

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**“PROTEÍNA NSP4 DE ROTAVIRUS COMO FACTOR DE
PATOGENESIS”**

POR

MC. GUADALUPE GONZÁLEZ OCHOA

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA**

MAYO 2013

**“PROTEÍNA NSP4 DE ROTAVIRUS COMO FACTOR DE
PATOGÉNESIS”**

COMITÉ DE TESIS

Dr. Juan Francisco Contreras Cordero
Director

Dra. Norma Laura Heredia Rojas
Secretaria

Dra. Licet Villareal Treviño
Vocal

Dr. Carlos Hernández Luna
Vocal

Dr. José Santos García Alvarado
Vocal

AGRADECIMIENTOS

A mi Dios por estar conmigo a cada instante por rodearme de personas buenas, por permitirme la dicha de tener una hermosa familia y ayudarme a conseguir una meta profesional más.

A mi querido esposo José Manuel Velarde Cantú por ser mi complemento y por apoyarme en cada etapa de mi vida.

A mi querida familia, mis padres José Antonio González León y Guadalupe Ochoa Félix, a mis hermanos José Antonio y Erika Cecilia, gracias por estar conmigo siempre sin importar las circunstancias.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León y a la Facultad de Ciencias Biológicas por permitirme ser parte del programa de posgrado de la misma facultad y por proporcionar los espacios necesarios para la realización del presente trabajo.

Al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante el programa doctoral.

Quiero presentar mi agradecimiento a mi asesor y director de tesis Dr. Juan Francisco Contreras Cordero, por proporcionar el apoyo y la orientación necesaria para el desarrollo del presente proyecto doctoral.

Agradezco el apoyo del Departamento de Inmunología y Microbiología de nuestra facultad, especialmente a la Unidad de Virología y a las unidades de Inmunobiología y Acarreadores de Drogas y Formulación de Biológicos. En especial a la Dra. Patricia Tamez Guerra y al Dr. Ricardo Gómez Flores por la disponibilidad y el apoyo de siempre.

Así mismo, expreso mi agradecimiento a mi comité de tesis, conformado por la Dra. Norma Laura Heredia, la Dra. Licet Villareal Treviño, el Dr. Carlos Hernández Luna y el Dr. Santos García Alvarado por las valiosas sugerencias durante el desarrollo del presente trabajo.

A mis compañeros de generación y a mis amigas por compartir sus experiencias y por la empatía que hacía de nuestras conversaciones momentos agradables. En especial a Karina Zapata y Enriqueta Monrreal, siempre las he de recordar con mucho cariño.

A mis amigos y compañeros de profesión, en especial a mi maestra QB. Rosa Amelia Vázquez Curiel, al MI. Luis Manuel Lozano Cota, al Dr. Adolfo Virgen Ortiz y al MI. Jesús Ramón Fox Sánchez. Gracias por el apoyo y sus palabras de aliento.

DEDICATORIA

*A mi hermosa familia,
en especial a mis hijos, Karen Gabriela
y José Manuel porque son mi razón de ser,
todo es por ellos y para ellos.*

LUGAR DE TRABAJO

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Juan Francisco Contreras Cordero.

CONTENIDO

Sección	Página
LISTA DE TABLAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE GRAFICOS.....	xi
NOMENCLATURA.....	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. HIPÓTESIS.....	4
3.OBJETIVOS.....	5
4. ANTECEDENTES.....	6
4.1 Generalidades.....	6
4.2 Estructura de la partícula viral.....	7
4.3 Clasificación.....	10
4.4 Ciclo replicativo de rotavirus.....	12
4.4.1 Interacción y entrada del virus a las células.....	12

4.4.2 Producción de progenie viral.....	15
4.5 Patogénesis de Rotavirus.....	19
4.6 Proteína NSP4	24
5.0 MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
5.1 Muestras niños hospitalizados y severidad de la gastroenteritis	33
5.2 Cepa Wa de rotavirus	33
5.3 Purificación del RNA viral.....	34
5.4 RT-PCR (Transcriptasa reversa)	35
5.5 Genotipificación de NSP4	36
5.6 Clonación del gen NSP4.....	37
5.7 Secuencias.....	39
5.8 Células	39
5.9 Expresión de NSP4 en células MA104	40
5.10 Análisis de la proteína NSP4 por inmunotransferencia.....	41
5.11 Silenciamiento del gen NSP4 de Rotavirus Wa.....	43
5.12 Determinación de efecto citopático.....	45
5.13 Microtitulación de virus por tinción de focos infeccioso con inmunoperoxidasa.....	45
6. RESULTADOS	47
6.1. Cepas de rotavirus de campo asociadas a gastroenteritis severa.....	47
6.1.1 Detección de casos de gastroenteritis por rotavirus.....	47
6.1.2 Análisis de la severidad de la gastroenteritis por rotavirus.....	47
6.1.3. Genotipificación de NSP4 en cepas de rotavirus aisladas de campo.....	50

6.1.4. Análisis de secuencia del gen NSP4	50
6.2. Expresión de NSP4 de cepas de rotavirus asociadas a diversos grados de severidad de gastroenteritis.	62
6.3 Silenciamiento de la expresión de NSP4 durante infección por rotavirus en células MA104.	66
6.3.1 Efecto citopático en células MA104 por infección con rotavirus.....	66
6.3.2 Silenciamiento de NSP4 en células MA104 infectadas con rotavirus.....	66
7. DISCUSIÓN	72
8. CONCLUSIÓN.....	78
9. LITERATURA CITADA	79
ANEXOS	99

LISTA DE TABLAS

Tabla No.	Pág.
1. Clasificación de rotavirus en base a los 11 segmentos de RNAdc que conforman su genoma.....	13
2. Descripción de los síntomas presentes en niños menores de cinco años hospitalizados con gastroenteritis por rotavirus.....	48
3. Análisis de la severidad de la gastroenteritis por rotavirus en niños menores de cinco años hospitalizados.....	51
4. Secuencia consenso de NSP4 y frecuencia de cada aminoácido en una posición determinada entre al aa 1 al 175.....	60
5. Análisis de secuencia de la proteína NSP4 en relación con la severidad de la gastroenteritis.....	61
6. Porcentaje de la inefectividad de rotavirus en células MA104 transfectadas con siRNA_54 o siRNA_329 y posteriormente infectadas con rotavirus Wa.....	69

LISTA DE FIGURAS

Fig. No.	Pág.
1. Representación esquemática de la estructura de rotavirus.....	9
2. Descripción esquemática del ciclo replicativo de rotavirus	20
3. Esquema representativo de la proteína NSP4 de rotavirus.....	26
4. Descripción esquemática de los dominios de la proteína NSP4.....	27
5. Esquema que representa la inducción de diarrea por rotavirus.....	32
6. Amplificación del gen de NSP4 por RT-PCR.....	52
7. Secuencias de nucleótidos del gen NSP4 en algunas cepas de rotavirus aisladas.....	54
8. Secuencias deducidas de aminoácidos de la proteína NSP4 de cepas de rotavirus aisladas.....	56
9. Análisis filogenético de las secuencias deducidas de aminoácidos de NSP4 reportadas en este estudio y algunas reportadas previamente en GenBank.	57
10. Caracterización de los plásmidos pcDNANSP4.....	62
11. Detección de la expresión de la proteína NSP4 mediante inmunotransferencia.....	63
12. Efecto celular de la expresión de NSP4 en células MA104.....	65
13. Efecto citopático de rotavirus en células MA104 infectadas con 0.03 UFF/célula.....	67
14. Expresión de NSP4 en células MA104 a diferentes tiempos postinfección con rotavirus Wa.....	68
15. Ensayos de titulación viral con inmunotinción con peroxidasa.....	70
16. Efecto celular observado 24 h después de silenciar la expresión de NSP4 durante un proceso de infección viral.....	71

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfica	Pág.
1 Análisis de los síntomas en rangos de edad en niños con gastroenteritis por rotavirus.....	49

NOMENCLATURA

aa	Aminoácidos
$[Ca^{2+}]_i$	Calcio intracelular
$^{\circ}C$	Grados Celsius
cDNA	DNA complementario
Cl^{-}	Cloro
dNTPs	Dinucleótido trifosfato
h	hora
Kb	Kilo bases
KDa	Kilo daltones
M	Concentración molar
Ab	Anticuerpos
mL	Mililitro
Na^{+}	Sodio
ng	Nanogramo
nm	Nanómetros
NSP	Proteína no estructural
pb	Pares de bases
PBS	Solución buffer fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RNA	Ácido ribonucleico
RNAdc	RNA de doble cadena
RNAcs	RNA de cadena sencilla
siRNA	RNA de interferencia pequeños
RNA _m	RNA mensajero
RT	Transcriptasa reversa
SNE	Sistema nervioso entérico
uv	Luz ultra violeta
VP	Proteína viral
μL	Microlitro
rpm	Revoluciones por minuto

RESUMEN

NSP4 es una proteína multifuncional que participa en la morfogénesis y patogénesis de rotavirus. Aunque NSP4 se considera una enterotoxina aún se desconoce si variaciones en NSP4 pueden estar asociadas a la severidad de la gastroenteritis por rotavirus humanos. En el presente trabajo se analizó la secuencia de NSP4 en relación a casos moderados o severos de gastroenteritis por rotavirus, aunado a esto se evaluó el efecto citopático de la expresión de NSP4 en células MA104 y la disminución de su expresión durante el proceso infeccioso. El análisis de la severidad de la gastroenteritis reveló que 13 (26%) casos se asociaron a gastroenteritis leve, 23 (46%) a moderada y 14 (28%) a severa. El análisis filogenético de la secuencia de NSP4 demostró la presencia de tres grupos dentro del genotipo E1, en el grupo III se observó una mutación puntual y poco común en el aa 144. En este análisis no se encontró relación alguna entre las variaciones en NSP4 y los diferentes grados de severidad de la gastroenteritis. Sin embargo, en ensayos de expresión de NSP4 se observó un efecto citopático. Por otro lado el silenciamiento de la expresión de NSP4 durante el proceso infeccioso de rotavirus mostró una considerable disminución en el daño celular. Esto puede indicar que la severidad de la gastroenteritis por rotavirus parece relacionarse a la conformación de NSP4 en lugar de variaciones puntuales en su secuencia, aunque aún se requieren de más estudios al respecto para determinar si NSP4 es el único factor de patogénesis en rotavirus.

ABSTRACT

The NSP4 protein is a multifunctional protein that plays a role in the morphogenesis and pathogenesis of the rotavirus. Although NSP4 is considered an enterotoxin, the relationship between gastroenteritis severity and amino acid variations in NSP4 of the human rotavirus remains unclear. In this study, we analyzed the NSP4 sequence and the severity of gastroenteritis of children with moderate to severe gastroenteritis, additionally we studied the effect of the NSP4 expression and the consequences of silencing its expression during the infection process. Analysis of rotavirus gastroenteritis severity showed that 13 (26%) cases had mild gastroenteritis, 23 (46%) moderate gastroenteritis and 14 (28%) severe gastroenteritis. NSP4 phylogenetic analysis showed three clusters within the genotype E1. Sequence analysis revealed similar mutations inside each cluster, and an uncommon variation in residue 144 was found in five of the NSP4 sequences with no relationship to different grades of gastroenteritis. Further analysis in NSP4 showed the cytopathic effect of this protein in MA104 cells. On the other hand, the modulation of the NSP4 expression was related to an inhibition of the cellular damage in rotavirus infected cells. These findings indicate that rotavirus severe gastroenteritis might be related to the NSP4 conformation instead of punctual variations in its sequence, although more studies are needed to determine if NSP4 is a unique pathogenic factor in rotavirus.

1. INTRODUCCIÓN

Rotavirus causa gastroenteritis en mamíferos y aves. Los grupos A, B y C de rotavirus se caracterizan por infectar humanos y animales. El grupo A es el principal responsable de gastroenteritis en niños menores de cinco años (Kapikian *et al*, 2001; Morris and Estes, 2001). Los síntomas presentes en una gastroenteritis por rotavirus son diarrea, fiebre y vómito. La deshidratación como consecuencia de la diarrea severa puede causar la muerte del menor en un corto tiempo. A rotavirus se le asocia con 453,000 muertes de niños a nivel mundial, un gran porcentaje de estas muertes se presenta en países subdesarrollados (Morris and Estes, 2001; Ramig, 2004; Parashar *et al*, 2006; Tate *et al*, 2012).

Entre los factores de patogénesis de rotavirus destaca la proteína no estructural 4 (NSP4), la cual ha sido caracterizada como enterotoxina (Ball *et al*, 1996). La actividad de NSP4 como enterotoxina se asocia a la movilización del flujo de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) del retículo endoplásmico hacia el citoplasma lo cual induce una inestabilidad en la membrana y pérdida de líquidos; el mismo efecto podría ser mediado por la vía de fosfolipasa C inositol trifosfato (PLC-IP₃) cuando NSP4 interactúa con células no infectadas (Dong *et al*, 1997; Brunet *et al*, 2000; Zhang *et al*, 2000).

NSP4 es una proteína glucosilada de 175 aminoácidos y un peso molecular de 28 kDa. Esta proteína se caracteriza por la presencia de tres regiones hidrofóbicas denominadas H1 (aa 7–21), H2 (aa 29–47) and H3 (aa 67–85) y un dominio super enrollado (aa 95-137). El extremo amino de NSP4 (aa 1-44) se localiza en el lumen del retículo endoplásmico (RE) y su extremo carboxil en el citoplasma. Durante los procesos de morfogénesis viral NSP4 actúa como un receptor intracelular de las proteínas VP6 (en las partículas subvirales) y VP4 (parte de la cápside externa) y dentro del RE facilita el ensamble de las partículas subvirales con las proteínas de la cápside externa favoreciendo así la formación de partículas virales completas e infectivas (Estes, 2001). También se ha descrito la interacción de NSP4 con algunas proteínas celulares y de matriz extracelular (Tian *et al*, 1996; Mirazimi *et al*, 1998; Xu *et al*, 2000).

El análisis de secuencia de NSP4 ha revelado la presencia de por lo menos 15 genotipos E (por Enterotoxina). Los genotipos de NSP4 asociados a infecciones en humanos son los genotipos E1 (Wa), E2 (Kun) y E3 (AU-1) (Matthijssens *et al*, 2011; Papp *et al*, 2012). Por otro lado, aún no se establece claramente la actividad de NSP4 como enterotoxina en cepas de rotavirus humanos. Algunos reportes relacionan variaciones de aminoácidos en NSP4, VP4 y VP7 con cepas asintomáticas (Kirkwood *et al*, 1996; Pager *et al*, 2000). Sin embargo, esto no parece ser generalizado debido a que en algunos estudios no se ha encontrado tal relación (Ward *et al*, 1997; Lee *et al*, 2000). En el presente estudio nos enfocamos en el análisis de la proteína NSP4, inicialmente se consideró el análisis de la

secuencia de NSP4 de cepas de rotavirus humanos asociados a diversos grados de severidad, posteriormente se observó el efecto citopático de la expresión de NSP4 en células de mamífero y por último se analizó el efecto del silenciamiento de NSP4 durante el proceso infeccioso de rotavirus. El objetivo del presente trabajo fue determinar si NSP4 de cepas de rotavirus humanos se asocia al efecto citotóxico en ausencia de otras proteínas virales o si la expresión de NSP4 puede asociarse a la patogénesis viral.

2. HIPÓTESIS

La proteína NSP4 de cepas de rotavirus humanos es uno de los factores virales involucrados en la patogénesis viral.

3. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la actividad de la proteína NSP4 de cepas de rotavirus humanos como factor de patogénesis.

Objetivos particulares

1. Analizar la proteína NSP4 de cepas de rotavirus de campo asociadas a diversos grados de gastroenteritis.
2. Establecer un sistema de expresión de NSP4 de la cepa de rotavirus Wa de humanos en células MA104.
3. Evaluar el efecto de la expresión de NSP4 en células MA104.
4. Silenciar el gen de NSP4 en células infectadas con la cepa de rotavirus Wa.
5. Evaluar el efecto causado por el silenciamiento de NSP4 en células MA104 infectadas con rotavirus.

4. ANTECEDENTES

4.1 Generalidades

La gastroenteritis por rotavirus se caracteriza por afectar a niños menores de cinco años, comúnmente durante las épocas más frías del año. La ruta de transmisión del virus es por vía fecal-oral. Sin embargo, las medidas preventivas para este tipo de transmisión no han sido suficientes para evitar que rotavirus esté presente en todo el mundo, tanto en países desarrollados como subdesarrollados (Parashar, 2006).

Se considera que rotavirus es responsable del 40% de todos los casos de diarrea severa en niños. La deshidratación como consecuencia de la diarrea y la falta de atención médica oportuna son la causa de 453,000 muertes de niños cada año, se estima que el >80% de estos decesos se presenta en países en vías de desarrollo (Glass, 2006).

Debido al impacto de rotavirus en la salud a nivel mundial, la necesidad de una vacuna segura y efectiva se hizo inminente. En 1998, en Estados Unidos se autorizó la distribución de la vacuna tetravalente recombinante mono

rhesus/humano. Esta vacuna mostró una buena protección contra la gastroenteritis severa por rotavirus; sin embargo, en poco tiempo se retiró del mercado debido a que algunos niños vacunados presentaron como efecto secundario invaginación intestinal (Murphy *et al*, 2001). En 2005, la FDA (Food and Drug Administration, US) aprobó la distribución de una vacuna pentavalente rearreglante basada en rotavirus bovino/humano (RotaTeq[®], Merck and Company, Whitehouse Station, New Jersey) y de una vacuna monovalente (Rotarix[®], GlaxoSmithKline [GSK] Biologicals, Rixensart, Belgium), hasta el momento ambas vacunas han mostrado ser eficientes en la prevención de la gastroenteritis por rotavirus. Sin embargo, las variaciones de los virus circulantes en muchas regiones del mundo sugieren seguir con los monitoreos epidemiológicos para así evaluar continuamente la eficiencia de cada vacuna (Cortese and Parashar, 2009).

4.2 Estructura de la partícula viral

Rotavirus fue descrito por primera vez en 1973 por microscopia electrónica en una biopsia del duodeno de un niño con gastroenteritis no bacteriana, debido a su estructura se le denominó rotavirus, que proviene del latín *rota* que significa rueda. Posteriormente, rotavirus se clasificó como parte de la familia *Reoviridae* (Bishop *et al*, 1973; Estes, 2001).

