editaron, analizaron y compararon con el programa BioEdit versión 7.0. y el estudio filogenético se llevo a cabo mediante la construcción de los árboles filogenéticos correspondientes con el programa MEGA 3.1 usando el método de Neighbor-Joining y el cálculo de distancias mediante el algoritmo de Kimura Dos Parámetros.

RESULTADOS

4.1 Extracción de ARN viral

Se realizó un estudio epidemiológico a partir de 41 muestras de materia fecal de niños del Hospital Pereira Rossell que se presentaron con dato clínico de gastroenterocolitis en el año 2002 y que fueron positivas para Rotavirus en el diagnóstico serológico. En una primera instancia se realizó diagnóstico molecular de las mismas a través de la extracción del ácido nucleico con Trizol® y el análisis de los productos de la extracción, en geles de agarosa 1%. De las 41 muestras solo 21 fueron positivas por electroferotipo (51,2%). En la Fig. 13 se pueden observar los perfiles electroforéticos de algunas muestras representativas.

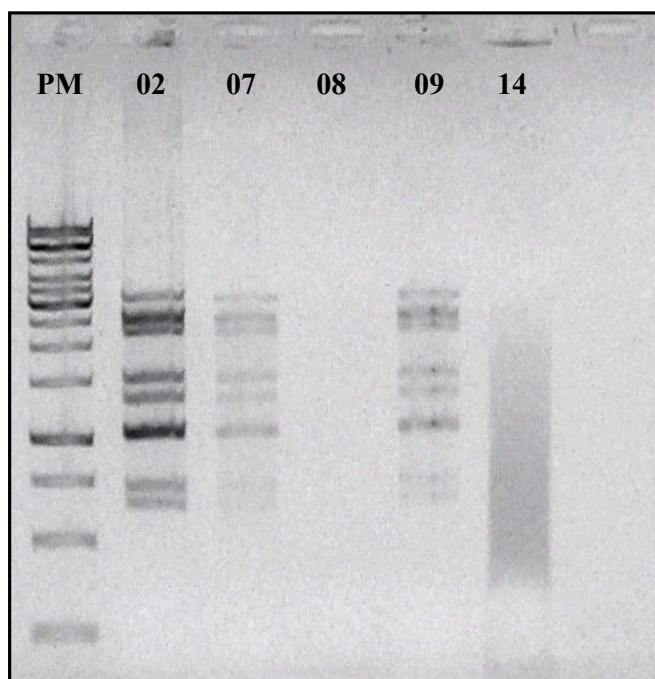


Fig. 13. *Perfiles de Rotavirus en agarosa.* Se pueden apreciar los grupos de migración característicos de Rotavirus que permiten la detección molecular. PM: Marcador de Peso Molecular de 1kb. Los números sobre cada carril corresponden a los números de muestras.

Debido al bajo porcentaje de muestras positivas por esta técnica y considerando que eran positivas por diagnóstico serológico se decidió continuar el estudio epidemiológico con el total de las muestras.

4.2 Genotipificación de VP7 y VP4

Como ya se mencionó en la sección anterior a pesar del bajo porcentaje de muestras positivas por electroforesis en agarosa, igual se realizó Multiplex RT-PCR para el total de las muestras tanto para VP7 como para VP4.

Con respecto a VP7 de la totalidad de las muestras, 32 fueron G-tipo G4 (78%), 1 muestra la número 60 fue G-tipo G1 (2,4%) y algunas dieron resultados contradictorios, por ejemplo 2 muestras (números 50 y 72) presentaron G-tipo mixto G1-G4 (4,8%) y ambas luego en la repetición del ensayo dieron G4, otra muestra, la número 88 también dió genotipo mixto G2-G4 y la misma también fue solo G4 en la confirmación. En la Fig. 14 se pueden observar algunas muestras representativas del total. En la Fig. 15 se observa la muestra 60 la cuál dió genotipo G1.

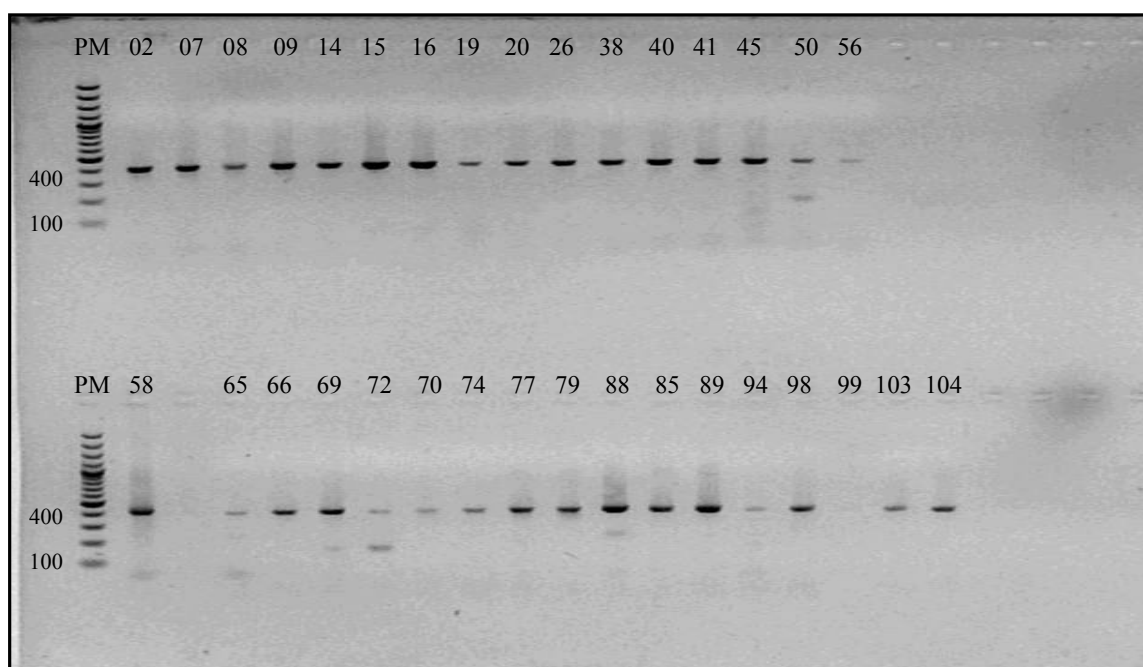


Fig. 14. Tipificación de VP7 mediante Multiplex RT-PCR. Las muestras se visualizan en gel de agarosa 1,5%. El primer carril tanto arriba como abajo corresponde al marcador de peso molecular (PM) y las bandas se visualizaron con Bromuro de etidio. Los números sobre cada carril corresponden al número de muestra. Se aprecian las muestras genotipo G4 y las que dieron resultados mixtos.