Los rotavirus se caracterizan por presentar un genoma constituido de once segmentos de RNA de doble cadena. Cada segmento es un gen que se denomina

en base a su tamaño y su corrimiento electroforético, de tal manera que el gen 1 es el segmento de RNA de mayor tamaño (3.3 Kb) y el 11 el más pequeño (0.6 Kb). Cada gen codifica para una proteína, excepto el gen once que codifica para dos. Por este motivo, el genoma viral codifica un total de doce proteínas, seis estructurales (VP) y seis no estructurales (NSP) (Estes, 2001).

La partícula viral es de simetría icosaédrica, mide 70 nm de diámetro y se caracteriza por estar formada por tres capas concéntricas (Fig. 1). La cápside interna o núcleo envuelve el genoma viral y está constituida por 60 dímeros de la proteína VP2; por 12 moléculas de VP1, la cual actúa como una RNA polimerasa dependiente de RNA; y 12 monómeros de VP3, caracterizada como una guanidil? transferasa. La capa intermedia está formada por 260 trímeros de VP6, las estructuras virales conformadas solo con el núcleo y la cápside intermedia no es infecciosa y se denomina DLP (partículas de doble cápside). La cápside externa está formada por 260 trímeros de la proteína VP7 y 60 dímeros de VP4, la partícula con las tres capas proteicas es infecciosa y se denomina TLP (partículas de triple cápside). Ambas proteínas, VP7 y VP4 son indispensables para que el virus infecte las células blanco, una vez dentro de la célula, el virus pierde la cápside externa y el proceso de transcripción del RNA mensajero (RNAm) se activa en los DLP's (Estes, 2001).

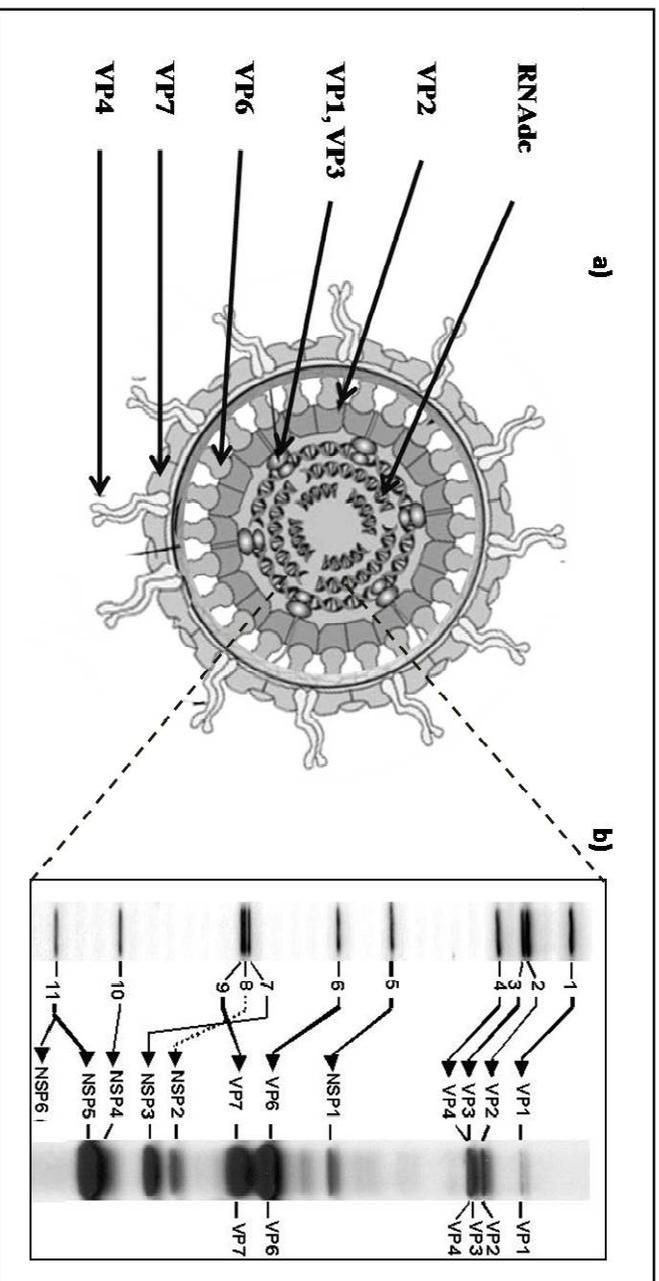


Fig. 1 Representación esquemática de la estructura de rotavirus. a) Se muestra la estructura de una partícula viral, se muestra el RNAdc interactuando con las proteínas VP1, VP2 y VP3 en la cápside interna; así mismo, se describe la cápside intermedia conformada por la proteína VP6; también se observa la cápside externa que está formada por la proteína VP7 y por la proteína VP4, misma que se encuentra en forma de espículas. b) Se esquematiza un corrimiento electroforético de los genes de rotavirus (a la derecha) y de las proteínas que codifica cada gen (izquierda), no se observa la proteína NSP6 (Esquema adaptado de Estes, 2001).

4.3 Clasificación

Los rotavirus infectan la mayoría de mamíferos y algunas aves, se pueden identificar en base al huésped que infectan, por lo que hay cepas de rotavirus de aves, de cerdos, becerros, humanos, etc. Cada cepa es específica de su huésped lo que indica que hay barreras entre especies, las cuales en raras ocasiones se traspasan. Al igual que en los humanos las infecciones por rotavirus en animales se limitan a recién nacidos y causan una gastroenteritis severa (Kapikian, 2001).

Independientemente de la especificidad de huésped, los rotavirus se clasifican en grupos, subgrupos, serotipos y genotipos. La clasificación de rotavirus por grupos se caracterizó en base a anticuerpos específicos contra la proteína VP6, hasta hoy se han descrito siete grupos (A-G). En el grupo A, que ha sido ampliamente estudiado, se han identificado cuatro subgrupos (SG II, SG I + II, y SG no-I, no-II). El análisis de secuencia de un fragmento de 379 pares de bases (pb) del gen de la proteína VP6 indica la clasificación del grupo A en dos subgrupos, los cuales no se asocian con los cuatro subgrupos identificados por ensayos serológicos (Iturriza-Gómara *et al*, 2002).

Los humanos solo han sido afectados por los rotavirus de los grupos A, B y C. El grupo A es el que comúnmente afecta a niños menores de cinco años, los grupos B y C han sido reportados en brotes esporádicos en niños y adultos respectivamente (Sanekata *et al*, 2003; Bonsgorf *et al*, 1988; Riepenhoff-Talty *et al*, 1997; Wu *et al*, 1998; Kuzuya *et al*, 2005).

La clasificación de los rotavirus en serotipos inicialmente fue en base a las características antigénicas de las proteínas de superficie VP4 (serotipo P) y VP7 (serotipo G). Posteriormente, la amplificación por PCR y el análisis de secuencia de los genes de VP4 y VP7 respectivamente, permitieron la clasificación del virus por genotipos. Para definir un genotipo para VP7 o VP4 se considera una homología del 80% entre las secuencias de un mismo genotipo (Nishikawa *et al*, 1989; Gorziglia *et al*, 1990, Matthijnsens *et al*, 2011).

Para la proteína VP7 el genotipo y el serotipo coinciden y se denominan de la misma manera, hasta hoy se han descrito 27 genotipos G, los que comúnmente se reportan son G1, G2, G3, G4 y G9. Con respecto a VP4, no se ha establecido relación entre serotipo y genotipo por lo que el serotipo se denomina solo por un número, actualmente se conocen 14 serotipos P. Por su parte, de los genotipos P se han descrito 35 y los predominantes son los genotipos P[8] y P[4]. Por otro lado, análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína no estructural 4 (NSP4) demostró la existencia de 15 genotipos denominados E (E1-E15) por la actividad de NSP4 como enterotoxina. Entre los genotipos de NSP4 que comúnmente se reportan son genotipo E1, E2 y E3 (Matthijnsens *et al*, 2011).

Para simplificar la clasificación de rotavirus se determinó una nomenclatura binomial en la cual para hacer referencia a una cepa se le denomina genotipo G seguido del genotipo P, las combinaciones que más se reportan alrededor del mundo son G1P[8], G4P[8], G2P[4], G3P[8] (Arista *et al*, 1997; Ramachandran *et*

al, 1998; Argüelles *et al*, 2000; O'Halloran *et al*, 2002; Rhaman *et al*, 2003, Iturriza *et al*, 2004). En 2008 se propuso un sistema para clasificar rotavirus en base al análisis de la secuencia parcial o completa de los 11 segmentos del genoma (Tabla 1) (Matthijnssens *et al*, 2008).

4.4 Ciclo replicativo de rotavirus

4.4.1 Interacción y entrada del virus a las células.

En los procesos de infección naturales rotavirus muestra un tropismo celular hacia los enterocitos maduros. En los ensayos *in vitro* los rotavirus tienen afinidad por las líneas celulares de origen renal o intestinal. La interacción e ingreso de rotavirus a las células es un proceso que requiere de múltiples pasos que dependen de algunos receptores en la superficie celular y de las proteínas de la cápside externa VP4 y V7 de rotavirus (Estes and Cohen, 1989).

La mayoría de las cepas animales dependen de la presencia de ácido siálico (AS) en la superficie de las células para poder infectarlas. A estas cepas se les conoce como neuraminidasa sensitivas, debido a que la neuraminidasa (NA) es una enzima que retira las moléculas de ácido siálico de la superficie celular y así se inhibe la interacción del virus con las células (Fuentes-Panana *et al*, 1995).

Tabla 1.

Clasificación de rotavirus en base a los 11 segmentos de RNAdc que conforman su genoma. En la tabla se describen las proteínas correspondientes a cada gen, el valor de corte (cut-off) de similitud de secuencia de las muestras para ser consideradas dentro de cada genotipo, el número de genotipos descritos hasta ahora y el nombre correspondiente a cada genotipo (Matthijssens *et al*, 2008; Matthijssens *et al*, 2011; Papp *et al*, 2012).

Producto del gen	% identidad dentro de cada genotipo (cut-off)*	Genotipos	Origen del nombre de los genotipos
VP7	80	27G	Glicosilado
VP4	80**	35P	Proteasa-sensible
VP6	85	16I	Cápside Interna (intermedia)
VP1	83	9R	RNA polimerasa dependiente de RNA
VP2	84	9C	Proteína del Core (interna)
VP3	81	8M	Metil-transferasa
NSP1	79	16A	Antagonista de interferón
NSP2	85	9N	NTPasa
NSP3	85	12T	Translation enhancer (promotor de traducción)
NSP4	85	15E	Enterotoxina
NSP5	91	11H	pHosphoprotein (proteína fosforilada)

* De acuerdo a la propuesta del grupo de clasificación de rotavirus RCWG (Rotavirus Classification Working Group).

** >89% de homología de secuencia para definir un genotipo P, de acuerdo a Gorziglia y colaboradores en 1990.

Por otro lado, no todos los rotavirus son dependientes del AS para ingresar a las células. Las cepas de rotavirus neuraminidasa resistentes indican que la presencia de AS puede no ser indispensable para la interacción e ingreso del virus a las células y que se requieren de otros receptores para este proceso (López and Arias, 2004).

Una etapa primordial para la interacción de rotavirus con las células, es la fracción de VP4 en VP8* y VP5* por efecto de la tripsina. Como consecuencia, VP8* entre los aa 93-208, interacciona con una molécula de AS; lo cual induce un cambio de conformación en todo VP4, que permite la interacción de los aa 308-310 de VP5* con la integrina $\alpha 2\beta 1$. Posteriormente, la región de aa 642-659 de VP5* interactúa con la proteína de choque térmico hsc70 (Isa *et al*, 1997; Zárate *et al* 2000; Graham *et al*, 2003; Zárate *et al*, 2003). Por último, la proteína VP7 de rotavirus en los dominios de aa 161-169 y aa 253-255 interacciona con las integrinas $\alpha v\beta 3$ y $\alpha x\beta 2$ respectivamente, para dar inicio al proceso del ingreso del virus a la célula (Guerrero *et al*, 2000; Graham *et al*, 2003).

Los rotavirus pueden introducirse a las células por un proceso de endocitosis donde el virus es envuelto en una vesícula de la membrana que posteriormente se permeabiliza y libera al virus en el citoplasma. Por otro lado, otro mecanismo de ingreso es por la penetración directa de rotavirus a través de la membrana celular por la proteína VP5* (Mackow *et al*, 1988; Denisova *et al* 1999; Estes, 2001).

4.4.2 Producción de progenie viral.

Una vez que rotavirus se internaliza en el citoplasma de la célula, la baja concentración de calcio induce la pérdida de la cápside externa (Ruiz *et al*, 1996). Tanto VP4 como VP7 pierden la estabilidad de su estructura proteica y se desprenden de la partícula viral, y por consecuencia se activa el proceso de transcripción del RNA mensajero en las partículas de doble cápside (Estes, 2001; Cohen *et al*, 1979).

En el core, la transcripción, incorporación de nucleótidos y la formación del cap en el RNAm se lleva a cabo por las proteínas VP1 y VP3. La proteína VP1 es una RNA polimerasa dependiente de RNA y la proteína VP3 es una metil y guanililtransferasa que se asocia a la formación del cap en los transcritos. La síntesis del RNAm inicia una hora después de la infección (Valenzuela *et al*, 1991; Lawton *et al*, 2001).

Al mismo tiempo en el que el RNAm se va sintetizando se le adiciona el cap (m7GpppGm) en el extremo 5', posteriormente sale de las partículas subvirales hasta el citoplasma a través de los canales que atraviesan el core y la cápside intermedia en los vórtices de la estructura icosaédrica (Valenzuela *et al*, 1991; Lawton *et al*, 2001). El transcrito no está poliadeninado en el extremo 3', pero contiene una secuencia consenso que es reconocida por un dominio del extremo amino de la proteína NSP3 (Poncet *et al*, 1994). Por otro lado, el extremo carboxil

de la proteína NSP3 interacciona con el factor de traducción eIF4G. Este factor de traducción es un componente del complejo de iniciación de traducción eIF4F, que reconoce el cap en el RNAm de eucariotas. La interacción entre NSP3 y el factor eIF4G induce la circularización del RNAm viral lo que promueve su traducción (Vende *et al*, 2000).

Como consecuencia de la interacción de NSP3 con eIF4G en células infectadas la cantidad de proteína de unión al extremo poli A (PABP) unida al eIF4G disminuye, por lo tanto la traducción del RNAm celular disminuye de manera significativa (Piron *et al*, 1998).

Aunque aún se desconocen los mecanismos de regulación post-transcripcional, se ha observado que existe una variación entre el nivel de expresión de algunas proteínas virales. Entre las primeras proteínas en expresarse están VP6 y NSP1. La proteína VP6 se expresa en mayor proporción que NSP1. Estas variaciones en la expresión se asocian a la eficiencia de traducción de cada gen de rotavirus (Mitzel *et al*, 2003).

Por otro lado, en los procesos de replicación viral el RNAm es utilizado como molde para la síntesis del RNA (-) para conformar el RNAdc del genoma viral. Una secuencia consenso presente en el extremo 3' del RNAm actúa como la señal *in cis* requerida para la síntesis de la cadena negativa del RNA genómico (Patton *et al*, 1996). El empaquetamiento del RNAm en el core y la síntesis del RNA genómico ocurren simultáneamente. Durante esta etapa se observan intermediarios

de la replicación (IR), los cuales se conforman por proteínas estructurales y no estructurales. La formación de los IR y el proceso de replicación del RNAdc se llevan a cabo en inclusiones citoplasmáticas denominadas viroplasmas (Gallegos *et al*, 1989; Estes, 2001).

Entre las proteínas no estructurales que forman parte de los IR están NSP2, NSP5 y NSP6, las cuales tienen afinidad por el RNA de cadena sencilla y se asocian a la formación de los viroplasmas, así como en la replicación y empaquetamiento del RNAdc en las partículas subvirales (González *et al*, 1998; Fabbretti *et al*, 1999; Vende *et al*, 2002).

La proteína NSP2 adopta una conformación funcional como octameros, presenta una fuerte afinidad hacia el RNAdc y el RNA de cadena sencilla (RNAs); así como, actividad enzimática nucleósido trifosfatasa (NTPasa) *in vitro* (Kattoura *et al*, 1992; Taraporewala *et al*, 2002). En presencia de Mg^{2+} la proteína NSP2 cataliza la hidrólisis del NTP a NDP, como resultado NSP2 es fosforilado. Se considera que la intervención de NSP2 como catalizador del empaquetamiento del RNAm en el core de las partículas subvirales se deriva de su actividad de NTPasa (Taraporewala *et al*, 1999).

El cambio de conformación de NSP2 al fosforilarse y desfosforilarse puede acoplarse a la hiperfosforilación de NSP5 y favorecer la interacción con el RNAs que será empaquetado en el core (Vende *et al*, 2002). Por su parte, la proteína NSP6 interactúa con NSP5 en su extremo carboxil, se localiza en los viroplasmas durante la replicación y el empaquetamiento viral. Sin embargo, la función de

NSP6 en este proceso se desconoce y se cree que puede no ser indispensable, debido a la existencia de cepas que no expresan NSP6, entre esas cepas están, la cepa Mc323 y Alabama que pertenecen al grupo A y todas las cepas del grupo C de rotavirus. A pesar de la caracterización de algunos de los IR, su papel en la replicación de rotavirus y los pasos involucrados en este proceso no han sido bien descritos, por lo que aún se requiere de más estudios al respecto (Torres-Vega *et al*, 2000).

Por otro lado, una vez que el RNA genómico se ha sintetizado, entre 3 o 4 horas postinfección, permanece asociado a VP1 y al sub-core. Posteriormente es ensamblado en los DLP's y se inicia el proceso de maduración de las partículas subvirales (Fig.2) (Petrie *et al*, 1982; Gallegos and Patton, 1989).

Las partículas subvirales conformadas por el core y la cápside intermedia, interaccionan con la proteína NSP4, la cual actúa como receptor intracelular en el retículo endoplasmico (RE). NSP4 permite la internalización de los DLP's en el RE y a su vez interacciona con VP4 y VP7 para favorecer la conformación de las partículas virales maduras (Meyer *et al*, 1989; Au *et al*, 1989). Durante la traslocación de los DLP hacia el lumen del RE las partículas adquieren una envoltura temporal, la cual es removida por un mecanismo en el cual participan VP7 o VP4 (Suzuki *et al*, 1993). En las células infectadas se ha observado que las proteínas VP4, VP7 y NSP4 interaccionan formando heterooligómeros (Maass *et al*, 1990).

El proceso replicación de rotavirus en células Caco-2 difiere un poco del de las células MA104. Las células Caco-2 pueden diferenciarse y presentar algunas características como las de enterocitos maduros. Entre sus cualidades está el que son células polarizadas y presentan membrana apical y basolateral con proteínas propias de los enterocitos (Grasset *et al*, 1984). En células Caco-2 el proceso de replicación dura 24 horas y la liberación de los viriones no induce la lisis celular; en células MA104 el ciclo replicativo es de 12 horas e implica la lisis de las células infectadas (Altenburg *et al*, 1980; Jourdan *et al*, 1997; Jourdan *et al*, 1998).

4.5 Patogénesis de Rotavirus

Rotavirus afecta a niños menores de cinco años, aunque algunos adultos sanos o inmunosuprimidos pueden ser afectados de manera asintomática o sintomática (Bonsdorf *et al*, 1988; Riepenhoff-Talty *et al*, 1997; Sanekata *et al*, 2003). La infección se adquiere por vía oral-fecal y la gastroenteritis por rotavirus tiende a ser más severa que la causada por otros agentes infecciosos (Ruuska y Vesikari, 1991). Se considera que de un 29 al 45% de los casos de infecciones por rotavirus requieren hospitalización (Parashar *et al.*, 2006).

El síntoma común en la gastroenteritis por rotavirus es la diarrea profusa, en algunos casos de más de 20 evacuaciones acuosas por día. Generalmente, la diarrea va acompañada de vómito, fiebre, anorexia y dolor abdominal, que se manifiestan después de un periodo de incubación corto de uno a dos días (Ramig, 2004).

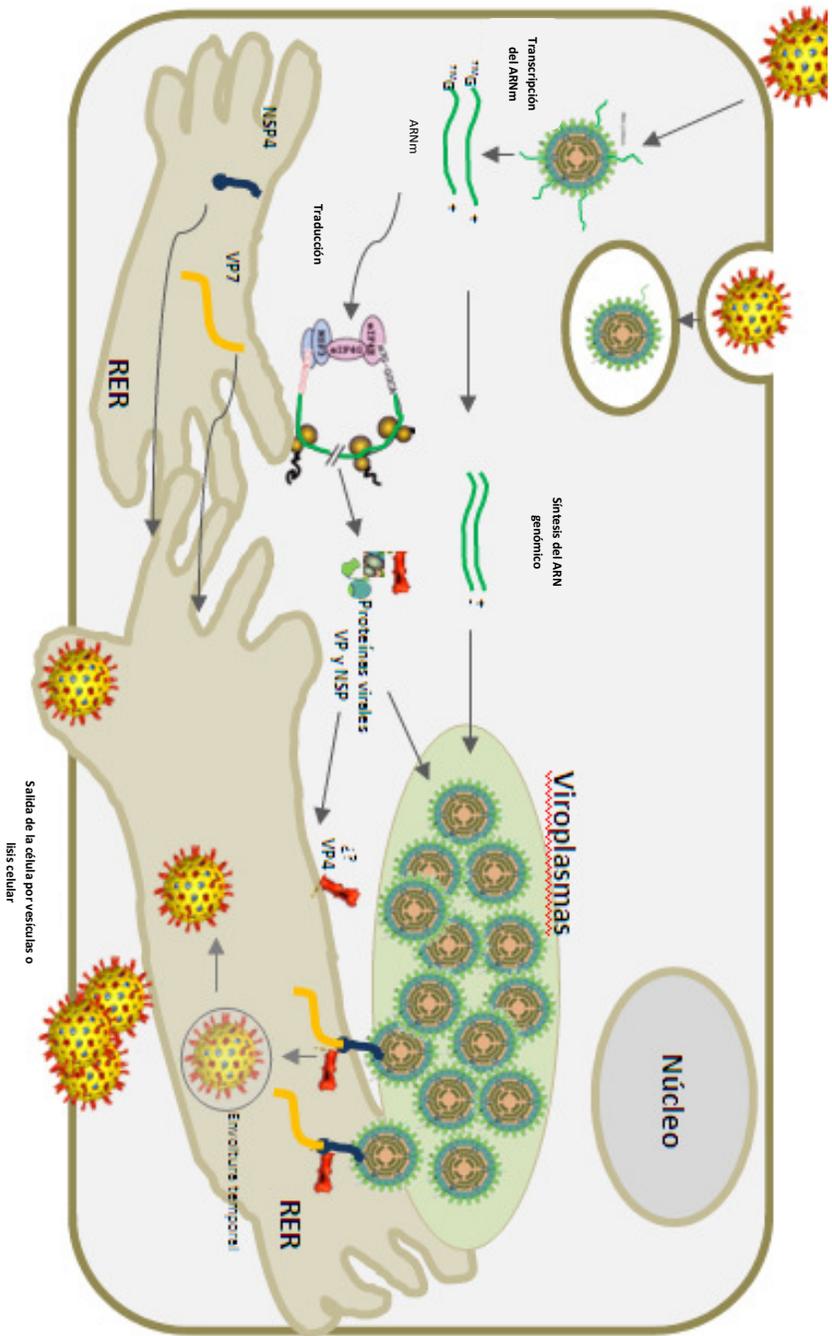


Fig. 2 Descripción esquemática del ciclo replicativo de rotavirus (Estes, 2001)

El proceso infeccioso puede auto limitarse entre 5 y 7 días después de la infección (Morris and Estes, 2001). Sin embargo, la falta del manejo oportuno del paciente puede conducir a una deshidratación severa, lo que a su vez puede culminar con la muerte del infante (Wickelgren, 2000; Parashar *et al*, 2006).

Para determinar el efecto patológico causado por rotavirus se ha recurrido a voluntarios humanos y al uso de modelos animales. En ambos, la manifestación de los síntomas de la gastroenteritis por rotavirus muestra una marcada dependencia a la edad donde a menor edad mayor susceptibilidad. Aunque los adultos también son susceptibles a la infección por rotavirus, no es común la manifestación de síntomas (Gerber *et al*, 2011). Comúnmente las cepas de rotavirus se limitan a infectar a un huésped en particular, no obstante, existe evidencia donde se han detectado cepas de rotavirus animales infectando humanos (Ghosh *et al*, 2011).

Los rotavirus muestran tropismo celular por los enterocitos maduros, los cuales se localizan en la parte superior de las vellosidades intestinales (Ramig, 2004). Estas células al ser infectadas por rotavirus sufren una fuerte inhibición del transportador de sodio-glucosa (SGLT1), lo que causa alteraciones en la absorción de glucosa y en la reabsorción de agua. Además, se ha observado un incremento de los niveles de calcio intracelular que se ha asociado con el efecto citopático producido por rotavirus (Brunet *et al*, 2001). Así mismo, se describe una disminución de disacaridasas como maltasas, lactasas y sacarasas a nivel de la mucosa en el lumen intestinal, esto a su vez dificulta la digestión de carbohidratos, lo que induce el proceso de malabsorción de nutrientes (Lundgren and Svensson, 2001).

Algunos estudios realizados en células de mamíferos demuestran una relación entre el efecto citopático y un incremento en los niveles de calcio intracelular en las células infectadas con rotavirus. Tal efecto se reduce en presencia de EDTA, el cual es un agente quelante de Ca^{2+} (Michelangeli *et al*, 1991). La elevación del calcio intracelular induce la desestabilización de la actina y la tubulina y se asocia al daño celular (Jourdan *et al*, 1998).

En humanos, los pocos estudios que existen sobre la mucosa intestinal de niños infectados con rotavirus muestran que el daño histológico se presenta en su mayoría en el duodeno, y se observa la reducción y atrofia de las vellosidades del epitelio, infiltración de monocitos, inflamación leve, la distensión del retículo endoplásmico (Holmes *et al*, 1975; Davidson *et al*, 1977).

Las alteraciones en el epitelio intestinal además de asociarse con una malabsorción, se relacionan con cambios en la osmolaridad celular, secreción de fluidos y electrolitos, lo que a su vez se relacionan al proceso de diarrea en alguna de sus etapas (Morris and Estes, 2001).

Estudios realizados con respecto a la fisiopatología de la gastroenteritis por rotavirus sugieren que la lisis celular no siempre está asociada al proceso de la diarrea. Inicialmente se observó que animales infectados con rotavirus presentaban diarrea antes de que se manifestara cualquier daño o alteración histológica (Mebus *et al*, 1977).

En estudios posteriores se utilizó tratamiento profiláctico con factor de crecimiento epidérmico, en estos casos aunque este tratamiento contrarrestaba el daño tisular durante la infección por rotavirus no evitaba la diarrea (Zijlstra *et al*, 1994).

En algunos estudios in vitro con células de mamíferos, se ha observado que la infección de células intestinales polarizadas con rotavirus no se asocia con la destrucción de las células infectadas (Jourdan *et al*, 1997). Aunado a esto, en un estudio con biopsias del epitelio intestinal de niños infectados con rotavirus durante la fase aguda de la infección, se mostró que solo 2 (5%) biopsias de las 40 realizadas presentaban evidencias de daño en el epitelio intestinal (Köhler *et al*, 1990).

Por tal motivo, los factores que involucran a la patogénesis pueden ser muy variados e incluir no solo factores virales sino además celulares. En este sentido, el mecanismo que desencadena la diarrea también se ha relacionado con alteraciones en el Sistema Nervioso Entérico (SNE), esto se debe a que fármacos como la tetradoxina (TTX) y lidocaína, que bloquean el SNE, se asocian a la disminución de la intensidad de la diarrea (Lundgren *et al*, 2000). Por lo que, la causa de la diarrea por una infección por rotavirus, puede deberse a varios factores presentes en las diferentes etapas del proceso infeccioso. Sin embargo, en las primeras etapas de la infección e incluso en la fase aguda, el proceso que desencadena la diarrea parece no estar asociado directamente al daño en la mucosa intestinal.

De manera indirecta, algunas de las proteínas asociadas a mecanismos de infección y replicación pueden influir en la virulencia de rotavirus. En este aspecto resaltan las proteínas VP3, NSP3 y NSP2, debido a que estas proteínas influyen en la eficiencia de la replicación viral, lo que a su vez favorece la propagación del virus de célula a célula propagando la infección a lo largo del epitelio intestinal. Por otro lado, otras proteínas virales como VP4, VP7, VP6 y NSP1 pueden asociarse directamente con la patogénesis de rotavirus al inducir una respuesta inmune o al evadir la misma. Sin embargo, el factor más importante que se relaciona con la patogénesis de rotavirus es la toxina viral NSP4, la cual a diferencia de otros factores de patogénesis virales que pueden depender unos de otros, desencadena los procesos que conllevan a la diarrea (Ramig, 2004; Morris and Estes, 2001).

4.6 Proteína NSP4

La proteína NSP4 de rotavirus se considera una proteína multifuncional por su participación en procesos de replicación viral, en la morfogénesis y en la patogénesis. NSP4 es codificada por el gen 10, el tamaño inicial de la proteína es de 20 kDa, posteriormente es glucosilada (aa 8 y 18) y en su forma madura es de 28 kDa. La proteína NSP4 consta de 175 aa y tres regiones hidrofóbicas denominadas H1 (aa 7-21), H2 (aa 29-47) y H3 (aa 65-87), en su estructura también presenta una región transmembranal (aa 24-44) y un dominio alfa hélice (aa 95-137) (Fig. 3) (Estes, 2001). Aparte de la caracterización estructural de

diferentes dominios en el análisis de la secuencia de aminoácidos de NSP4 (Fig. 4), también se han descrito regiones de unión a proteínas celulares como tubulina, calnexina, caveolina, proteínas de matriz extracelular y algunas chaperonas (Mirazimi *et al*, 1998; Xu *et al*, 2000; Boshuizen *et al*, 2004; Storey *et al*, 2007; Maruri-Avidal *et al*, 2008).

Los análisis de secuencia de NSP4 en rotavirus de diferentes aislados en mamíferos y aves revela la existencia de al menos 15 genotipos E1-E15, mismos que se denominan E por la actividad de NSP4 como enterotoxina. Los genotipos de NSP4 que comúnmente se detectan en cepas de rotavirus humanos son E1 (Wa-like), E2 (Kun-like) y E3 (Au-1) mismos que fueron descritos previamente como genotipos B, A y C respectivamente (Horie *et al*, 1997; Kudo *et al*, 2001; Matthijssens *et al*, 2011). Entre los genotipos de NSP4 reportados comúnmente está el genotipo E1, el segundo en frecuencia es E2 (Tavares *et al*, 2008; Bányai *et al*, 2009; Vizzi *et al*, 2011; Ben Hadj Fredj *et al*, 2012). Entre algunos genotipos NSP4 poco comunes reportados están E3, E5, E6 y E13 los cuales fueron identificados en aislados de rotavirus humanos en Tailandia, Brazil, Bangladesh y Kenia (Rahman *et al*, 2007; Matthijssens *et al*, 2008b; Benati *et al*, 2010; Khamrin *et al*, 2010; Ghosh *et al*, 2011).

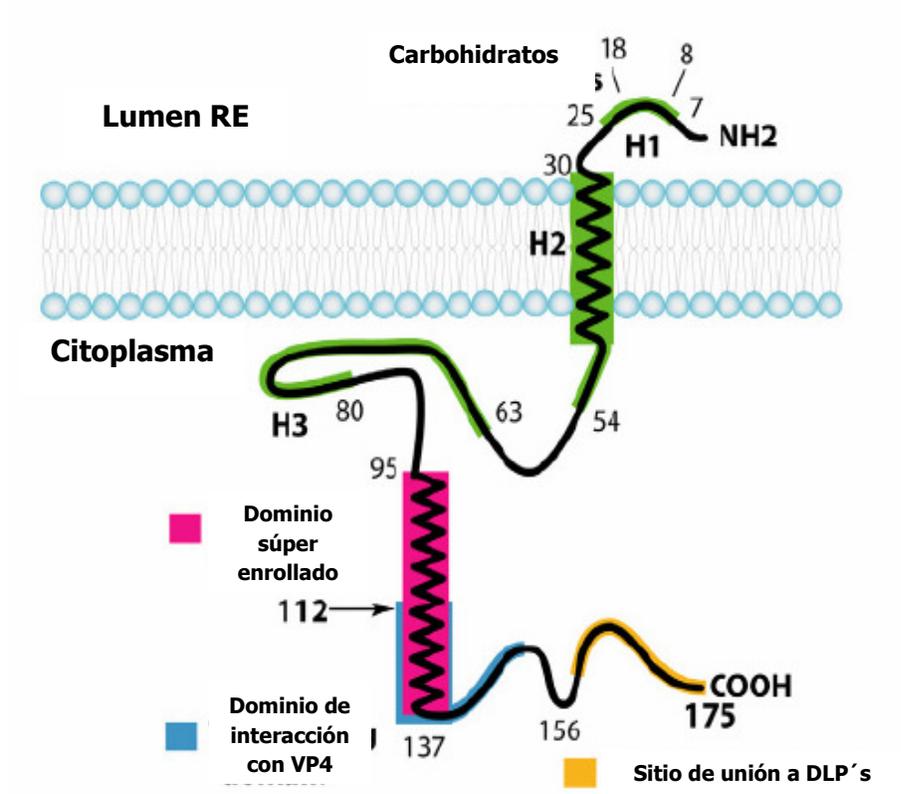


Fig. 3. Esquema representativo de la proteína NSP4 de rotavirus. En el diagrama se observan algunos de los dominios presentes en la preteína como las regiones hidrofóbicas (H1,H2 y H3), el dominio superenrollado y los sitios de interacción con VP4 y VP6 (Bowman *et al*, 2000).

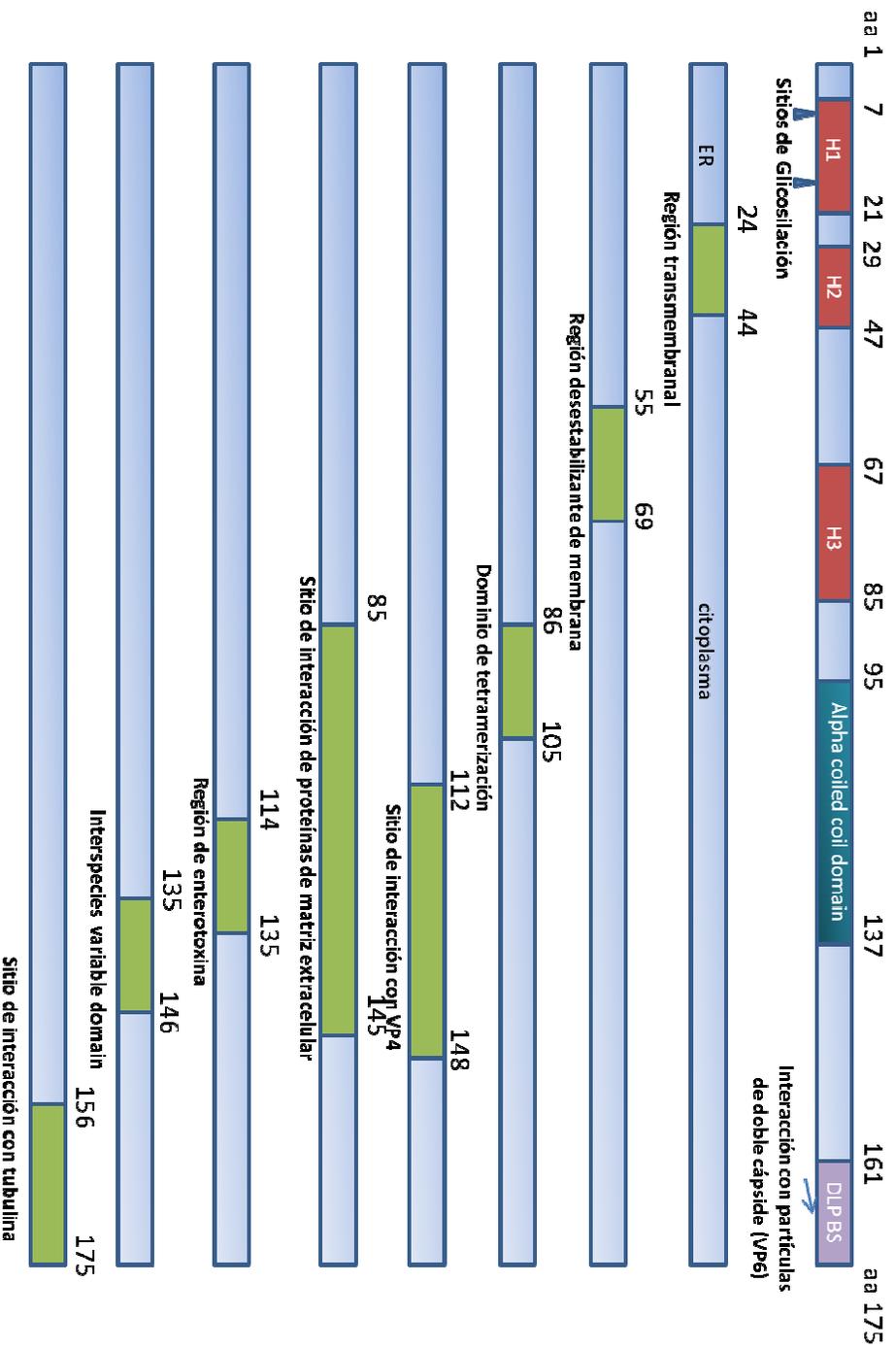


Fig. 4 Descripción esquemática de los dominios de la proteína NSP4 (Ball *et al.*, 2005)

La participación de la proteína NSP4 en los procesos de morfogénesis se relaciona con su función como receptor intracelular en el RE. El extremo amino de NSP4 se encuentra en el lumen del RE (aa 1-44), mientras que el extremo carboxil (aa 45-175) se encuentra en el citoplasma. En el extremo carboxil de NSP4 se han descrito dominios de interacción con VP4 (cápside externa) entre los aa 112-148 y de interacción con VP6 (partículas subvirales o DLP's) entre los aa 161-175 (Ball *et al*, 2005). Por lo anterior, se considera que NSP4 interactúa con DLP's y con de la cápside externa y posteriormente favorece la introducción de estos complejos proteicos en el RE. En donde los DLP's adquieren la cápside externa conformada por las proteínas VP4 y VP7 y se forman las partículas virales maduras o TLP's (Au *et al*, 1989; Tian *et al*, 1996). En ensayos con RNA's de interferencia contra NSP4 se ha observado una disminución de TLP's (López *et al*, 2005). NSP4 también ha mostrado actividad como modulador de la transcripción viral (Silvestri *et al*, 2005).