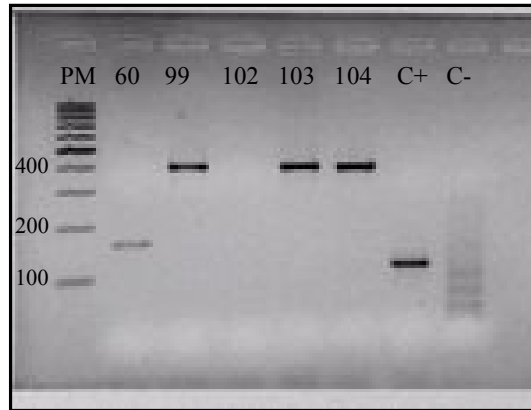


Fig. 15. Tipificación de VP7 mediante Multilex RT-PCR. Las muestras se visualizan en gel de agarosa 1,5%, en el que se puede apreciar la muestra 60 que es G-tipo G1 junto con otras de genotipo G4. El primer carril corresponde al marcador de peso molecular (PM), los números sobre cada carril corresponde al número de muestra, C+: control positivo genotipo G9. C-: Agua desionizada y estéril. Las bandas se visualizaron con Bromuro de etidio.

Del total de las muestras solo en 5 (35, 57, 76, 90, 102), no se pudo determinar su G-tipo. Con ellas se realizó una PCR anidada con un par de oligonucleótidos que amplifican específicamente una región conservada del gen de 275pb [82]. Los resultados del experimento nos permitió clasificar las muestras en no amplificable (NA) aquellas que no fueron amplificadas por esta experimento y en no tipificables aquellas que si presentaron banda. De las 5 muestras 3 fueron NT y 2 fueron NA (Fig. 16).

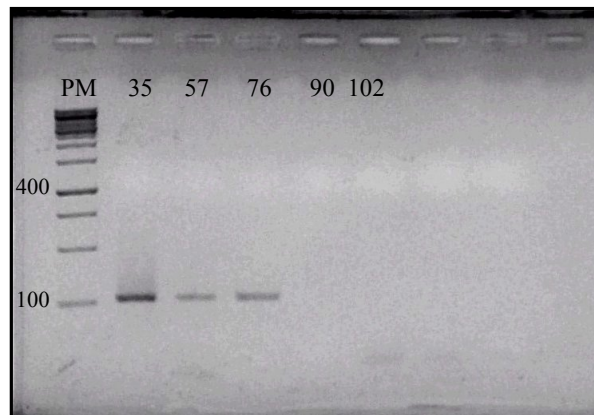


Fig. 16. Amplificación mediante PCR anidada del gen VP7. Se visualiza en gel de agarosa 1,5%. Las bandas son visualizadas con Bromuro de Etidio. PM: marcador de peso molecular. Los números sobre cada carril corresponden a los números de muestras. Se aprecian 3 muestras positivas que corresponden a las número 35, 57 y 76 respectivamente lo que permite clasificarlas como NT.

Con respecto a VP4 los resultados de los experimentos no fueron tan exitosos como para VP7, ya que del total de las muestras solo a 24 (58,5%) se les pudo asignar un P-tipo de los buscados que fue P[8] . No hubo ninguna muestra que presentara genotipo mixto para este gen. (Fig. 17)

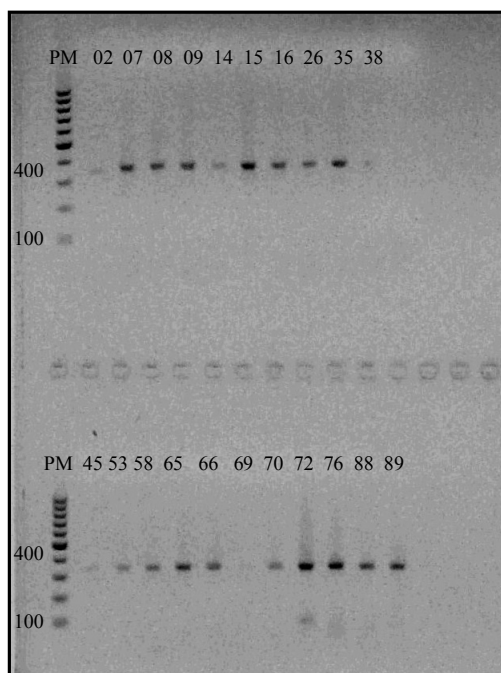


Fig. 17. Tipificación de VP4 mediante Multiplex RT-PCR. La corrida se realiza en gel de agarosa 1,5%. El primer carril tanto arriba como abajo corresponde al marcador de peso molecular (PM), los números en el resto de los carriles corresponden a los números de muestras. Las bandas se visualizaron con Bromuro de etidio.

Con las muestras que no presentaron P-tipo se realizó una PCR anidada con un par de oligonucleótidos específicos y que amplifican una región conservada del gen de 201pb [83]. De las 17 muestras solo 3 (las números 18, 41 y 56) fueron no tipificables (NT) y el resto fueron no amplificables (NA). (Fig 18)

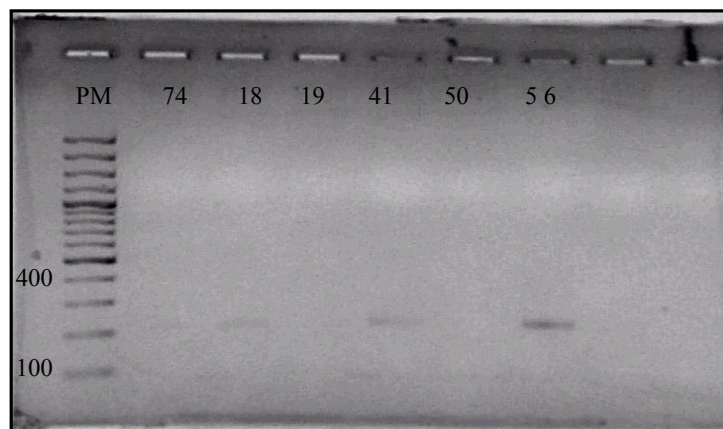


Fig. 18. Amplificación mediante PCR anidada del gen VP4. Se visualiza en gel de agarosa 1,5%. Las bandas son visualizadas con Bromuro de Etidio. PM: marcador de peso molecular. Los números sobre los demás carriles corresponden a los números de muestras. Se aprecian 3 muestras positivas en los carriles 2, 4 y 6, que corresponden a las muestras número 18, 41 y 56 respectivamente lo que permite clasificarlas como NT.

De las 41 muestras, 20 (48,7%) pudieron ser genotipificadas completamente (G-tipo y P-tipo) las cuales mostraron ser G4P[8]. Solo una muestra (la muestra 102) no fue amplificable para ninguna de las dos proteínas (2,4%). Una muestra fue G1 (2,4%), pero amplificó para el gen VP4.