Por otro lado, en aspectos de patogénesis de rotavirus, se ha descrito a NSP4 como una enterotoxina viral. Este hallazgo se dio en 1996 en el laboratorio de Ball y colaboradores, durante la producción de anticuerpos contra algunas proteínas de rotavirus, ellos observaron que al inocular la proteína NSP4 en el peritoneo de ratones éstos presentaban diarrea. El proceso diarreico era dependiente de la concentración de NSP4 y la edad de los ratones (Ball *et al*, 1996; Zhang *et al*, 2000; Morris and Estes, 2001).

Durante el proceso infeccioso los factores que conducen a la diarrea pueden desencadenarse cuando rotavirus se une e infecta a los enterocitos en el intestino delgado. En la primera etapa, la unión del virus a la célula es mediada por una serie de interacción secuencial con moléculas conformadas con o sin ácido siálico. Al internalizarse en la célula se pierde la cápside externa y con esto se activa la síntesis de proteínas virales (Estes, 2001). Posteriormente eventos intracelulares, asociados a NSP4, inducen la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico. El incremento de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) desencadena una serie de procesos celulares incluyendo la disrupción del citoesqueleto de las microvellosidades, disminución de la expresión de disacaridasas y otras enzimas, inhibición general de transporte de Na^+ y necrosis (Fig. 5) . Estos eventos conllevan a pérdida de la absorción y desencadenan la diarrea (Halaihe *et al*, 2000).

Por otro lado, se ha demostrado que, previa a la lisis celular, NSP4 puede ser secretado de células MA104 y células polarizadas como HT-29 y Caco-2 infectadas con rotavirus (Dong *et al*, 1997; Zhang *et al*, 2000; Bugarc'ic' and Taylor, 2006). Por otro lado, también se ha descrito que NSP4 interactúa con integrinas $\alpha 1\beta 1$ y $\alpha 2\beta 2$ en células HT-29. En este aspecto se describe que el dominio de aa 114-135 en NSP4 se asocia con la interacción con la integrina $\alpha 2$ y mutaciones en NSP4 que impiden esta interacción atenúan la inducción de la diarrea en ratones neonatos (Seo *et al*, 2008).

La interacción de NSP4 en células no infectadas desencadena una cascada iniciada por fosfolipasa C-inositol 1,3,5-trifosfato (PLC-IP₃) que culmina en la liberación

de Ca^{2+} del retículo endoplásmico incrementando el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Dong *et al*, 1997). Se ha observado que si NSP4 actúa en enterocitos induce una disrupción en las uniones celulares, resultando en permeabilidad celular; si actúa en células crípticas incrementa el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induciendo secreciones mediadas por la activación del transporte de Cl^- (Fig.5). Así mismo, se ha observado que la proteína NSP4 secretada de las células infectadas estimula el SNE, esto se determinó debido a que fármacos que bloquean el SNE pueden atenuar la severidad de la diarrea (Lundgren *et al*, 2000; Raming, 2004).

En algunos estudios, el análisis de la proteína NSP4 en relación a la actividad como enterotoxina, se mostró que la proteína completa (aa 1-175), un segmento de 63 aminoácidos (aa 112-175) y uno de 21 aminoácidos (aa 114-135) inducían un incremento de $[\text{Ca}^{+2}]_i$ (Ball *et al*, 1996; Tian *et al*, 1996). Estudios posteriores de análisis de secuencias de aminoácidos de NSP4 comparando cepas animales atenuadas y no atenuadas, indicaron que mutaciones o deleciones entre los aminoácidos 131-140 se asociaban a la pérdida de la habilidad para incrementar los niveles de $[\text{Ca}^{+2}]_i$ y por consecuencia ausencia de diarrea (Zhang *et al*, 1998). Debido a la actividad de NSP4 como enterotoxina, y a que mutaciones en regiones específicas de NSP4 podían asociarse a la atenuación de cepas de rotavirus virulentas, se consideró la posibilidad de producir vacunas contra rotavirus en base a la atenuación de NSP4. Sin embargo, por lo menos para la cepa denominada 89-12, la atenuación no estaba relacionada a mutaciones en NSP4 (Ward *et al*, 1997). Así mismo, estudios posteriores donde se analizaron

secuencias de NSP4 de rotavirus aislados de casos sintomáticos o asintomáticos no mostraron relación entre variaciones en NSP4 y la sintomatología (Horie *et al*, 1997; Lee *et al*, 2000), ante tales controversias solo se pueden sugerir más estudios al respecto, con la finalidad de elucidar el papel que juega NSP4 como un factor de patogénesis viral y en la severidad de la gastroenteritis.

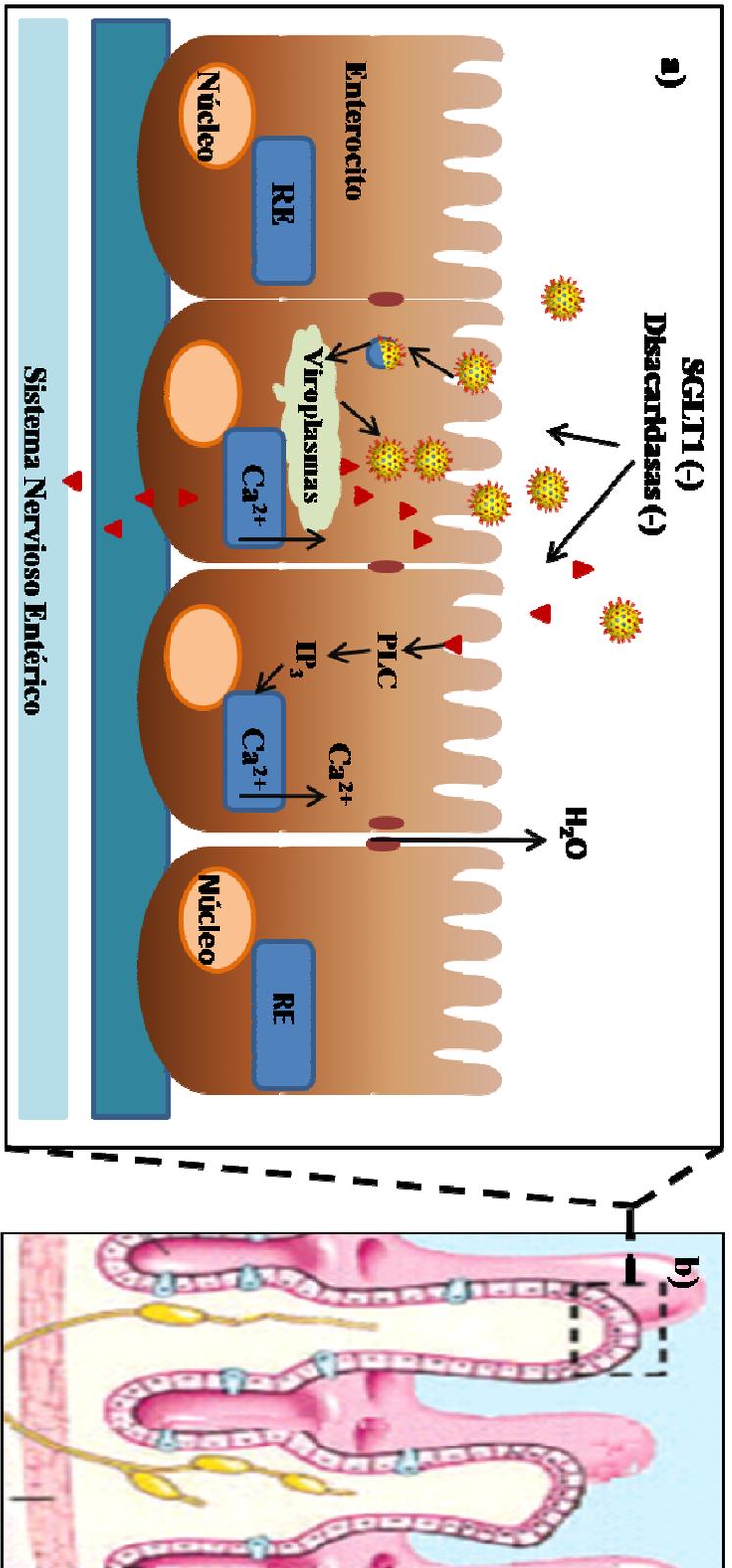


Fig. 5. Esquema que representa la inducción de diarrea por rotavirus. a) Células del epitelio intestinal infectadas con rotavirus y sucesos posteriores a la infección, de derecha a izquierda se representa la primera célula infectada, el virus entra y pierde su cápside, se forman los viriones y se secreta la proteína NSP4 (triángulos), NSP4 intracelular también induce un incremento de calcio en el retículo endoplásmico (cuadro); la siguiente célula es infectada NSP4 se une a receptores desconocidos, y se desencadena un efecto en el que las uniones intercelulares se separan permitiendo el flujo de agua y electrolitos (Flecha) ; NSP4 también estimula a través de la cascada de PLC - IP₃ la liberación de calcio intracelular. b) Muestra la estructura normal del intestino delgado (Lundgren *et al*, 2000; Ramig, 2004).

5. MATERIAL Y METODOS

5.1 Muestras niños hospitalizados y severidad de la gastroenteritis

Las muestras de heces de niños hospitalizados con gastroenteritis por rotavirus fueron colectadas de Octubre de 2004 a Marzo de 2005. Entre los criterios de inclusión se consideró a niños menores de cinco años con gastroenteritis no bacteriana. La severidad de la gastroenteritis en cada caso se determinaron en base al análisis de los síntomas del menor de acuerdo a la escala de severidad propuesta por Ruuska y Vesikari en 1991 (Anexo 1).

5.2 Cepa Wa de rotavirus

La cepa de rotavirus Wa fue la cepa de referencia utilizada para este estudio, su propagación se realizó en células MA104 como a continuación se describe: A 500 μ l del lisado de células MA104 infectadas con rotavirus Wa se le adicionó 1 μ l de tripsina al 1.0%, se homogenizó por pipeteo y se incubó a 37 °C y 5% CO₂ por 30 min. La monocapa confluyente de células MA104 se lavó por duplicado con PBS y se puso en contacto con el lisado previamente tripsinizado, se incubó por 1 hr a 37 °C y 5% CO₂. Posteriormente se retiró el medio de cultivo y se adicionaron 4 ml

de MEM sin suero para incubarse nuevamente, hasta observar el efecto citopático (24 hrs). El lisado infectado se retiró de incubación y se congeló y descongeló 3 veces en intervalos de 30 y 15 minutos respectivamente, para almacenarse a -20 °C hasta su uso.

5.3 Purificación del RNA viral

El RNA viral se purificó a partir de los lisados infectados con rotavirus o de las muestras de heces de niños con gastroenteritis por rotavirus, mediante el método de TRIZOL (Tri reagent[®], MRC Inc). Por cada 200 µl de lisado o suspensión de heces en PBS se utilizaron 500 µl de Trizol, se homogenizó en vortex por 10 intervalos de 3 min, se incubó en hielo por 5 minutos y se adicionaron 100 µl de cloroformo, se homogenizó nuevamente y se incubó en hielo por 3 minutos, posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm a 4 °C por 15 min. Después de centrifugar, se retiró cuidadosamente la fase acuosa y se transfirió a otro tubo Eppendorf de 1.5 ml al cual se le adicionó 400 µl de isopropanol, se homogenizó por inversión para incubarse a -20 °C toda la noche. Al día siguiente, se centrifugó a 12,000 rpm por 15 minutos a 4°C, se retiró el sobrenadante con cuidado de no remover la pastilla de RNA, se adicionó 1 mL de etanol absoluto, se homogenizó por inversión y se centrifugó a 12,000 rpm por 7 minutos a 4° C, se retiró el sobrenadante y se adiciono 1 ml de etanol al 75%, nuevamente se colocó en la centrifuga por 5 min. a 12,000 rpm a 4° C, se retiró todo el sobrenadante y se colocó en la campana de flujo laminar por 15 min para secar la pastilla de RNA,

posteriormente el ARN se resuspendió en 20 μ L de agua nanopura estéril, después se almacenó a -20° C hasta su uso.

5.4 RT-PCR (Transcriptasa reversa)

El RNA viral se sometió a una retrotranscripción, el proceso se describe a continuación: Se preparó una mezcla con el primer externo 10Beg16 o NSP41F (Ward *et al*, 1997; Lee *et al*, 2000) para NSP4 y 2 μ l de RNA geonómico de rotavirus, para un volumen final de 3.7 μ l. Esta mezcla se colocó en el termociclador (TERMOHYBAID *PCRsprint*) a 94°C por 5 minutos, después incubó en hielo por 10 minutos. Mientras se preparó una segunda mezcla la cual contenía: Buffer 1X (Tris-HCl 50 mM; MgCl₂, 8 mM; KCl, 30 mM; DTT, 1 mM; pH 8.5), MgCl₂, 7 mM; dNTP's (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0.64 mM y 2 U de transcriptasa reversa (MMLV Reverse Transcriptase[®], BIOLINE) para un volumen final de 6.3 μ l. El contenido de esta mezcla adicionó a la mezcla inicial (conteniendo el RNA y el oligonucleótido correspondiente), posteriormente se sometió a 42° C por 30 minutos, seguido de 5 minutos a 94° C, este último paso para eliminar los residuos de la retrotranscriptasa (Lee *et al*, 2000).

El cDNA se sometió a una PCR para amplificar el gen de NSP4. La mezcla de PCR se realizó como a continuación se describe: Buffer, 1X (Tris-SO₄ pH 8.9, 600 mM, sulfato de amonio 180 mM); MgCl₂, 1.5 mM; oligonucleótido sentido, 0.5 μ M 10Beg16, o NSP41F, oligonucleótido antisentido 10End722 o NSP42R (Ward *et al*, 1997; Lee *et al*, 2000), dNTP's (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0.4 M; 1 U de

Taq polimerasa (Platinum[®] *Taq* DNA Polymerase High Fidelity) y 1 µl de cDNA, para un volumen final de 12.5 µL, posteriormente se sometió en el termociclador, a 30 ciclos a 95 °C por 30 seg para desnaturalizar el cDNA, 42 °C por 30 segundos para el alineamiento de los oligonucleótidos y después a 72 °C por 40 segundos para la extensión de las cadenas, en el caso de VP4 y VP7; para NSP4 las condiciones del termociclador fueron 30 ciclos de 94° C, por 45 minutos; 49°C, por 30 segundos y 72° C por 1 minuto 30 segundos. El producto de PCR se visualizó en un gel de agarosa al 1.5%, con bromuro de etidio, con luz ultra violeta en el transluminador (UVP, Transilluminator) (Lee *et al*, 2000).

5.5 Genotipificación de NSP4

Se determinó el genotipo correspondiente a NSP4 mediante una PCR semianidada. Inicialmente se preparó una mezcla con los siguientes componentes: 0.2 µL de producto de PCR, Buffer, 1X (Tris-SO₄ pH 8.9, 600 mM, Sulfato de Amonio, 180 mM); 1.5 mM de MgCl₂; 1 µM de un oligonucleótido externo (16End722 o NSP42R)(Ward *et al*, 1997; Lee *et al*, 2000), 1 µM un oligonucleótido anidado (correspondiente al genotipo E1, E2 o E3) (Kudo *et al*, 2001), 0.4 mM de dNTP's; 1 U de Taq polimerasa (Platinum[®] *Taq* DNA Polymerase High Fidelity) para un volumen final de 12.5 µL. Las condiciones en el termociclador fueron de 30 ciclos, de 90 seg a 94°C, 2 minutos a 42° C y 30 seg a 72° C (Lee *et al*, 2001). Los segmentos amplificados, representativos de cada genotipo, se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y se visualizaron en el transiluminador con luz uv (UVP, Transilluminator).

5.6 Clonación del gen NSP4

El gen de NSP4 amplificado por PCR como se describió previamente, fue purificado a partir de agarosa low melting al 1.5% como indica el protocolo del kit WIZARD[®] SV GEL-PCR CLEAN-UP (Promega corp). El DNA purificado fue cuantificado a 260 nm de longitud de onda y se determinó su pureza en base al radio 260/280 en el espectrofotómetro. Posteriormente se sometió a una reacción de ligación junto con el plásmido pGEM-T (Promega, corp.) en base a una relación 1:5 (plasmido:inserto) como se describe en el siguiente cálculo:

$$\frac{\text{ng de vector} \times \text{Kb inserto}}{\text{Vector Kb}} \times \text{inserto:vector} = \text{ng de inserto}$$

Para el gen de NSP4:

$$\frac{25 \text{ ng de vector} \times 0.75 \text{ kb inserto}}{3.0 \text{ kb Vector}} \times \frac{5}{1} = 31.25 \text{ ng de inserto}$$

En la reacción de ligación 31.25 ng de producto de PCR del gen de NSP4 y 25 ng de vector pGEM-T se homogenizaron con 2 µL de buffer ligasa (30 mM Tris HCl pH 7.8, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT y 1 mM ATP), y 3 U de ligasa T4 (Promega, Corp), la reacción de ligación se incubó toda la noche a 4° C. Al día siguiente se prosiguió con el proseso de transformación de bacterias DH5α competentes (anexo 1). Las células competentes se retiraron de congelación (-70 °C) y se colocaron en hielo hasta que se descongelaron, 100 µl de celulas competentes se

homogenizaron cuidadosamente con 2 μ l de reacción de ligación (NSP4-pGEM-T), se incubó en hielo por 30 minutos. Posteriormente, las células se sometieron a un shock térmico a 42 °C por 90 segundos, se incubó nuevamente en hielo por 2 min. A las células a transformar se les adicionó 450 μ l de medio SOC (2% Tryptona (pancreatic digest of casein), 0.5% (w/v) extracto de levadura, 8.6 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 20 mM MgSO₄, 20 mM Glucosa; Sigma-Aldrich, corp.) y se incubaron en agitación constante (200 rpm) a 37 °C por 1 hora.

Después de este tiempo las células se concentraron en el fondo por centrifugación y se resuspendieron en 50 μ l de SOC, los cuales se colocaron y dispersaron con una varilla de vidrio en una placa de LB (Lennox L Agar, Invitrogen corp.) con 100 μ g/mL de ampicilina (Ampicillim sodium salt, Invitrogen corp). Las placas se incubaron toda la noche a 37 °C (En un tiempo no mayor de 18 hrs. para evitar las colonias satélites). Al día siguiente las colonias que crecieron en la placa (clonas) se retiraron con un palillo de madera estéril y se inocularon en tres mililitros de caldo LB (Lennox L Broth Base, Invitrogen corp.) con ampicilina (100 μ g/mL) se crecieron toda la noche en agitación constante (200 rpm) a 37°C.

Posteriormente, las clonas obtenidas fueron lisadas y procesadas para la purificación del los plasmidos mediante el kit de Wizard[®] Minipreps (Promega, corp.). Los plasmidos recombinantes fueron caracterizados por PCR, una vez confirmada la presencia de NSP4 en la construcción, las alícuotas de plásmidos se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Por otro lado, el gen de NSP4 en el plasmido pGEM-T fue subclonado en el vector de expresión pcDNA3.1/Hygro (Invitrogen,), en un radio 1:5 (vector:inserto), como se describió previamente. Las clonas se identificaron como positivas en base a su caracterización con enzimas de restricción, posteriormente fueron trasfectadas en células MA104 y se verificó la expresión del gen NSP4 por análisis con wesrtern blott.

5.7 Secuencias

Los plásmidos pGEM-NSP4 fueron cuantificados a 260 nm y se determinó una pureza 1.6-1.8 en base al radio de 260/280. De cada plásmido se utilizaron 750 nanogramos y 5 picomoles del primer pUCM13Forward o pUCM13 reverse en un volumen total de 16 µl. Las muestras listas para ser secuenciadas fueron enviadas a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM, en Cuernavaca, Morelos, México. En el IBT las muestras fueron secuenciadas por el método de secuenciación basado en fluorescencia Taq FS Dye Terminador, en el secuenciador ABIPRISM 310TM Genetic Analyzer. Cada plásmido fue secuenciado en sentido y antisentido. El análisis de las secuencias de DNA se realizó con el software sequencing Análisis 3.7 ABI PRISM (Applied Biosystem) y Clustal X.

5.8 Células

Las células MA104 utilizadas en este estudio se mantuvieron en congelación con D-MEM con suero, Suero Fetal Bovino al 20% y DMSO al 10% en nitrógeno

líquido (-195.8 °C) hasta su uso. Para descongelarlas se retiraron del nitrógeno líquido, se pasaron 500 µl de células del criotubo a un F25 y se adicionaron 4.5 ml de MEM enriquecido con 2 mM de L-Glutamina, 10mM de HEPES y 10% de Suero Fetal Bovino. Las células se incubaron a 37 °C en una ambiente de 5% de CO₂, después de 5 horas el medio se retiró y se adicionó medio de cultivo nuevo.

5.9 Expresión de NSP4 en células MA104

El gen de NSP4 de la cepa Wa fue amplificado por PCR con los primers EcoRVNSP41F y BamHINSP42R. El producto de PCR fue clonado en el vector pGEM-T (Promega Inc) y posteriormente subclonado en el vector de expresión en mamíferos pcDNA3.1(-)/Hygro (Invitrogen Inc). La verificación del inserto en su orientación adecuada se determinó con enzimas de restricción Bam HI y Eco RV (Invitrogen, Inc). El plásmido resultante fue denominado pcDNA-NSP4Wa el cual se utilizó para transfectar células MA104 para su posterior expresión, en base al protocolo de transfección que se describe brevemente a continuación:

1. Del medio de cultivo Opti-MEM[®] I (Invitrogen, Inc) a temperatura ambiente se tomaron 72 µl y se mezclaron con 9.5 µl de lipofectamine 2000 (Invitrogen Inc), se homogenizó por pipeteo suave (10 veces) y se incubó a 37 °C por 10 min.
2. Por otro lado, 4 µg de plásmido se mezclaron con 300 µl de Opti-MEM[®] I (Invitrogen Inc) y se homogenizó en vortex.

3. Se combinaron ambas mezclas (lipofectamine y el plásmido) se homogenizó por pipeteo y se incubó a temperatura ambiente por 20 min. Por último se adicionó medio Opti-MEM[®] I para obtener un volumen final de 700 μ l.
4. El plásmido y el agente de transfección se pusieron en contacto con una monocapa confluyente de células MA104 previamente lavada con PBS 1X.
5. Las células se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂ por 5 horas, posteriormente se les retiró el medio y se adicionaron 2 ml de MEM sin suero, y nuevamente se incubaron hasta su análisis.

5.10 Análisis de la proteína NSP4 por inmunotransferencia.

Para el análisis de la proteína NSP4 en los ensayos de expresión o silenciamiento en células MA104 se realizó un análisis de inmunotransferencia, utilizando anticuerpos específicos anti-NSP4 (Amablemente proporcionado por la Dra. Susana López del IBT de Cuernavaca Morelos). El protocolo se describe brevemente a continuación: A las células MA104 en placa de seis pozos se les retiró el medio de cultivo y se les adicionó 500 μ L de amortiguador de lisis (60 mM Tris HCl pH 6.8, 25% glicerol, 2% SDS, 14.4 mM 2 β -Mercaptoetanol, 0.1% azul de bromofenol). El lisado celular se incubó a 95 °C por 5 minutos, y 15 μ L de este lisado se cargaron en un gel de poliacrilamida al 12%, en la cámara de electroforesis vertical Mini-Protean[®] 3 cell (Biorad Inc.) con 350 ml de

amortiguador de-corrimento (25mM Tris base, 192 mM Glicina, 0.1% SDS, pH 8.3) y amperaje constante de 10 mAmp por 20 min. y 20 mAmp por una hora (fuente de poder Power Pac Basic, Biorad). Al concluir el corrimiento, el gel se retiró de la cámara de electroforesis y se enjuagó por 10 min junto con una membrana de nitrocelulosa en buffer de transferencia (25mM Tris base, 192 mM Glicina, 20% metanol), posteriormente el gel se colocó en un mini blot (EC Mini Blot Module, Thermo Scientific) y sobre el gel la membrana de nitrocelulosa (evitando la presencia de burbujas), se cerró el blot de tal manera que el papel de nitrocelulosa quedó orientado hacia el ánodo. El mini blot ya ensamblado se colocó en la cámara de transferencia donde se le adicionó buffer de transferencia y se sometió a 20 volts constantes por 2 horas. El papel de nitro celulosa se retiró del mini blot y se lavó con agua nanopura por 1 min, y se incubó a temperatura ambiente toda la noche en buffer bloqueo (PBS Ca²⁺ y Mg²⁺, 5% leche low fat), al día siguiente el papel de nitrocelulosa se lavó 2 veces (10 minutos cada lavado) en buffer de lavado (PBS Ca²⁺ y Mg²⁺, 0.1% leche low fat); después se le adicionaron 5 mL de anticuerpo anti-NSP4 (diluido 1:1,500 en buffer de lavado) y se incubó a 37° C por 1 hora y 30 minutos, se lavó el papel de nitrocelulosa por triplicado (5 minutos cada lavado) y se incubó a 37 °C con la proteína A conjugada HRP (diluida 1:1,500, GE Healthcare Life Science), por último se lavó la membrana de nitrocelulosa y se le adicionó 3 ml de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, Sigma-aldrich) para revelar la presencia y el corrimiento de las proteínas después de 10 min de incubación a temperatura ambiente la membrana de nitro celulosa se

enjuagó por 1 min en agua nanopura y se dejó secar en papel para el posterior análisis de los resultados.

5.11 Silenciamiento del gen NSP4 de Rotavirus Wa

El diseño de los RNA de interferencia pequeños (siRNA) se realizó en base a la secuencia del gen de NSP4 de la cepa Wa; considerando las especificaciones de Elbashir y colaboradores así como las indicaciones del proveedor (Invitrogen, corp.). Los siRNA se denominaron en base al primer nucleótido en la secuencia donde se alinean. El siRNA₅₄ reconoce la secuencia 5'-GCCGACCUCAACUACACAU-3' y el siRNA₃₂₉ la secuencia 5'-GCAACAGAUGGACAGAAUU-3'. El protocolo de transfección se realizó como a continuación se describe:

1. Se tomaron 12 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, corp.) y se mezclaron con 78 µl de Opti-MEM[®] I (GIBCO[®], Invitrogen corp.), se homogenizó por pipeteo suavemente 10 veces y se dejó incubar a 37 °C.
2. En otro tubo se homogenizó en vortex 12 µl de siRNA (20 µM) con 300 µl de Opti-MEM[®] I.
3. La mezcla 1 y 2 se combinaron en un solo tubo, se homogenizó y se incubó por 20 min a temperatura ambiente.
4. Después de la incubación se adicionaron 198 µl de Opti-MEM[®] I y se homogenizó suavemente por pipeteo.

5. Las células a transfectar (MA104 subconfluentes) se lavaron dos veces con MEM sin suero y se les adicionó la mezcla del agente de transfección y el siRNA (700 μ l para cada pozo en una placa de seis).
6. Las células se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂ por 5 horas.
7. Después de la incubación a las células se les retiró el medio y se les adicionó medio nuevo, 48 horas después de la transfección las células se infectaron con rotavirus Wa.

Infección de Células MA104 transfectadas con siRNA's

1. Para cada pocillo (placa de 6 pozos) se activaron 200 μ l de virus cepa Wa (MOI 0.03) con 1 μ l de tripsina al 1% (10 μ g/ml)
2. El lisado activado se incubó por 30 min a 37° C.
3. Las células en monocapa confluyente se lavaron por duplicado con PBS 1X estéril.
4. Posteriormente a la monocapa se le adicionó el lisado tripsinizado se homogenizó suavemente con movimientos circulares y se incubó por una hora a 37° C y 5% CO₂.
5. Después de la incubación se retiró medio, se adicionaron 2 ml de MEM sin suero y la placa se incubo nuevamente hasta su análisis (8-24 hrs).

5.12 Determinación de efecto citopático

El efecto citopático presente en células MA104 se determinó en base a la morfología celular con respecto a los ensayos de control.

5.13 Microtitulación de virus por tinción de focos infeccioso con inmunoperoxidasa

El lisado a titular (350 µl) se activó con 1 µl de tripsina al 1% y se incubó a 37 °C, 5%CO₂ por 30 minutos. Posteriormente, del lisado tripsinizado se prepararon diluciones 1:2 seriadas; 100 µl de lisado se diluyeron en 100 µl de MEM sin suero, se homogenizó esta dilución y se tomaron 100 µl para la siguiente dilución. Las diluciones resultantes fueron de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 y 1:256. Por otro lado, en una placa de 96 pozos la monocapa confluyente de células MA104 fue lavada por duplicado con PBS. A cada pocillo se le adicionaron 50 µl de lisado concentrado o diluido según corresponda a cada pocillo y se incubó por 1 hora a 37 °C. Se retiró el inoculo, se lavó la monocapa con 200 µl de PBS y se adicionaron 150 µl de MEM sin suero por cada pocillo; la placa se incubó por 12-14 horas a 37 °C y 5%CO₂. Después de este tiempo se retiró el medio de cultivo y se lavó la monocapa con PBS y se fijó con 100 µl de una solución de acetona al 80% en PBS por 30 min a temperatura ambiente. Las células se lavaron con PBS y se incubaron con 75 µl de anticuerpo anti-rotavirus diluido 1:3,000 por 1 hora a 37 °C. Posteriormente se lavaron las células con PBS y se les adicionó 75 µl de

anticuerpo anti-IgG peroxidasa (diluido 1:900) y se incubó por 1 hr a 37 °C. Se lavó la monocapa y se incubó por 10 min a 37 °C con 75 µl de sustrato (4 ml de buffer acetatos 0.05M pH 5, 10 µl de peróxido de hidrogeno al 30% y 1.5 ml de Carbazole 4mg/ml). Por último la reacción conjugado-sustrato se detuvo al retirar la reacción y sumergir las células en agua 4 veces. El conteo de focos infecciosos teñidos con inmunoperoxidasa se realizó en el microscopio invertido utilizando el objetivo 20X, el cálculo de las unidades formadoras de focos infecciosos por ml (uff/ml) se determinó en base a la siguiente fórmula:

$$\text{Uff/ml} = (\text{No. de focos})(\text{Objetivo})(\text{diámetro}^*)(\text{dilución}^{**})$$

* Diametro del pocillo en donde se realiza en conteo, el pocillo de una placa de 96 pozos es de 5.5 mm.

** La dilución en donde la cuenta de focos infecciosos es ≤ 200 focos.

6. RESULTADOS

6.1. Cepas de rotavirus de campo asociadas a gastroenteritis severa.

6.1.1 Detección de casos de gastroenteritis por rotavirus.

Los resultados mostraron que 66 (53.7%) de 123 muestras analizadas presentaron un corrimiento electroforético característico de rotavirus del grupo A.

6.1.2 Análisis de la severidad de la gastroenteritis por rotavirus.

De las 66 muestras que resultaron positivas para rotavirus se descartaron 15 debido a que la información con respecto a la sintomatología del menor estaba incompleta. Por tal motivo el análisis de la severidad de la gastroenteritis por rotavirus se realizó en 50 muestras positivas para rotavirus.

De los casos de gastroenteritis por rotavirus que se analizaron 28(56%) se asociaron a niños y 22 (44%) a niñas. Todos los niños presentaban diarrea de entre uno y cuatro días de duración. De ellos, 44(88%) tenían vómito y 35(70%) fiebre. Con respecto a la edad de los menores, 43 (86%) de los niños eran menores de dos años de edad.

El rango de edad que presentó mayor incidencia de rotavirus fue el de 7 a 12 meses (Tabla 2). El análisis comparativo de la sintomatología entre los rangos de edades se describe en la gráfica 1.

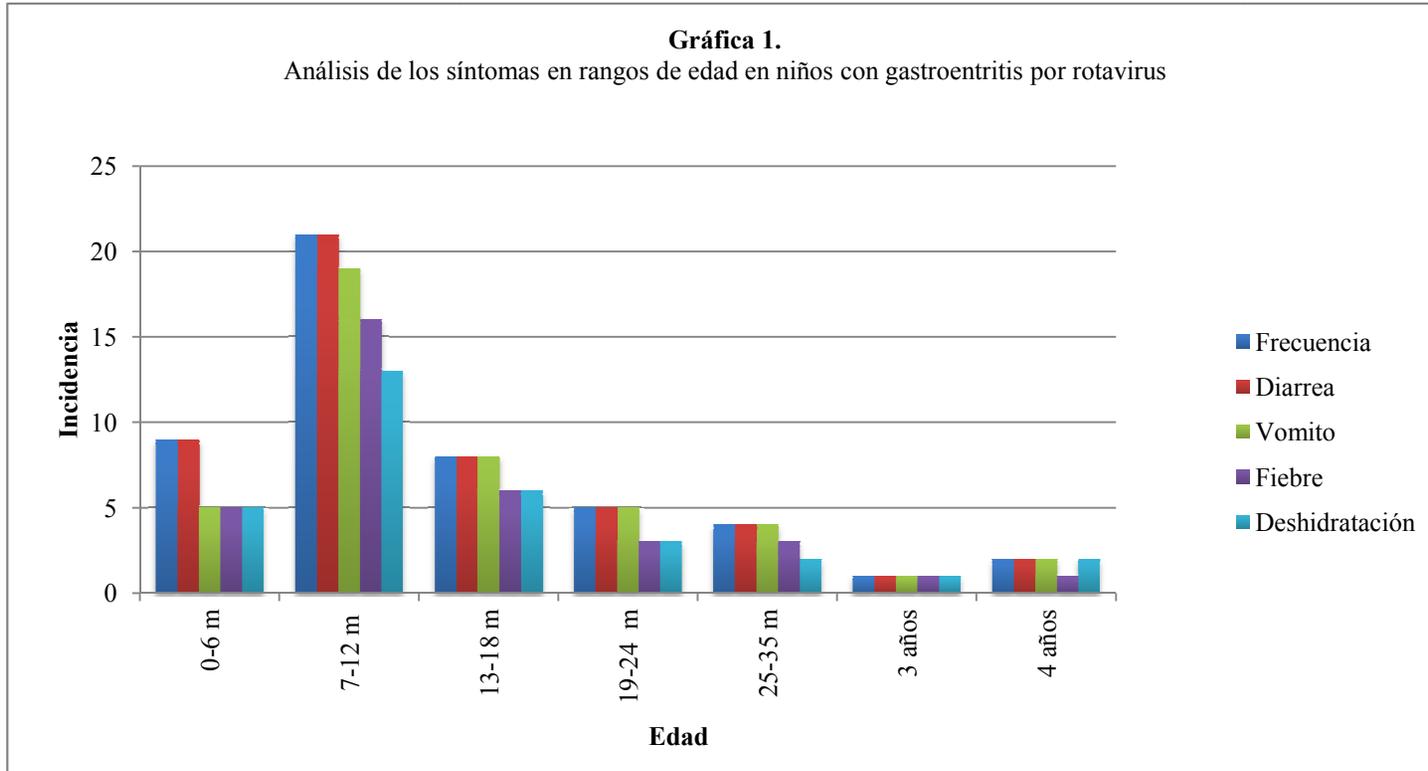
Por otro lado, en cuanto a la severidad de la gastroenteritis, un puntaje ≤ 10 se asoció a gastroenteritis leve, ≥ 11 a moderada y ≥ 15 a severa. Los resultados de este análisis mostraron que 13 (26%) de los casos con gastroenteritis por rotavirus se asociaron a una severidad ≤ 10 puntos, mientras que 23(46%) a ≥ 11 y 14 (28%) con ≥ 15 puntos, estas puntuaciones se asociaron con casos leves, moderados y severos respectivamente (Tabla 3).