En la Tabla 3 se resumen todos los resultados obtenidos.

Tabla 3. Resultados de la genotipificación G-tipo y P-tipo

Muestra	Electroferotipo	G-tipo	P-tipo
02	Negativo	G4	P8
07	Positivo	G4	P8
08	Positivo	G4	P8
09	Positivo	G4	P8
14	Positivo	G4	P8
15	Positivo	G4	P8
16	Positivo	G4	P8
18	Positivo	G4	NT
19	Negativo	G4	NA
20	Negativo	G4	NA
26	Positivo	G4	P8
35	Negativo	NT	P8
38	Negativo	G4	P8
40	Positivo	G4	P8
41	Negativo	G4	NT
45	Negativo	G4	P8
50	Negativo	G4*	NA
53	Negativo	G4	P8
56	Negativo	G4	NT
57	Positivo	NT	NA
58	Negativo	G4	P8
60	Negativo	G1	NA
65	Positivo	G4	P8
66	Positivo	G4	P8
69	Positivo	G4	P8
70	Negativo	G4	P8
72	Positivo	G4*	P8
74	Negativo	G4	NA
76	Positivo	NT	P8
77	Negativo	G4	NA
79	Negativo	G4	NA
85	Positivo	G4	NA
88	Positivo	G4**	P8
89	Positivo	G4	NA
90	Negativo	NA	P8
94	Positivo	G4	P8
98	Positivo	G4	P8
99	Positivo	G4	NA
102	Negativo	NA	NA
103	Negativo	G4	NA
104	Negativo	G4	NT

* Estas muestras fueron G4-G1 en una primera instancia y G4 en la repetición del ensayo.

** Esta muestra fue G4-G2 en una primera instancia y G4 en la repetición del ensayo.

4.3 Análisis filogenético de VP7

A partir de las secuencias de 3 muestras de genotipo G4 (muestras 18, 72 y 104), se realizó el análisis filogenético. Para eso se seleccionaron secuencias de referencia del subgrupo A y genotipo G4, disponibles en la base de datos GenBank. Las tres secuencias aisladas en este trabajo muestran estar íntimamente relacionadas formando parte del mismo agrupamiento (Fig. 19).

Los tres aislamientos a su vez forman parte de un cluster mayor dentro del cuál se encuentran más estrechamente relacionadas secuencias paraguayas y uruguayas aisladas en años anteriores (1998-1999).

Cabe destacar que las secuencias AF480279 y AF480280 pertenecen a la primera caracterización genotípica publicada en nuestro país y en las que se observó una inserción de una Asn en la región variable VR4 en la posición aminoacídica 76 y también se observa tanto en las secuencias paraguayas como en las del presente trabajo [71]. Ver Tabla 4. Al momento para G4 se han descrito dos linajes I y II y dentro del linaje I, 4 sublinajes: a, b, c, d. De acuerdo a los resultados del presente estudio filogenético podemos inferir que nuestras secuencias pertenecen al sublinaje Ic [71, 84, 85]. Por otro lado dentro de este cluster pero mas alejadas encontramos cepas japonesas de aislamientos que comprenden el mismo período de las muestras de nuestro trabajo, que también presentan la inserción y pertenecen al sublinaje Ic [86]. Finalmente dentro del mismo cluster tenemos cepas aisladas en Rusia de años mas recientes.

Tabla 4. Se aprecia la región VR4 con la inserción de una Asn en la posición 76

CEPAS ^a	VR4												
	65											b	77
AF480279		T	A	Y	A	N	S	T	Q	D	N	N	F
AF480280		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DQ015684		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DQ015686		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
72/2002		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
104/2002		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
18/2002		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
EF694169		.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	—	.
AF254139		.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	—	.

^a Se muestra un fragmento de la región VR4 de cepas aisladas de referencia y de las de nuestro trabajo.

^b Se observa la inserción de una Asn en la posición 76.

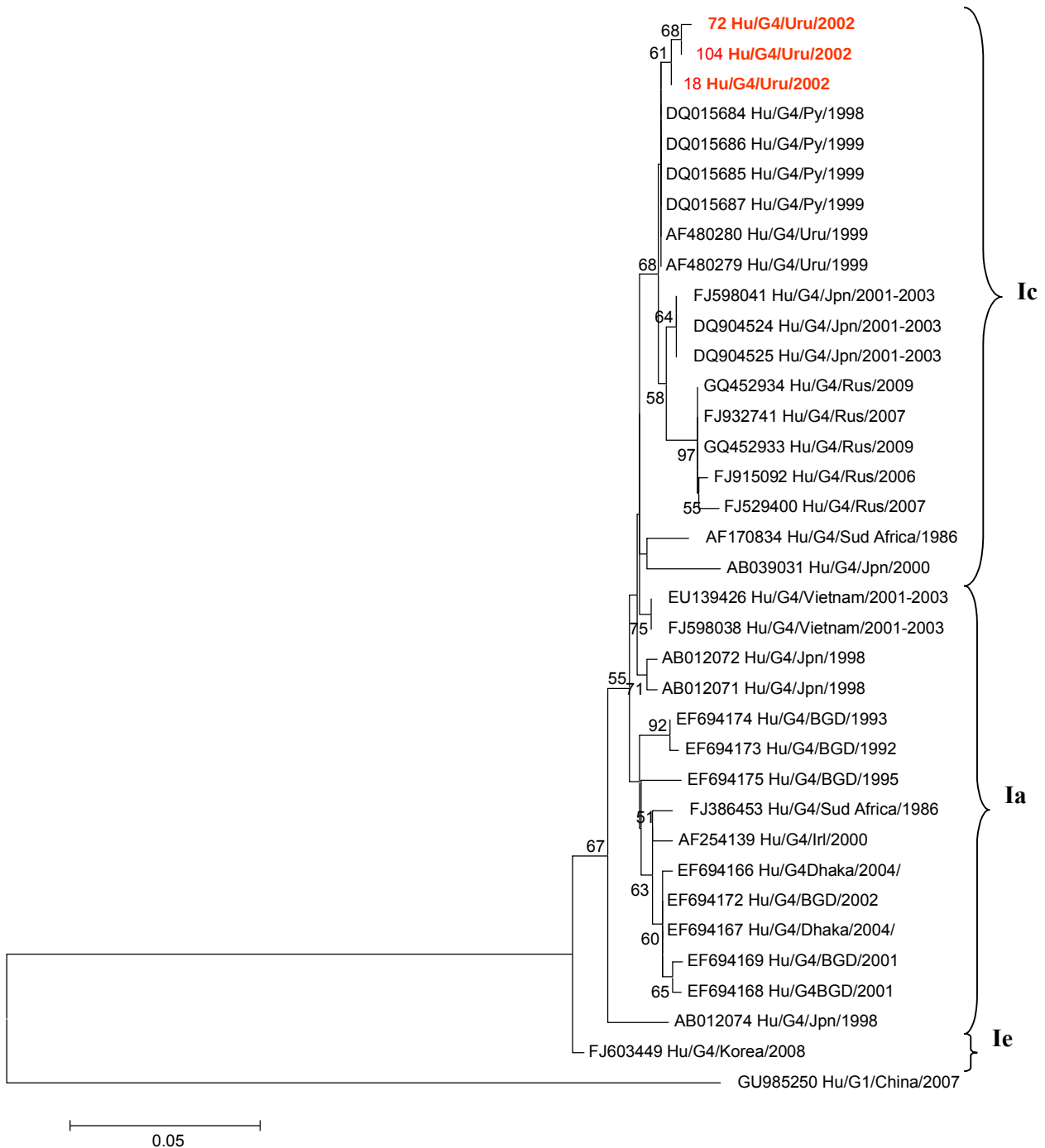


Fig 19. Análisis filogenético de las secuencias VP7 genotipo G4. El árbol fue construido usando el método de Neighbor-Joining y el cálculo de distancias mediante el algoritmo de Kimura dos Parámetros. El soporte estadístico se realizó mediante 500 réplicas de Bootstrap, se indican los valores superiores a 50. Las secuencias de este trabajo se indican en rojo. La cepa usada como Grupo Externo pertenece a un aislamiento de China genotipo G1. Se observan las cepas aisladas que corresponden al linaje Ic agrupadas en el mismo cluster.

4.4 Análisis filogenético de VP4

En la Fig. 20 se observan el árbol filogenético construido con la secuencia del fragmento de muestras genotipo P[8] obtenidas en este trabajo y secuencias de referencia disponibles en la base de datos GenBank. Nuestras secuencias conforman un grupo que a su vez forma parte de un agrupamiento mayor donde se puede apreciar la íntima relación que poseen con las cepas paraguayas aisladas en años anteriores y que pertenecen al mismo grupo de aislamientos que también muestran mayor grado de homología para la proteína VP7. También comparten alto grado de homología con una cepa de Rusia perteneciente a un aislamiento del año 2009 y una cepa de Irán de la misma fecha.

A la fecha se han descrito 4 linajes filogenéticos para P[8]: 1, 2, 3, 4 [87]. De acuerdo a los estudios publicados para las secuencias de referencia y a los resultados obtenidos en nuestro análisis filogenético, podemos inferir que nuestras secuencias pertenecen al genotipo P[8], linaje 3.

A nivel nucleotídico pudimos observar que las secuencias de las muestras 72 y 15 son idénticas entre sí, mientras que se observa una diferencia en un nucleótido en la muestra 40, que no altera la secuencia aminoacídica (dato no mostrado).