Tabla 2.
Descripción de los síntomas presentes en niños menores de cinco años hospitalizados con gastroenteritis por rotavirus.

Edad	Frecuencia	Diarrea	Vómito	Fiebre	Deshidratación
0-6 meses	9	9	5	5	5
7-12 meses	21	21	19	16	13
13-18 meses	8	8	8	6	6
19-24 meses	5	5	5	3	3
25-35 meses	4	4	4	3	2
3 años	1	1	1	1	1
4 años	2	2	2	1	2
Total	50 (100%)	50(100%)	44(88%)	35(70%)	32(64%)

Gráfica 1.

Análisis de los síntomas en rangos de edad en niños con gastroenteritis por rotavirus



6.1.3. Genotipificación de NSP4 en cepas de rotavirus aisladas de campo.

El genotipo correspondiente a NSP4 se determinó mediante el uso de RT-PCR (transcriptasa reversa) y una PCR semianidada (Ward *et al*, 1997; Lee *et al*, 2000; Kudo *et al*, 2001). Por RT-PCR se amplificó el gen 10 que codifica para la proteína NSP4, el fragmento amplificado era de 750 pb o 700 pb dependiendo del juego de primers utilizado (Fig. 6a).

Posteriormente el producto de PCR se utilizó como molde para una PCR semianidada. En este ensayo se incluyó un primer externo y tres primers internos asociados a genotipos de E1, E2 y E3 de NSP4. Los resultados mostraron una amplificación de un segmento de 425 pb correspondiente al genotipo E1 (Fig. 6b). El análisis por PCR de las 66 muestras positivas para rotavirus indicó que 61 (92.4%) de las cepas presentaban genotipo E1 (anteriormente descrito como genotipo B).

6.1.4. Análisis de secuencia del gen NSP4

Para analizar la proteína NSP4 de algunas de las cepas de rotavirus se seleccionaron 16 muestras a secuenciar. La selección de estas muestras fue estratificada, al azar y se realizó en base a la clasificación de la severidad de la gastroenteritis. De las 13 muestras asociadas a gastroenteritis leves se seleccionaron 4(31%) para secuenciar, de los 23 casos moderados 7(30%) y de los 14 casos severos se seleccionaron 5(36%).

Tabla 3.

Análisis de la severidad de la gastroenteritis por rotavirus en niños menores de cinco años hospitalizados, los índices de severidad se determinaron en base a la escala propuesta por Ruuska y Vesikari (1991).

Severidad	Clasificación	Incidencia	Leche materna	Sexo		Edad*	Evacuaciones diarreicas*/24 h	Días con diarrea*	Episodios de vómito* / 24hrs	Días con vómito*
				M	F					
≤ 10	Leve	13 (26%)	61.5%	6	7	8	6.1	2.4	2.6	1.0
≥ 11	Moderado	23 (46%)	82.3%	15	8	12	8.1	3.1	4.8	2.7
≥ 15	Severo	14 (28%)	71.4%	7	7	14	10.4	4.3	9.3	3.6

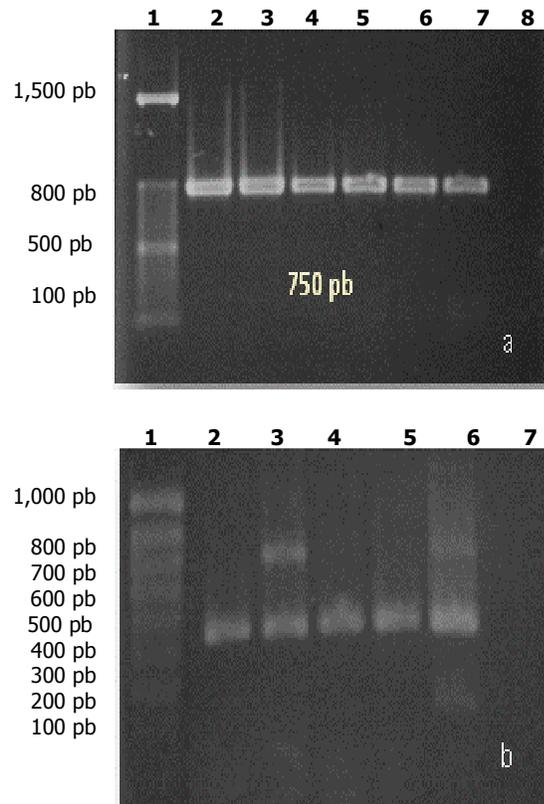


Fig.6 Amplificación del gen de NSP4 por RT-PCR, a) Carril 1: marcador de pares de bases, carril 2: amplificación del gen en la cepa Wa de referencia; carril 3-7: amplificación del gen en cepas de campo; carril 8: control negativo. b) Amplificación del segmento de 425 pb del gen de NSP4 característico del genotipo E1, en el carril 1: marcador de pares de bases; carril 2: cepa Wa; carril 3-6: cepas de campo; carril 7: control negativo.

Las 16 muestras seleccionadas para análisis de secuencia fueron sometidas a PCR para la amplificación del gen completo de NSP4, el producto de PCR fue clonado en el vector pGEM-T (Promega Inc, Madison, WI) y posteriormente fue secuenciado. El análisis de secuencia de nucleótidos (Fig.7) y de secuencia deducida de aminoácidos (Fig. 8) se realizó en con el programa ClustalW, el análisis filogenético se realizó en base al método neighbor-joining en base al programa MEGA 5.0 (Tamura *et al*, 2011).

El análisis filogenético de las secuencias de NSP4 mostró la formación de tres grupos dentro del mismo genotipo E1 (Fig. 9). En el grupo I se observaron las secuencias correspondientes a las muestras MX04-29, MX05-58 y MX05-126; en el grupo II las secuencias MX05-48, MX05-71, MX05-88, MX05-137, and MX05-144 y en el grupo III las secuencias MX04-27, MX04-28, MX05-36, MX05-51, MX05-64, MX05-68, MX05-107 y MX05-119.

El análisis de las secuencias de NSP4 reportadas en este estudio reveló que la mayoría de las variaciones estaban presentes en el extremo carboxil. En la mayoría de los casos las variaciones fueron consistentes dentro de un mismo grupo. Las variaciones de aminoácidos que se observaron en el grupo I (aa AK posiciones 136 y 137 respectivamente) se relacionaron con cepas de rotavirus reportadas en Italia, China, España, Estados Unidos y Rusia (Numero de acceso en GenBank ACF77154, AFU36983, ADU55685, ADO78536 y ACY01369). Las secuencias dentro del grupo II mostraron variaciones de aminoácidos (aa 141-145) similares a algunas secuencias reportadas en China, Rusia, Tailandia y Estados Unidos (AAOO6852, ACQ99541, AFQ20926, ADO78564). En el grupo III se observan variaciones en los aminoácidos 141,142, 144 y 145 en común con la cepa Vanderbilt aislada en Estados Unidos (AEB80046).

Fig. 7 Secuencias de nucleótidos del gen NSP4 en algunas de las cepas de rotavirus aisladas.

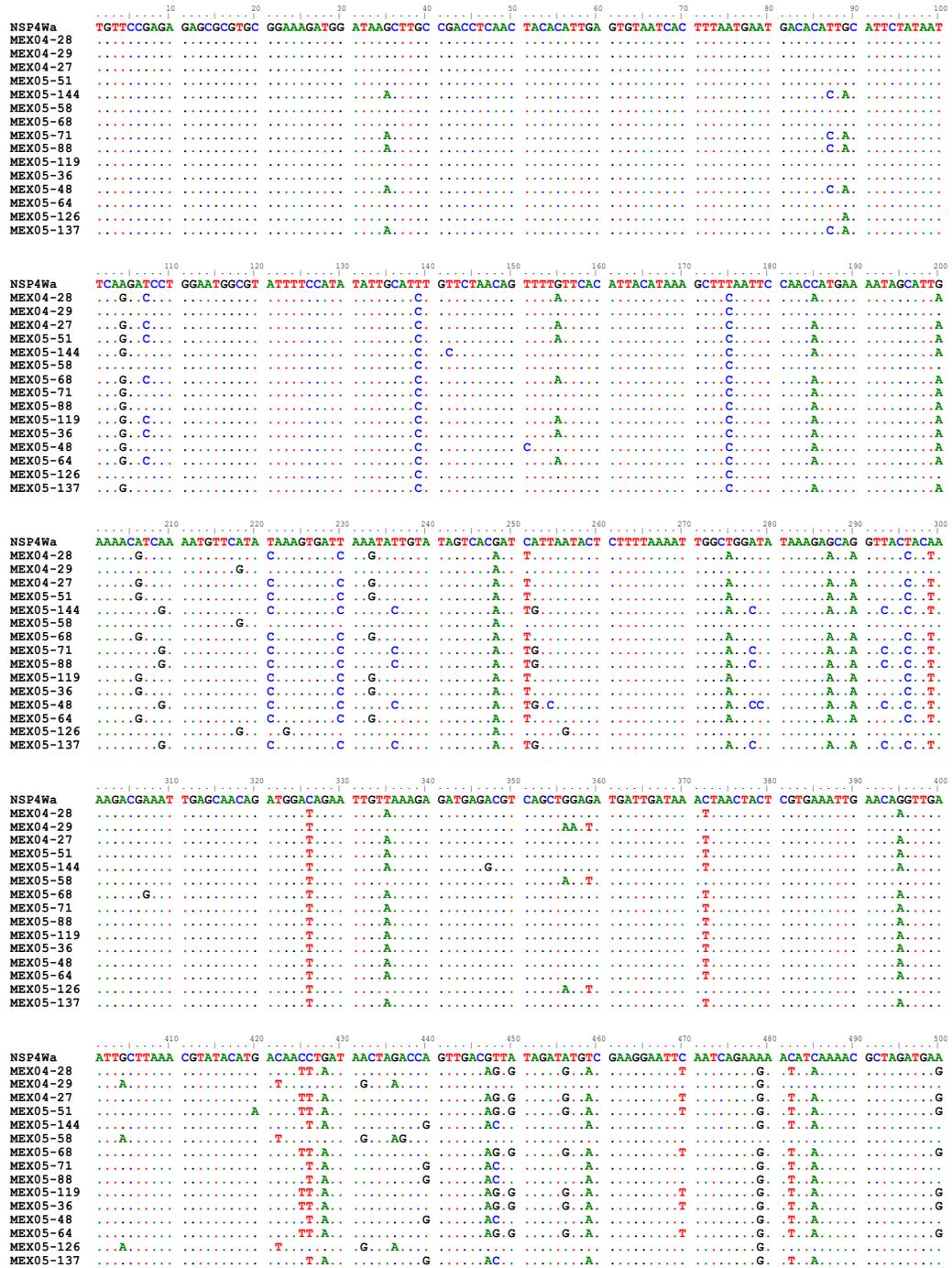


Fig. 8. Secuencias deducidas de aminoácidos de la proteína NSP4 de las cepas de rotavirus aisladas.

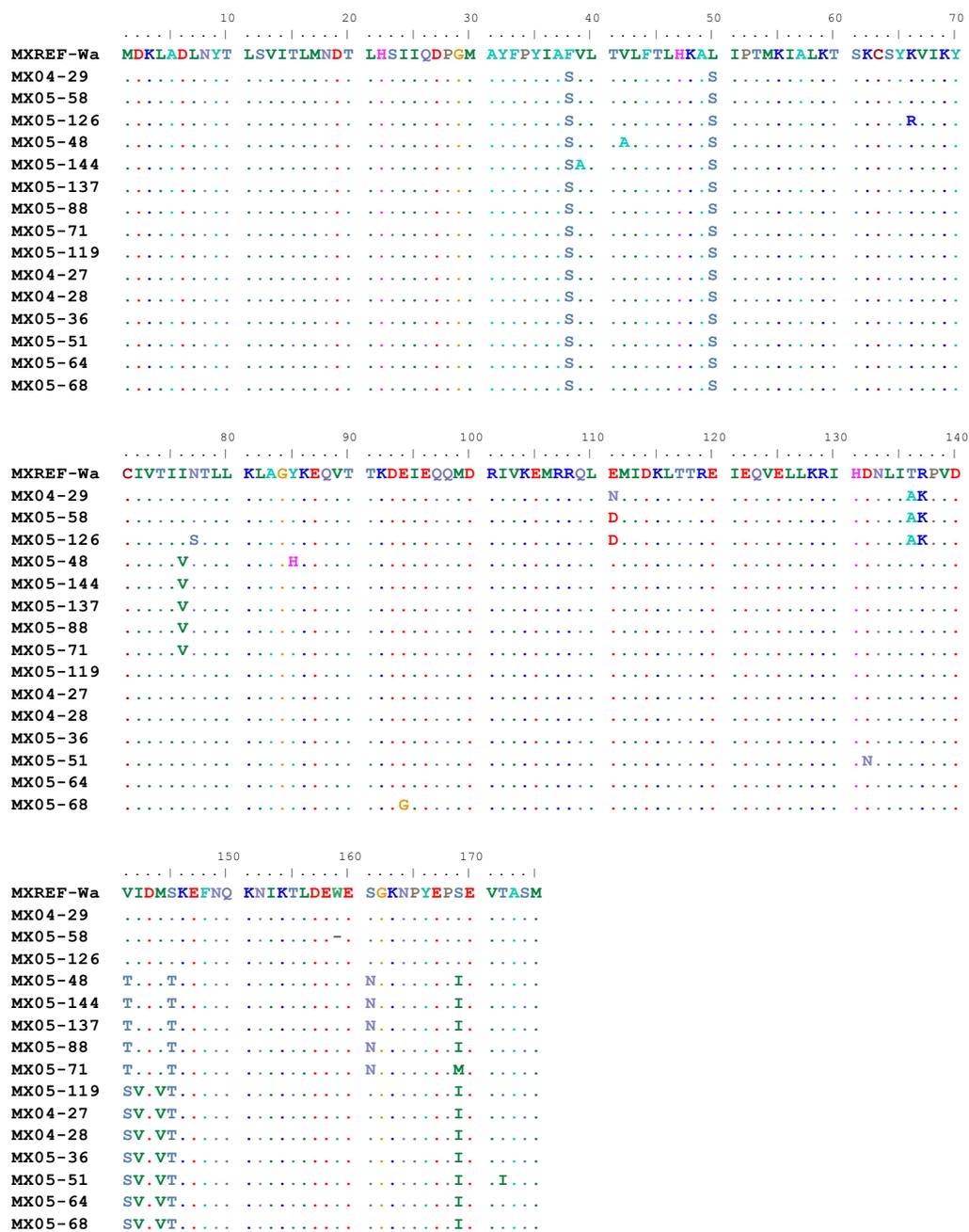
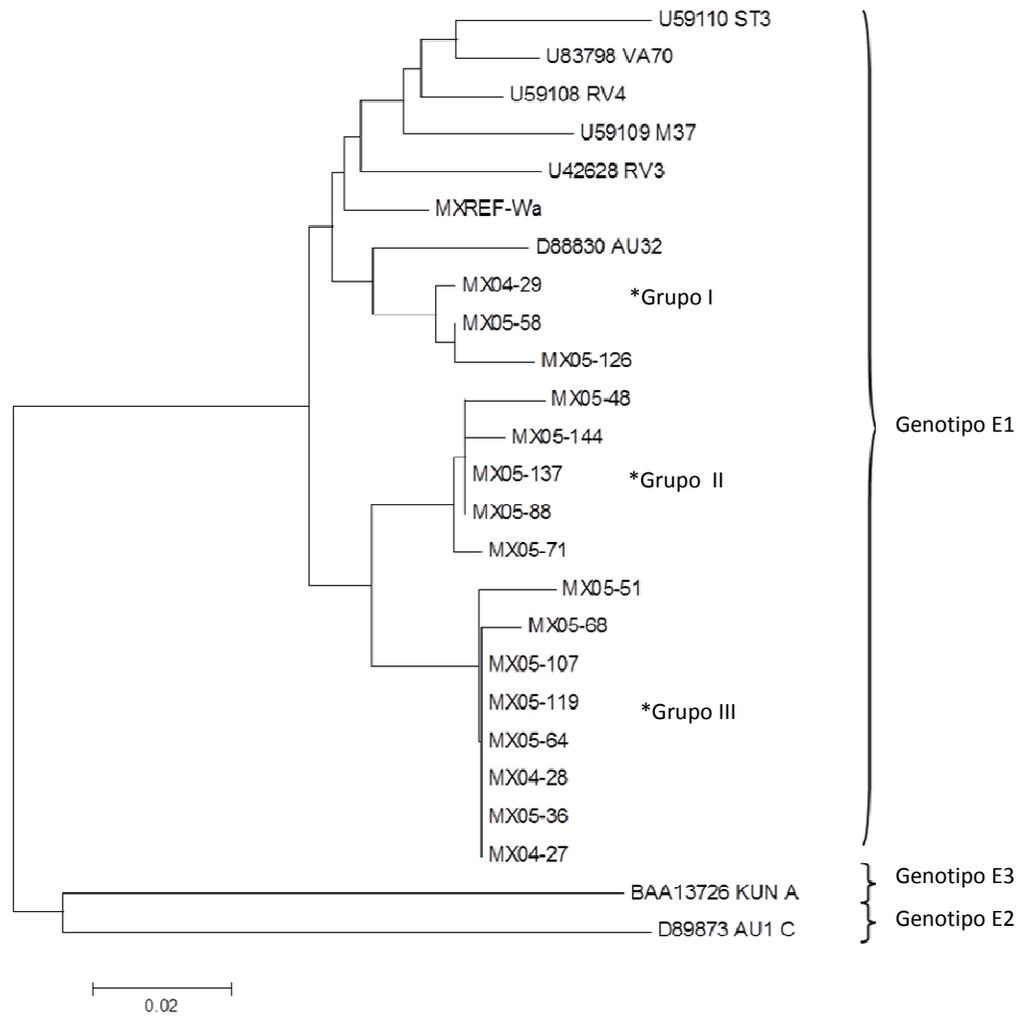


Fig. 9 Análisis filogenético de las secuencias deducidas de aminoácidos de NSP4 reportadas en este estudio y algunas reportadas previamente en GenBank.