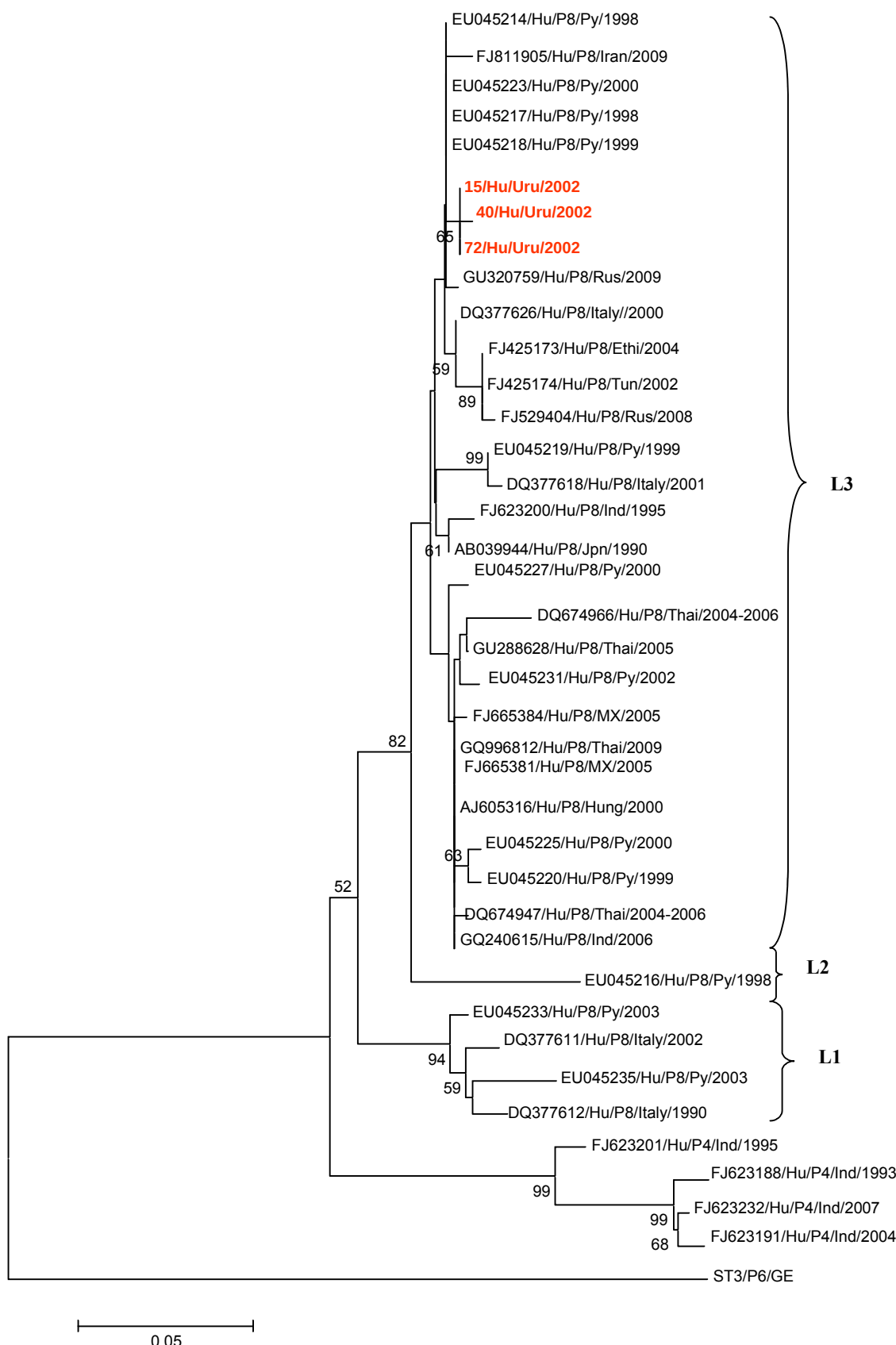


Fig 20 Análisis filogenético de las secuencias VP4 genotipo P8. El árbol fue construido usando el método de Neighbor-Joining y el cálculo de distancias mediante el algoritmo de Kimura dos Parámetros. El soporte estadístico se realizó mediante 1000 réplicas de Bootstrap, se indican los valores superiores a 50. Las secuencias de este trabajo se indican en rojo. Para el estudio se eligió como Grupo Externo la cepa de referencia ST3 genotipo P6 y 4 cepas de referencia genotipo P4.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se analizaron 41 muestras clínicas provenientes del Hospital Pereira Rossell pertenecientes al año 2002 y que eran positivas de acuerdo al diagnóstico serológico. Del total de las muestras solo 21 pudieron ser confirmadas mediante electroforesis (51,2%), por migración de los segmentos genómicos. Por lo tanto la técnica no resultó eficiente para el diagnóstico molecular del virus (de todas maneras éste no formaba parte de los objetivos del presente trabajo). Si quisiéramos incluir diagnóstico molecular lo más acertado sería analizar las extracciones de ARN en geles de poliacrilamida que presentan mayor sensibilidad frente a la agarosa. Además hay que tener en cuenta que en geles de poliacrilamida se carga un volumen mayor de la muestra analizada y este es un factor que deberíamos considerar si quisiéramos ajustar el protocolo de agarosa para optimizar los resultados. Igualmente en la práctica algunas muestras de las que fueron negativas en agarosa fueron analizadas en poliacrilamida donde resultaron positivas (dato no mostrado), lo que deja en evidencia la ventaja que la misma presenta si quisiéramos realizar diagnóstico molecular. Cabe destacar que los patrones electroforéticos que se pudieron observar mostraron todos un electroferotipo largo típico en cepas G4P[8].

A lo largo de la enorme cantidad de trabajos que se han realizado en todo el mundo para caracterizar Rotavirus, se ha podido constatar una y otra vez la constancia que presenta este virus en cuanto a su comportamiento evolutivo. Al día de hoy cuando hacemos un estudio epidemiológico, se espera encontrar una predominancia genotípica, una prevalencia estacional de la misma y una correlación aproximada con los datos que se obtengan de lugares vecinos o incluso del resto del mundo. El virus ha sabido ir sorteando las distintas presiones que ejerce el sistema inmune ya sea de forma natural o por la estrategia de vacunación, valiéndose de sus fieles mecanismos de generación de diversidad. Es por eso que la genotipificación mediante Multiplex RT-PCR se ha vuelto una herramienta muy poderosa en cuanto nos ha permitido seguir los pasos de la evolución de nuestro virus. Rotavirus tiene una alta predisposición a formar reordenantes nuevos debido a que permite la ocurrencia de infecciones mixtas y gracias a la naturaleza de su genoma segmentado en el cuál cada segmento puede segregarse de forma independiente. Por lo tanto al estar VP7 y VP4 codificadas por segmentos diferentes se explica la gran diversidad observada. Sumado a esto Rotavirus es un virus ARN y como todos los virus ARN tienen una alta tasa de mutación alimentando en cada ciclo viral la diversidad genética. Estas mutaciones puntuales se van acumulando en determinadas regiones de ambos genes que justamente son las que están implicadas en la genotipificación. Por este motivo la genotipificación mediante Multiplex RT-PCR exige una continua vigilancia de ambas proteínas ya que con determinado grado de divergencia se puede perder la efectividad de los oligonucleótidos usados, con la consecuente imposibilidad de caracterizar la cepa o de obtener un genotipo erróneo.

Se podría pensar que esta es la principal limitación de la técnica y debe ser muy tenida en cuenta para poder dilucidar resultados contradictorios e incluso cuando las muestras no puedan ser tipificadas para algunas de las dos proteínas. Esta técnica es ampliamente usada para ambos genes y en nuestro laboratorio se ha venido realizando exitosamente para caracterizar el gen VP7.

La idea general de nuestro trabajo era genotipificar un grupo de muestras y en particular poner a punto la técnica para la caracterización de VP4. Para abordar nuestro trabajo elegimos un grupo de oligonucleótidos que han sido usados por varios autores y que han demostrado ser eficientes en la genotipificación de la mayoría de los genotipos más predominantes para ambas proteínas. [32, 34, 69, 79, 80, 88].

De nuestros resultados podemos apreciar que la técnica nos permitió caracterizar la mayoría de las muestras con respecto a la proteína VP7. Si bien algunas muestras parecían presentar más de un genotipo lo que nos llevo a pensar en infecciones mixtas en la primera experiencia (muestras 50 y 72 G1-G4 y 88 G2-G4), las tres fueron genotipo G4 en una segunda experiencia y además la muestra 72 fue confirmada también como G4 mediante secuenciación. Este resultado contradictorio puede deberse a que suponiendo que la infección mixta exista, la cepa que esta en menor titulo viral (la que no es predominante) no siempre podrá ser amplificada en cada experiencia justamente por falta de material genético. Otra explicación es la efectividad de los oligonucleótidos usados y su eventual reconocimiento inespecífico y por lo tanto la amplificación al azar de un segmento que no corresponde a ningún genotipo.

La predominancia de G4 es congruente con los datos publicados en la región para el mismo año, lo que pone en evidencia el comportamiento que el virus demuestra en cuanto a las prevalencias genotípicas de forma estacional. Una publicación de un estudio realizado en Argentina detectó un pico de incidencia de G4 (84,6%) en el año 2001 y en el mismo estudio para el año 2002 detectaron una predominancia de G1 (68,7%). Aunque en nuestro trabajo solo una muestra mostró ser G1 (la número 60), el número de muestras utilizadas en el mismo puede no ser suficiente como para determinar la verdadera proporción de G1 en la población, sesgando nuestros resultados [13, 69]. Consideramos que con un numero mayor de muestras probablemente este porcentaje de G1 puede aumentar considerando que ha sido siempre el genotipo más predominante en todo el mundo y el que mas variantes (linaje y sublinajes) presenta. Esta es otra posible explicación a resultados contradictorios G4-G1, por lo que tal vez deberíamos evaluar en más detalle el oligonucleótido de G1 que estamos usando y revisar la bibliografía para corroborar si hay algún grupo de trabajo que haya detectado una disminución o no de su efectividad.

Cabe destacar que no tuvimos ningún genotipo G2 ni G9, que posteriormente son descritos en nuestro país. Otra vez puede ser debido al bajo número de muestras analizadas o simplemente a que no circulaban aún en nuestra población en ese período [32]. Al carecer de información de fecha exacta o historia clínica no se pueden hacer mayores conclusiones.

A lo largo de nuestro trabajo pudimos empezar a trabajar en una técnica que nos permite genotipificar VP4. Sin embargo, nuestros resultados de los experimentos de la Multiplex RT-PCR para VP4 no fueron tan exitosos como el gen VP7, ya que del total de las muestras solo un poco más de la mitad pudieron ser caracterizadas (24 de 41, 58,5%). Una vez mas la diversidad genética en el sitio de unión de los oligonucleótidos podría ser una de las razones del fracaso para genotipificar las muestras. Todas las muestras que se pudieron genotipificar fueron genotipo P8, lo que es congruente ya que las mayoría de los G-tipo fueron G4. No obtuvimos ningún P-tipo P4 por ejemplo, pero tampoco tuvimos G2 que es con quien se encuentra asociado habitualmente.

Existen otras razones que pueden interferir con la genotipificación, como ser la concentración del producto de PCR obtenido en la primera Ronda y las temperaturas de hibridación usadas, aunque estas últimas fueron descartadas ya que fueron evaluadas cuidadosamente en el diseño del protocolo [89].

Otros factores que pueden impedir la G o P tipificación es la presencia de inhibidores de PCR que no son eliminados por la técnica de extracción con TRizol. Una estrategia para revertir estos resultados sería utilizar otra técnica de extracción de ARN como por ejemplo el método de columna de sílica descrito por Boom y colaboradores, 1990 [90].

En suma las dificultades en la correcta caracterización de cepas de Rotavirus mediante estrategias de Multiplex RT-PCR, se deben principalmente a la acumulación de mutaciones puntuales en los genes de VP7 y VP4 generando diversificación de los linajes específicos [89]. Sin embargo esta es la técnica molecular más rápida y efectiva de la que disponemos para genotipificar Rotavirus y los resultados de nuestro trabajo nos indican que debemos continuar en la búsqueda de la optimización de la técnica para el gen VP4.

El análisis filogenético de VP7 nos ubica a nuestras secuencias en un grupo junto con secuencias de la región como ser las paraguayas y las uruguayas pertenecientes a años anteriores a las nuestras. Todas las secuencias de este grupo muestran ser idénticas a nivel nucleotídico en el fragmento estudiado. Este grupo a su vez forma parte de un grupo mayor donde se relacionan

estrechamente con las asiáticas, dentro de las cuáles las japonesas pertenecen al mismo período que nuestras secuencias.

Si observamos el árbol se aprecia que las secuencias quedan a grandes rasgos divididas de forma tal que parece estar ligado a la presencia o ausencia de la inserción de una Asn en la posición 76 que fuera descrita en nuestro país en muestras del año 1999 [71]. Todas las secuencias que forman parte del mismo agrupamiento en el cuál están las nuestras presentan la inserción y no así todas las secuencias que forman parte del grupo más alejado. Considerando estos resultados podemos suponer que en nuestro país el genotipo G4 portador de la inserción pudo dispersarse hasta volverse predominante al menos en el año 2002.

El análisis filogenético de VP4 nos vuelve a ubicar nuestras secuencias formando un grupo estrechamente relacionadas con las paraguayas que pertenecen a años anteriores al de nuestro estudio. Sin embargo para este gen a diferencia de para VP7, se aprecia una estrecha relación con cepas de Rusia y de Irán del año pasado, aunque formando parte de un grupo mas heterogéneo que el de VP7. A grandes rasgos el árbol revela mayor diversidad entre las diferentes secuencias usadas para el análisis, esto refleja la gran divergencia que se presenta entre las diferentes cepas P8.

Finalmente es destacable que en el análisis filogenético tanto para VP7 como para VP4, nuestras secuencias se encuentran emparentadas estrechamente con las secuencias paraguayas las cuáles pertenecen a las mismas cepas tanto para VP7 como para VP4 por lo que son congruentes nuestros resultados de parentesco.

En conclusión, pudimos avanzar en la búsqueda de la puesta a punto de una técnica de RT-PCR que nos permita genotipificar cepas de Rotavirus para ambos genes (VP7 y VP4). A partir de la genotipificación avanzamos en el camino del estudio evolutivo del virus y su comportamiento a lo largo de los años en nuestro país. La técnica es rápida y confiable y a partir de ella podemos optimizar el protocolo por ejemplo para genotipificar ambas proteínas a la vez, como objetivo a futuro. Pudimos constatar predominancia de un genotipo (G4) que anteriormente había sido descrito en menor proporción [32, 71]. Se aportaron los primeros datos de genotipificación de VP4 para cepas de nuestro país, constatando la presencia del genotipo P8. Pudimos una vez más gracias al análisis filogenético comprobar la dispersión que una cepa determinada puede sufrir, distribuyéndose de ésta forma, por toda la región e incluso en todo el mundo.

Nuestro trabajo aporta información valiosa para un trabajo mayor que es el estudio evolutivo del virus en nuestro país, un camino que ya hemos empezado a recorrer.