Para determinar la frecuencia con la que se presentan variaciones en NSP4 se analizaron 349 secuencias de NSP4 reportadas en el GenBank. Este análisis mostró que NSP4 es una proteína muy conservada en algunos de sus dominios (Tabla 4). Entre los dominios altamente conservados están los sitios de glicosilación (aa 8 y 18), las regiones hidrofóbicas H1, H2 y H3 (aa 7-21, 29-47 y 67-85 respectivamente), la región transmembranal (aa 22-44) y el dominio alfa hélice superenrollado (aa 97-137).

Por otro lado, se observaron variaciones puntuales en el extremo carboxil. En la región de interacción con VP4 se observó en el aa 141 una Valina presente en una frecuencia del 58% de las secuencias analizadas. En la región donde NSP4 interacciona con VP6 se observó una Serina en la posición 169 con una frecuencia del 56% (Tabla 4). Aunque la mayoría de las variaciones se presentaron en el extremo carboxil, en las muestras MX04-29, MX05-58 and MX05-126 se presentaron variaciones puntuales en los aa 111, 136 y 137 (85.7%-92.8%) (Tabla 3). Así mismo, en las secuencias de NSP4 correspondientes al grupo III se observó una variación poco común en el aa 144, donde una Metionina es reemplazada por una Valina. En la mayoría de las secuencias analizadas el aa Metionina estuvo presente en dicha posición en un 97.9% de frecuencia (Tabla 4). Por otro lado, el análisis de secuencia de NSP4 con respecto a la severidad de la gastroenteritis no mostro relación alguna entre la severidad de la gastroenteritis por rotavirus y mutaciones en la proteína NSP4 (Tabla 5).

Las secuencias de nucleótidos de NSP4 de los aislados de rotavirus identificados en este estudio fueron reportados en el GenBank. Los números de acceso son los siguientes: MX04-28: JX458969, MX04-29: JX458970, MX04-27:JX458971, MX05-51:JX458972, MX05-144: JX458973, MX05-58: JX458974, MX05-68: JX458975, MX05-71:JX458976, MX05-88:JX458977, MX05-119:JX458978, MX05-107: JX458982, MX05-126: JX458983, MX05-137: JX458984.

Tabla 4.

Secuencia consenso de NSP4 y frecuencia de cada aminoacido en una posición determinada entre el aa 1 al 175. El análisis se realizó en base a 349 secuencias de NSP4 obtenidas del GenBank. Abreviaturas: GS sitio de glicosilación, H: dominio hidrofóbico.

		GS1																GS2			Región Transmembranal (22-44)					
Secuencia consenso	M	D	K	L	A	D	L	N	Y	T	L	S	V	I	T	L	M	N	D	T	L	H	S	I	I	
Frecuencia %	100	98.5	99.7	98	97.6	99.5	100	99.7	100	99.4	99.4	92.7	99.7	97.9	98.2	99	100	99.4	97.9	98.8	100	98.8	98.8	100	98.8	
Posición aa	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	
		Región Transmembranal (22-44)			H2 (29-47)																					
Secuencia consenso	Q	D	P	G	M	A	Y	F	P	Y	I	A	S	V	L	T	V	L	F	T	L	H	K	A	S	
Frecuencia %	97.6	99.7	100	100	96.4	100	100	100	97.8	100	98.8	100	99.7	99.4	100	100	99.4	99.4	99.7	98.4	100	99.4	99.4	100	99.4	
Posición aa	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	
																	H3 (aa 67-85)									
Secuencia consenso	I	P	T	M	K	I	A	L	K	T	S	K	C	S	Y	K	V	I	K	Y	C	I	V	T	I	
Frecuencia %	99.4	99.4	99.1	99	99.7	99.4	100	99.4	96.6	99.4	100	98.8	99.1	100	99.7	100	99.4	97.9	99.1	98.5	98.8	88.9	99.1	99.4	95.5	
Posición aa	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	
	H3 (67-85)										Dominio super enrollado (95-137)															
Secuencia consenso	I	N	T	L	L	K	L	A	G	Y	K	E	Q	V	T	T	K	D	E	I	E	Q	Q	M	D	
Frecuencia %	87.4	99.7	98.5	100	99.1	98.8	98.2	98.8	100	99.4	98.5	100	99.1	96.7	98.8	98	99.1	98.5	98.8	99.7	100	98.2	99.7	99.7	99.1	
Posición aa	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	
	Dominio super enrollado (95-137)											Sito de interacción con VP4 (112-148)														
Secuencia consenso	R	I	V	K	E	M	R	R	Q	L	E	M	I	D	K	L	T	T	R	E	I	E	Q	V	E	
Frecuencia %	99.7	98.8	99.1	99	99.7	99.4	99.7	100	98.5	99.7	93.4	99.4	99.7	99.1	99.1	100	100	98.8	99.1	99.7	99.7	99.7	99.7	99.4	100	
Posición aa	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	
	Dominio super enrollado (95-137)												Sito de interacción con VP4 (112-148)													
Secuencia consenso	L	L	K	R	I	H	D	N	L	I	T	R	P	V	D	V	I	D	M	S	K	E	F	N	Q	
Frecuencia %	99.4	100	99.7	99	99.7	92.8	99.1	78.6	100	90.7	93.4	87.1	78.4	88	89.8	58	76	99.4	97.9	64.3	99.1	99.1	97.3	99.1	100	
Posición aa	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	
																	Sito de interacción con VP6 (167-175)									
Secuencia consenso	K	N	I	K	T	L	D	E	W	E	S	G	K	N	P	Y	E	P	S	E	V	T	A	S	M	
Frecuencia %	98.8	99.7	94	93	100	99.7	98.2	99.1	100	95.8	77	99.7	97.6	99.1	100	100	99.1	100	56	99.1	99.4	99.7	100	98.8	100	

Tabla 5

Análisis de secuencia de la proteína NSP4 en relación con la severidad de la gastroenteritis.

Secuencia NSP4	Puntuación de severidad	Grupo	Distribución de variación de aminoácidos																	
			H3 *			TD	ACD *	E/VP4 *	VP4 *						VP6 *					
			76	77	85	94	111	132	136	137	141	142	144	145	161	169	172	173	174	175
MX04-29	16	I					N		A	K										
MX05-58	14	I					D		A	K										
MX05-126	16	I		V			D		A	K										
MX05-48	8	II	V		H						T				T	N		I		
MX05-144	13	II	V								T				T	N		I		
MX05-137	15	II	V								T				T	N		I		
MX05-88	16	II	V								T				T	N		I		
MX05-71	0	II	V								T				T	N		M		
MX04-27	11	III									S	V	V	T				I		
MX04-28	14	III									S	V	V	T				I		
MX05-36	8	III									S	V	V	T				I		
MX05-51	14	III						N			S	V	V	T				I	I	
MX05-64	12	III									S	V	V	T				I		
MX05-68	8	III				G					S	V	V	T				I		
MX05-107	14	III									S	V	V	T				I		
MX05-119	15	III									S	V	V	T		N		I		
Secuencia consenso (aa)			I	N	Y	E	E	D	T	R	V	I	M	S	S	S	T	A	S	M
Frecuencia (%)			86	99.7	99.4	99.1	89.4	99.4	92.8	85.7	56.2	75.9	99.4	61	76	56	100	100	99	100

6.2. Expresión de NSP4 de cepas de rotavirus asociadas a diversos grados de severidad de gastroenteritis.

Para proseguir con el análisis de la actividad de NSP4 como factor de patogénesis se amplificó por PCR el gen completo de NSP4 de las cepas de rotavirus Wa, MX04-29 y MX05-71. El producto de PCR de cada uno de los genes fue clonado en el vector pGEM-T, a su vez esta construcción se utilizó para subclonar el gen en el vector de clonación en células de mamíferos pcDNA3.1/Hygro. Cada una de las construcciones se denominó como pcDNA-NSP4Wa, pcDNA-NSP4/28, pcDNANSP4/29 y pcDNANSP4/71. Para comprobar la presencia del inserto en cada construcción se realizaron ensayos con enzimas de restricción y de PCR (Fig. 10).

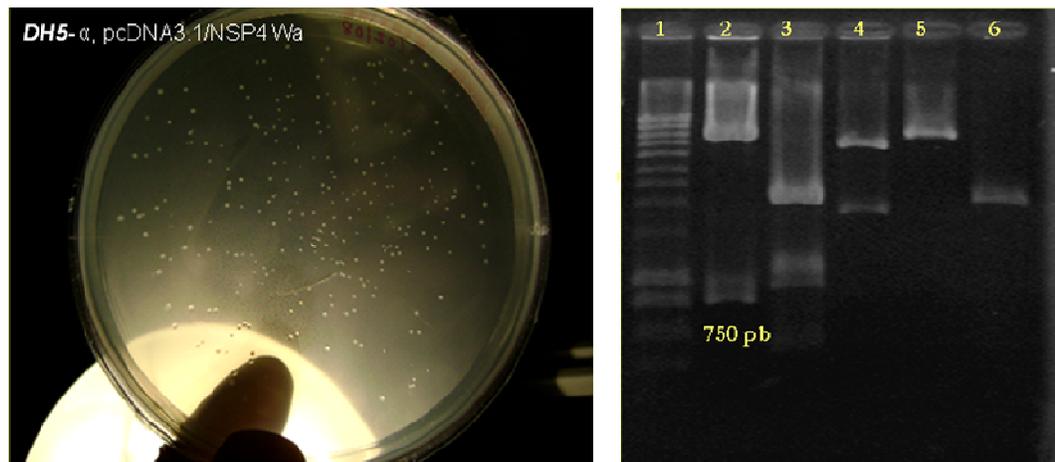


Fig. 10. Caracterización de los plásmidos pcDNANSP4. a) Clonas de DH5α transfectadas con el plásmido pcDNANSP4/Wa. b) Caracterización del plásmido con enzimas de restricción para verificar la presencia del inserto (750 pb) y la orientación adecuada del mismo.

Una vez que se caracterizó cada uno de los plásmidos con el gen de NSP4, se dio inicio a los ensayos de transfección del plásmido en células MA104. Para comprobar la expresión de NSP4 en células transfectadas se realizó un análisis de western blot (Fig. 11).

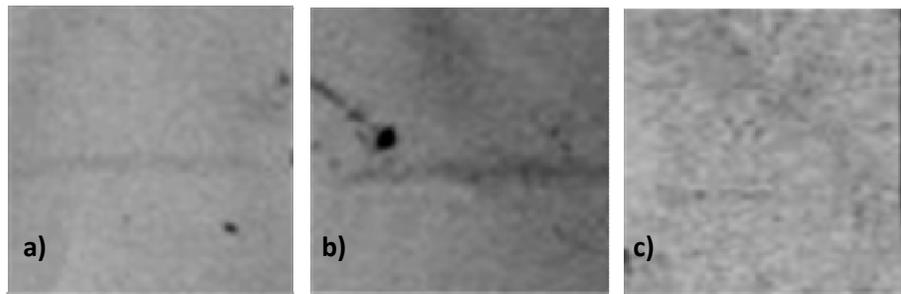


Fig. 11 Detección de la expresión de la proteína NSP4 mediante western blott. a) Expresión de NSP4 en células MA104 transfectadas con el plásmido pcDNANSP4/Wa. b) Expresión de NSP4 en células MA104 infectadas con Rotavirus Wa, c) Control negativo para la expresión de NSP4 en células MA104 sin infectar ni transfectar.

En diferentes ensayos se transfectaron los plásmidos pcDNA-NSP4/Wa, pcDNA-NSP4/29 y pcDNA-NSP4/71 en células MA104. Cada uno de los genes de NSP4 insertados en el plásmido pcDNA3.1 provienen de la cepa de rotavirus Wa, de la cepa de rotavirus de campo MX04-29 (asociada a gastroenteritis severa) y la cepa MX05-71 (asociada a un caso asintomático) respectivamente.

El análisis del efecto citopático de las células transfectadas con cada una de las construcciones del plásmido de expresión en células de mamíferos pcDNA-NSP4, se realizó en base a las características morfológicas de las células MA104

transfectadas con respecto a células en los ensayos mock (células expuestas al agente de transfección sin el plásmido de expresión). Los resultados mostraron un efecto citopático localizado en algunas áreas de la monocapa celular, particularmente en las células en las que se expresó NSP4-29 y NSP4-Wa. Por su parte, en las células que expresaron NSP4-71 no se observó efecto citopático localizado o generalizado (Fig. 12).

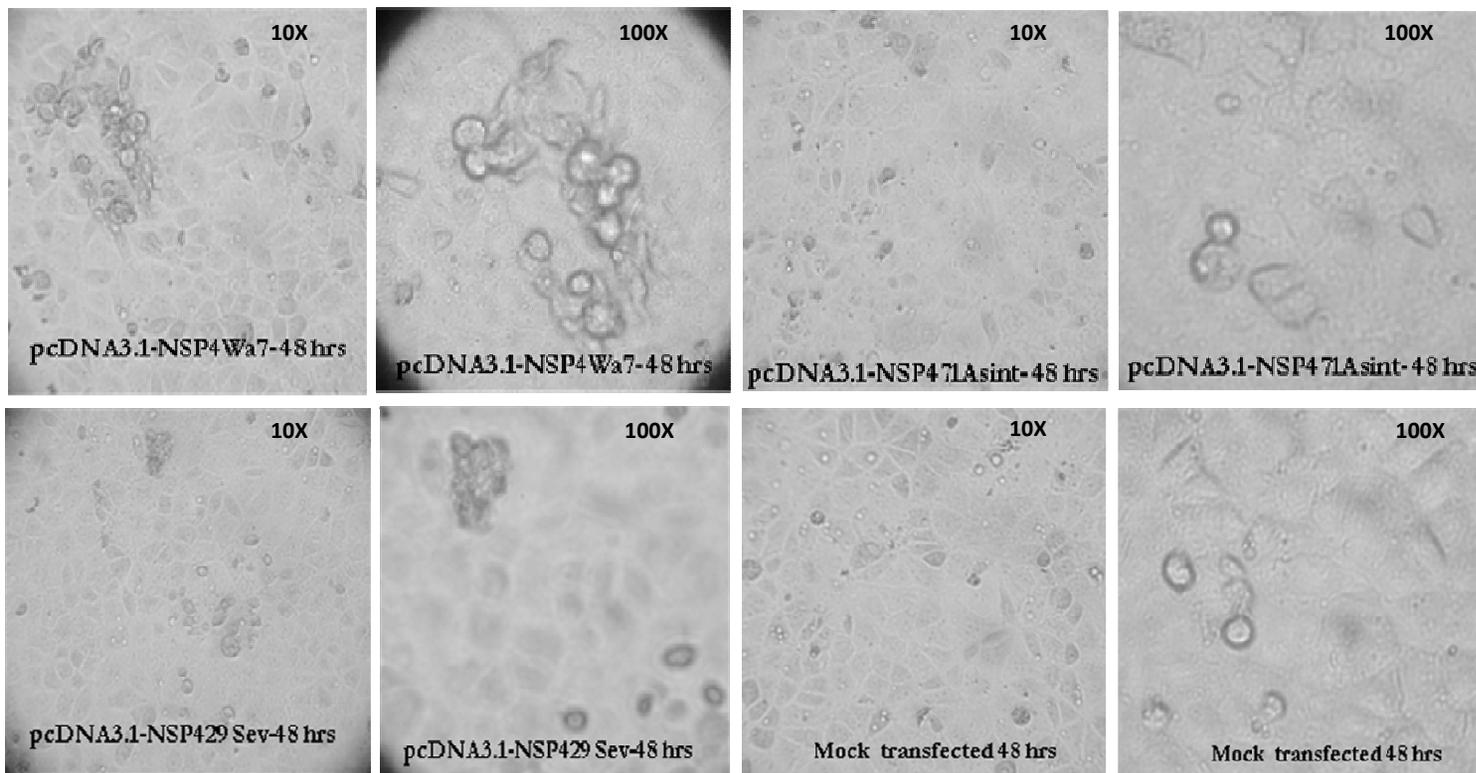


Fig.12 Efecto celular de la expresión de NSP4 en células MA104 transfectadas con los plásmidos pcDNA-NSP4/Wa, pcDNA-NSP4/29 y pcDNA-NSP4/71.

6.3 Silenciamiento de la expresión de NSP4 durante infección por rotavirus en células MA104.

6.3.1 Efecto citopático en células MA104 por infección con rotavirus

Para determinar el efecto citopático de rotavirus, se infectaron células MA104 con 0.03 UUF/célula. Después de la infección se observó un daño celular en la monocapa de las células infectadas a partir de las 12hr, la destrucción de la monocapa se observó a las 24 horas postinfección (Fig. 13). Así mismo, se analizó la expresión de la proteína NSP4 durante el proceso de infección y replicación en células MA104 (Fig. 14).

6.3.2 Silenciamiento de NSP4 en células MA104 infectadas con rotavirus

Debido a la importancia de NSP4 en procesos de morfogénesis y patogénesis viral se diseñaron RNAs de interferencia pequeños (siRNA) contra el gen que codifica para NSP4, con la finalidad de analizar el efecto de la reducción en la expresión de esta proteína. Los siRNA se diseñaron específicamente para inducir la degradación del RNAm de NSP4 en la cepa Wa de rotavirus durante el proceso infeccioso en células MA104. En los ensayos de silenciamiento se utilizaron dos pares de siRNAs dirigidos a diferentes regiones del RNAm, éstos siRNA se denominaron siRNA_54 y siRNA_329 (Tabla 6).