BIBLIOGRAFÍA

1. Parashar, U.D., et al., *Rotavirus and severe childhood diarrhea*. Emerg Infect Dis, 2006. **12**(2): p. 304-6.
2. Bern, C., et al., *The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: a ten-year update*. Bull World Health Organ, 1992. **70**(6): p. 705-14.
3. Knipe, D.M.H., Peter M., *Fields Virology*. 5th ed. Vol. 53. 2007. 1918-1974.
4. Parashar, U.D., et al., *Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children*. Emerg Infect Dis, 2003. **9**(5): p. 565-72.
5. Estes, M.K. and A.Z. Kapikian, *Rotaviruses*. 5th. ed. Fields Virology. Vol. 53. 2007. 1918-1974.
6. Bresee, J.S., et al., *Rotavirus in Asia: the value of surveillance for informing decisions about the introduction of new vaccines*. J Infect Dis, 2005. **192 Suppl 1**: p. S1-5.
7. Glass, R.I., et al., *Rotavirus vaccines: targeting the developing world*. J Infect Dis, 2005. **192 Suppl 1**: p. S160-6.
8. Delfino M., B.M., Sandin D., Le Pera V., Viera C., Alvez M., Pascale G., Pérez Ma.C. , *Infección intrahospitalaria por rotavirus en salas generales de pediatría del Centro Hospitalario Pereira Rossell*. Arch Pediatr Urug, 2006. **77** ((4)): p. 349-354.
9. 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.
10. Kapikian, A.Z., *Viral gastroenteritis*. JAMA, 1993. **269**(5): p. 627-30.
11. Bereciartu, A., K. Bok, and J. Gomez, *Identification of viral agents causing gastroenteritis among children in Buenos Aires, Argentina*. J Clin Virol, 2002. **25**(2): p. 197-203.
12. Anderson, E.J. and S.G. Weber, *Rotavirus infection in adults*. Lancet Infect Dis, 2004. **4**(2): p. 91-9.
13. 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.
14. Nakajima, H., et al., *Winter seasonality and rotavirus diarrhoea in adults*. Lancet, 2001. **357**(9272): p. 1950.
15. Caceres, D.P., D.; Sierra, N.; Estrada, E.; Sánchez, L., *La carga de la enfermedad por rotavirus en niños menores de 5 años, Colombia, 2004*. Rev Panam Salud Pública, 2006. **20** (1): p. 9-2.
16. Glass, R.I., et al., *Rotavirus and rotavirus vaccines*. Adv Exp Med Biol, 2006. **582**: p. 45-54.
17. Grinstein, S., et al., *Epidemiology of rotavirus infection and gastroenteritis in prospectively monitored Argentine families with young children*. Am J Epidemiol, 1989. **130**(2): p. 300-8.
18. Brandt, C.D., et al., *Rotavirus gastroenteritis and weather*. J Clin Microbiol, 1982. **16**(3): p. 478-82.
19. Bryce, J., et al., *WHO estimates of the causes of death in children*. Lancet, 2005. **365**(9465): p. 1147-52.
20. Jarvis, W.R., P.J. Middleton, and E.W. Gelfand, *Significance of viral infections in severe combined immunodeficiency disease*. Pediatr Infect Dis, 1983. **2**(3): p. 187-92.
21. Pickering, L.K., Bartlett AV, Reves RR, et al., *Asymptomatic excretion of rotavirus before and after rotavirus diarrhea in children in day care centers*. J Pediatr, 1988. **112**: p. 361-365.
22. Castello, A. (2006) *Aspectos Epidemiológicos de los rotavirus Humanos Sit. Global y Local*. Merck Sharp & Dohme
23. Estes, M.K., et al., *Rotavirus stability and inactivation*. J Gen Virol, 1979. **43**(2): p. 403-9.
24. Abad, F.X., R.M. Pinto, and A. Bosch, *Survival of enteric viruses on environmental fomites*. Appl Environ Microbiol, 1994. **60**(10): p. 3704-10.
25. Gouvea, V., N. Santos, and C. Timenetsky Mdo, *Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR*. J Clin Microbiol, 1994. **32**(5): p. 1338-40.

26. Das, M., et al., *Both surface proteins (VP4 and VP7) of an asymptomatic neonatal rotavirus strain (I321) have high levels of sequence identity with the homologous proteins of a serotype 10 bovine rotavirus*. Virology, 1993. **194**(1): p. 374-9.
27. Greenberg, H.B., H.F. Clark, and P.A. Offit, *Rotavirus pathology and pathophysiology*. Curr Top Microbiol Immunol, 1994. **185**: p. 255-83.
28. Strauss, J. and E. Strauss, *Viruses and Human Disease*. 2008. **Chapter 5**: p. 193-210.
29. Kapikian, A.Z., et al., *Reoviruslike agent in stools: association with infantile diarrhea and development of serologic tests*. Science, 1974. **185**(156): p. 1049-53.
30. Estes, M.K., et al., *Pathogenesis of rotavirus gastroenteritis*. Novartis Found Symp, 2001. **238**: p. 82-96; discussion 96-100.
31. 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.
32. Alberti, A., *Estudios epidemiológico de la proteína VP7 de Rotavirus Humano circulantes en Uruguay*. Facultad de Ciencias, Udelar., ed. T.d.G.e.I.L.e. Bioquímica. 2008.
33. Greenberg, H.B., et al., *Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies directed at two surface proteins of rhesus rotavirus*. J Virol, 1983. **47**(2): p. 267-75.
34. Gabriel, P., *Caracterización molecular y variabilidad genética de cepas de Rotavirus aisladas en Paraguay, e identificación de poblaciones virales circulantes en el cono sur.*, in *Departamento de Biología Molecular*. 2006, Instituto de investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad nacional de Asunción, Paraguay.
35. John Carter, V.S., *Virology: Principles and Application*, ed. J.W.a.S. Ltd. 2007, England. 383.
36. Estes, M.K. and D.Y. Graham, *Rotavirus antigens*. Adv Exp Med Biol, 1985. **185**: p. 201-14.
37. Cohen, J., *Ribonucleic acid polymerase activity associated with purified calf rotavirus*. J Gen Virol, 1977. **36**(3): p. 395-402.
38. Labbe, M., et al., *Expression of rotavirus VP2 produces empty corelike particles*. J Virol, 1991. **65**(6): p. 2946-52.
39. Burns, J.W., et al., *Protective effect of rotavirus VP6-specific IgA monoclonal antibodies that lack neutralizing activity*. Science, 1996. **272**(5258): p. 104-7.
40. 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.
41. Esteban, L.E., et al., *Molecular epidemiology of group A rotavirus in Buenos Aires, Argentina 2004-2007: reemergence of G2P[4] and emergence of G9P[8] strains*. J Med Virol. 2010. **82**(6): p. 1083-93.
42. Eichwald, C., J.F. Rodriguez, and O.R. Burrone, *Characterization of rotavirus NSP2/NSP5 interactions and the dynamics of viroplasm formation*. J Gen Virol, 2004. **85**(Pt 3): p. 625-34.
43. 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.
44. Estes, M.K. and J. Cohen, *Rotavirus gene structure and function*. Microbiol Rev, 1989. **53**(4): p. 410-49.
45. Mattion, N.M., Cohen, J and Estes, M. , *The rotavirus proteins.*, in *Viral infections of the gastrointestinal tract.* , A. Kapikian, Editor. 1994: New York: Marcel Deker. p. 169-249.
46. Stirzaker, S.C., et al., *Processing of rotavirus glycoprotein VP7: implications for the retention of the protein in the endoplasmic reticulum*. J Cell Biol, 1987. **105**(6 Pt 2): p. 2897-903.
47. Svensson, L., et al., *Intracellular manipulation of disulfide bond formation in rotavirus proteins during assembly*. J Virol, 1994. **68**(8): p. 5204-15.
48. Gajardo, R., et al., *Two proline residues are essential in the calcium-binding activity of rotavirus VP7 outer capsid protein*. J Virol, 1997. **71**(3): p. 2211-6.

49. Ciarlet, M. and M.K. Estes, *Human and most animal rotavirus strains do not require the presence of sialic acid on the cell surface for efficient infectivity*. J Gen Virol, 1999. **80** (Pt 4): p. 943-8.
50. Estes, M., *Rotaviruses and their Replication*, ed. P.M.H. In D.M. Knipe, D.E. Griffin, R.A. Lamb, M.A. Martin, B. Rotzman, and S.E. Straus (ed), Fields Virology, 4ed, Vol. 2. Lippincott-Williams-Wilkins, Philadelphia, Pa. 2001.
51. Patton, J.T., *Structure and function of the rotavirus RNA-binding proteins*. J Gen Virol, 1995. **76** (Pt 11): p. 2633-44.
52. Arias, C.F., et al., *Early events of rotavirus infection: the search for the receptor(s)*. Novartis Found Symp, 2001. **238**: p. 47-60; discussion 60-3.
53. Mendez, E., et al., *Entry of rotaviruses is a multistep process*. Virology, 1999. **263**(2): p. 450-9.
54. Mendez, E., C.F. Arias, and S. Lopez, *Binding to sialic acids is not an essential step for the entry of animal rotaviruses to epithelial cells in culture*. J Virol, 1993. **67**(9): p. 5253-9.
55. Guerrero, C.A., et al., *Integrin alpha(v)beta(3) mediates rotavirus cell entry*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(26): p. 14644-9.
56. Larralde, G., et al., *Serotype-specific epitope(s) present on the VP8 subunit of rotavirus VP4 protein*. J Virol, 1991. **65**(6): p. 3213-8.
57. 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.
58. Mackow, E.R., et al., *The rhesus rotavirus gene encoding protein VP3: location of amino acids involved in homologous and heterologous rotavirus neutralization and identification of a putative fusion region*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(3): p. 645-9.
59. Taniguchi, K., et al., *Identification of cross-reactive and serotype 2-specific neutralization epitopes on VP3 of human rotavirus*. J Virol, 1988. **62**(7): p. 2421-6.
60. Arias, C.F., et al., *Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity*. J Virol, 1996. **70**(9): p. 5832-9.
61. Larralde, G. and M. Gorziglia, *Distribution of conserved and specific epitopes on the VP8 subunit of rotavirus VP4*. J Virol, 1992. **66**(12): p. 7438-43.
62. Desselberger, U., M. Iturriza-Gomara, and J.J. Gray, *Rotavirus epidemiology and surveillance*. Novartis Found Symp, 2001. **238**: p. 125-47; discussion 147-52.
63. 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.
64. Chen, D.Y., M.K. Estes, and R.F. Ramig, *Specific interactions between rotavirus outer capsid proteins VP4 and VP7 determine expression of a cross-reactive, neutralizing VP4-specific epitope*. J Virol, 1992. **66**(1): p. 432-9.
65. 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.
66. Ramig, R.F., *Rotaviruses. Introduction and overview*. Curr Top Microbiol Immunol, 1994. **185**: p. 1-7.
67. Gentsch, J.R., et al., *Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: implications for vaccine development*. J Infect Dis, 1996. **174** Suppl 1: p. S30-6.
68. 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.
69. 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.
70. Stupka, J.A., et al., *National Rotavirus Surveillance in Argentina: high incidence of G9P[8] strains and detection of G4P[6] strains with porcine characteristics*. Infect Genet Evol, 2009. **9**(6): p. 1225-31.

71. 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.
72. Coulson, B.S., *VP4 and VP7 typing using monoclonal antibodies*. Arch Virol Suppl, 1996. **12**: p. 113-8.
73. Estes, M. and A. Kapikian, *Rotavirus*, ed. t.E. Fields Virology. 2007. 1918-58.
74. Hoshino, Y. and A.Z. Kapikian, *Rotavirus serotypes: classification and importance in epidemiology, immunity, and vaccine development*. J Health Popul Nutr, 2000. **18**(1): p. 5-14.
75. Dennehy, P.H., *Rotavirus vaccines: an overview*. Clin Microbiol Rev, 2008. **21**(1): p. 198-208.
76. Hoshino, Y. and A.Z. Kapikian, *Rotavirus vaccine development for the prevention of severe diarrhea in infants and young children*. Trends Microbiol, 1994. **2**(7): p. 242-9.
77. Bernstein, D.I. and R.L. Ward, *Rotarix: development of a live attenuated monovalent human rotavirus vaccine*. Pediatr Ann, 2006. **35**(1): p. 38-43.
78. 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.
79. Gentsch, J.R., et al., *Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction*. J Clin Microbiol, 1992. **30**(6): p. 1365-73.
80. Das, B.K., et al., *Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India*. J Clin Microbiol, 1994. **32**(7): p. 1820-2.
81. Gouvea, V., N. Santos, and C. Timenetsky Mdo, *VP4 typing of bovine and porcine group A rotaviruses by PCR*. J Clin Microbiol, 1994b. **32**(5): p. 1333-7.
82. Gouvea, V., *PCR detection of rotavirus*. In *Diagnostic Molecular Microbiology, Principles and Applications*. , ed. S. Persing, Tenover and White, eds. Washington DC, ASM press. 1993.
83. Abbaszadegan, M., P. Stewart, and M. LeChevallier, *A strategy for detection of viruses in groundwater by PCR*. Appl Environ Microbiol, 1999. **65**(2): p. 444-9.
84. Bok, K., D.O. Matson, and J.A. Gomez, *Genetic variation of capsid protein VP7 in genotype g4 human rotavirus strains: simultaneous emergence and spread of different lineages in Argentina*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(6): p. 2016-22.
85. Parra, G.I., et al., *Molecular characterization and genetic variation of the VP7 gene of human rotaviruses isolated in Paraguay*. J Med Virol, 2005. **77**(4): p. 579-86.
86. Trinh, Q.D., et al., *Sequence analysis of the VP7 gene of human rotaviruses G2 and G4 isolated in Japan, China, Thailand, and Vietnam during 2001–2003*. Journal of Medical Virology. **82**(5): p. 878-885.
87. Espinola, E.E., et al., *Sequence and phylogenetic analysis of the VP4 gene of human rotaviruses isolated in Paraguay*. Arch Virol, 2008. **153**(6): p. 1067-73.
88. Gouvea, V., N. Santos, and C. Timenetsky Mdo, *Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR*. J Clin Microbiol, 1994a. **32**(5): p. 1338-40.
89. Espinola, E.E., et al., *Genetic diversity of the VP4 and VP7 genes affects the genotyping of rotaviruses: analysis of Paraguayan strains*. Infect Genet Evol, 2008. **8**(1): p. 94-9.
90. Boom, R., et al., *Rapid and simple method for purification of nucleic acids*. J Clin Microbiol, 1990. **28**(3): p. 495-503.

Abreviaturas

aa	Aminoácidos
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfato
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ácido etileno-diamina-tetraacético
eIF4G1	Factor celular implicado en el inicio de la traducción
μl	Micro litros
M	Molar
mM	Mili Molar
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RT	Transcripción Reversa
RE	Retículo Endoplasmático
PBS	Buffer fosfato salino
PM	Peso Molecular
ORF	Marco abierto de lectura
rpm	Revoluciones por minuto
TBE	Tris-Borato-EDTA