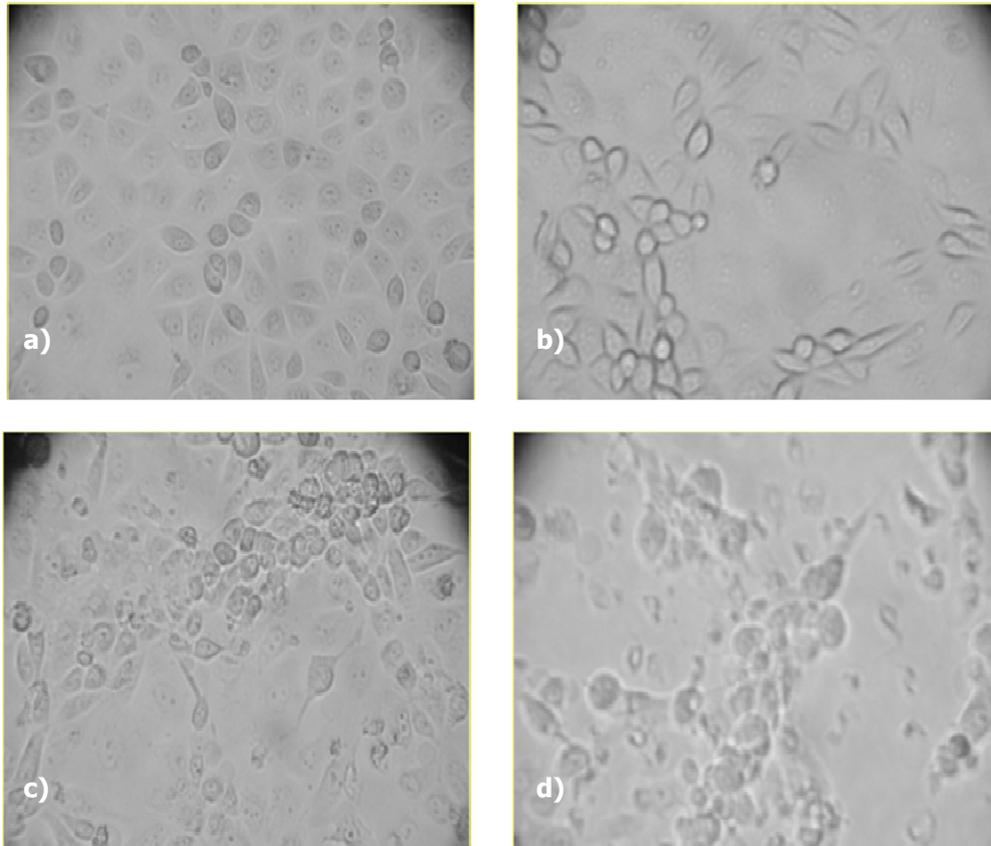


Fig. 13. Efecto citopático de rotavirus en células MA104 infectadas con 0.03 UFF/célula. a) Células después de 1 hr postinfección, b) Células después de 4 hrs postinfección, c) Células después de 12 hrs postinfección, d) Células después de 24 hrs postinfección.

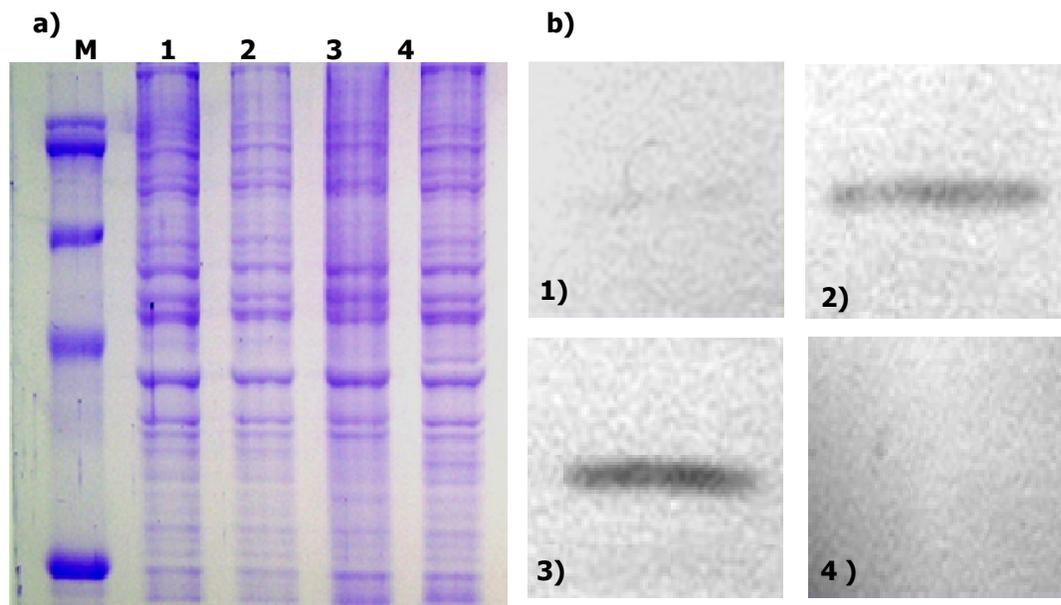


Fig.14. Expresión de NSP4 en células MA104 a diferentes tiempos postinfección con rotavirus Wa. a) Corrimiento electroforético de los lisados de células MA104 infectadas con rotavirus; carril 1, lisado de células MA104 obtenido a las 8 hrs postinfección; Carril 2, 12 hrs postinfección; carril 3, 24 hrs postinfección; carril 4, células MA104 sin infectar. b) Determinación de la expresión de NSP4 por western blott, 1) a las 8 hrs postinfección, 2) 12 hrs postinfección, 3) 24 hrs postinfección, 4) células sin infectar.

Las células MA104 fueron transfectadas con el siRNA_54 o con el siRNA_329 y posteriormente infectadas con rotavirus Wa. A las 24 horas postinfección las células se lisaron y se determinó el título viral mediante ensayo por tinción con inmunoperoxidasa (Fig. 15). El título viral en las células infectadas donde NSP4 se silenció se redujo entre un 35 y 50% con respecto a las células infectadas con rotavirus solamente (Tabla 6). El efecto del silenciamiento de la expresión de NSP4 se analizó por la observación de la morfología celular (Fig. 16).

Tabla 6.

Porcentaje de la inefectividad de rotavirus en células MA104 transfectadas con siRNA_54 o siRNA_329 y posteriormente infectadas con rotavirus Wa. La titulación de la carga viral se determinó por inmunotinción con peroxidasa.

Ensayo	% Infectividad
Control Rotavirus Wa (RvWa)	100%
siRNA_54 – RvWa	62.56 (± 8.30)
siRNA_329-RvWa	49.09 (±3.34)

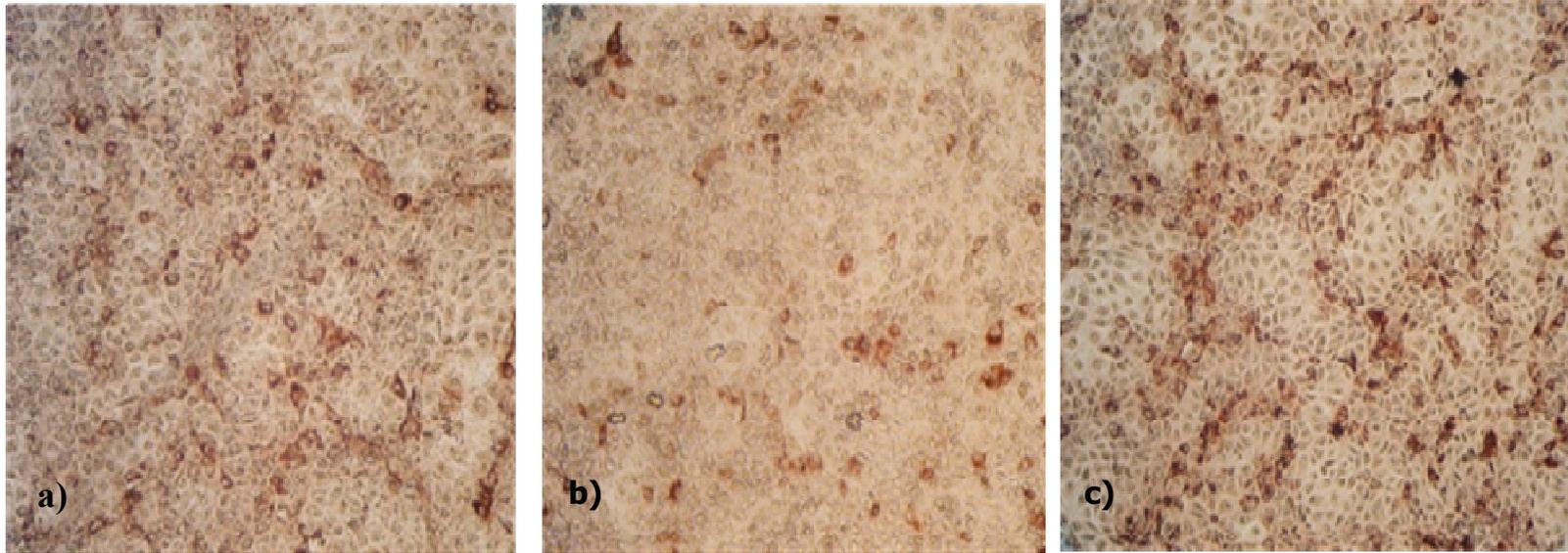


Fig. 15 Ensayos de titulación viral con inmunotinción con peroxidasa. a) Titulación viral de células transfectadas con siRNA_54 y posteriormente infectadas con rotavirus Wa. b) Titulación viral de células transfectadas con siRNA_329 y posteriormente infectadas con rotavirus Wa. c) Titulación viral de células expuestas al agente de transfección y posteriormente infectadas con rotavirus Wa.

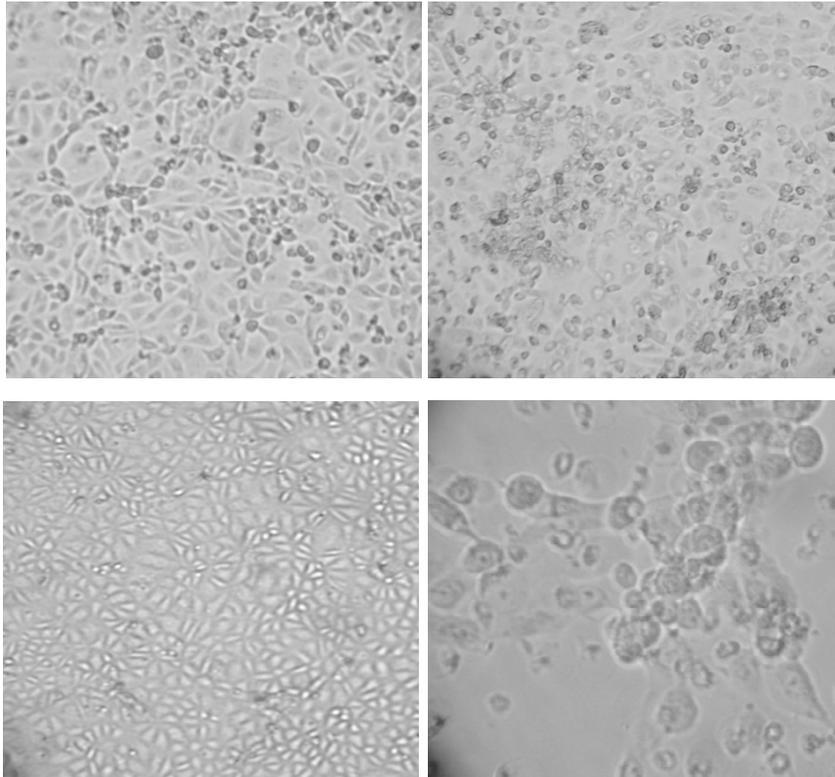


Fig.16 Efecto celular observado 24 hrs después de silenciar la expresión de NSP4 durante un proceso de infección viral. a) siRNA_54, b) siRNA_329, c) MOCK, d) células infectadas con rotavirus.

7. DISCUSIÓN

Rotavirus es uno de los principales agentes causantes de gastroenteritis en niños menores de cinco años. Se le relaciona con 453,000 muertes de niños a nivel mundial cada año (Parashar, 2006). Entre los síntomas frecuentes en una gastroenteritis por rotavirus están la diarrea, vómito y fiebre (Morris and Estes, 2001). Uno de los principales factores de patogénesis de rotavirus es la proteína NSP4, la cual se asocia a la inducción de diarrea (Ball *et al*, 1996).

Aunque en la proteína NSP4 se han caracterizado como enterotoxina en modelos animales (Estes, 2005). Aun no se ha descrito claramente la actividad de NSP4 como enterotoxina en cepas de rotavirus humanos, por tal motivo, en el presente trabajo se estudió NSP4 de cepas de rotavirus de niños hospitalizados con gastroenteritis por rotavirus. Las muestras de heces de niños con gastroenteritis fueron colectadas de Octubre de 2004 a Marzo del 2005. De un total de 123 muestras, analizadas por extracción de RNA viral y electroforesis, 66 (53.7%) resultaron positivas para rotavirus. Este se considera un porcentaje elevado debido a que en algunos estudios se relaciona a rotavirus con 25-39% de casos de niños hospitalizados por gastroenteritis (Parashar *et al*, 2006).

El análisis de la severidad de la gastroenteritis se realizó en base a la escala propuesta por Ruuska (1991). Por falta de información de los datos del menor, solo fueron consideradas 50 de las 66 muestras positivas para rotavirus. De los niños con gastroenteritis 28 (56%) eran varones y 22 (44%) niñas. El 86% de los casos se relacionó con niños menores de dos años, esto concuerda con reportes previos de brotes epidémicos por rotavirus, donde cerca del 81% de los niños con gastroenteritis son menores de dos años. (Linhares *et al*, 2008; Forster *et al*, 2009; Bruijning-Verhagen *et al*, 2012).

En los niños infectados con rotavirus en el 100% de los casos se presentó diarrea con una duración de 1 a 4 días, el vómito estuvo presente en 44(88%) casos y la fiebre en 35(70%) casos. El análisis de la severidad de la gastroenteritis por rotavirus mostró que 74% de los casos estuvieron relacionados con gastroenteritis moderada-severa con una puntuaciones de entre 11 y 15 en la escala de Ruuska. Aunque en estudios previos se ha relacionado a la toma de la leche materna con la atenuación de la severidad de la gastroenteritis por rotavirus, en este estudio no encontramos dicha relación (Clemens *et al*, 1993; Molyneaux, 1993; Raisler *et al*, 1999). Un factor a considerar con respecto a la lactancia es el tiempo y la frecuencia. En este estudio la mayoría de los menores se alimentaron de leche materna por corto periodo de entre 0 y 3 meses de edad. Por lo que la falta de relación de la lactancia con la atenuación de la gastroenteritis podría ser debido a este factor.

El análisis de la severidad de la gastroenteritis por rotavirus proporciona una base de comparación de brotes epidémicos entre brotes epidémicos previos y posterior a la vacuna en México (Ward *et al*, 2009). El programa de vacunación contra rotavirus ha

favorecido la reducción de hospitalización por casos de gastroenteritis por rotavirus de un 40 a un 60% (De Palma *et al*, 2010; Munos *et al*, 2010; Anderson *et al*, 2011). Estudios en América Latina también han mostrado la eficiencia de la vacuna en la atenuación de la severidad de la gastroenteritis por rotavirus (Salinas *et al*, 2005; Ruiz-Palacios *et al*, 2006).

Aunado al análisis de la severidad de la gastroenteritis por rotavirus se analizó la proteína NSP4 en los niveles de genotipo y secuencia. En este estudio, el genotipo predominante fue E1 en 61(92.4%) de las muestras analizadas. Este genotipo es comúnmente reportado en cepas de rotavirus humanos junto con los genotipos E2 y E3 (Tavares *et al*, 2008; Bányai *et al*, 2009; Vizzi *et al*, 2011; Ben Hadj Fredj *et al*, 2012). Otros genotipos de NSP4 poco comunes y reportados recientemente en rotavirus humanos son E3, E5, E6 y E13 (Rahman *et al*, 2007; Matthijnssens *et al*, 2008; Benati *et al*, 2010; Khamrin *et al*, 2010; Ghosh *et al*, 2011). No obstante, en este estudio no fue posible detectar estos genotipos poco comunes.

Por otro lado, se secuenció el gen de NSP4 de 16 muestras asociadas a diferentes grados de severidad de gastroenteritis según la escala de Ruuska. Se seleccionaron 4 (31%) de las muestras asociadas a casos leves, 7(23%) de casos moderados y 5(36%) de casos severos. Entre los resultados del análisis de secuencia se observó que no hay una relación entre variaciones en la proteína NSP4 y la severidad de la gastroenteritis. En este aspecto si la proteína NSP4 es el factor viral involucrado en la modulación de la severidad de la gastroenteritis, como se ha reportado previamente (Ball *et al*, 1996), la clave de esta misma actividad podría estar en su conformación estructural más que en variaciones en su secuencia de aminoácidos.

En el análisis filogenético de las secuencias de NSP4 se observó la presencia de tres grupos dentro de un mismo genotipo E1. Las variaciones dentro de cada grupo fueron puntuales y comunes entre sí. El grupo III mostró una variación poco común en la posición 144 donde una Metionina fue remplazada por una Valina. El análisis de 349 secuencias de NSP4 reportadas en el GenBank reveló que Metionina está presente en la posición 144 en un 97.9% de frecuencia, por lo que esta variación parece ser única en las secuencias reportadas en este estudio. El impacto que pueda tener éste cambio de metionina por otro aminoácido hidrofóbico como una valina puede no ser significativo porque ambos aminoácidos son importantes en el reconocimiento de ligandos como lípidos. Sin embargo, el átomo de azufre presente en la Metionina puede estar involucrado en la unión a metales, es este aspecto, es importante mencionar que en NSP4 se han caracterizado dominios de unión a metales entre los aa 114 y 135 (Betts *et al*, 2003; Bowma *et al*, 2000; Seo *et al*, 2008). Sin embargo, aún se requieren estudios para determinar el impacto de un cambio en un aminoácido tan conservado en NSP4.

En el presente estudio se determinó el efecto de la expresión de NSP4 de cepas de rotavirus humanos. Inicialmente se clonó el gen de NSP4 en el plásmido de expresión en mamíferos pcDNA3.1. Los plásmidos de expresión se realizaron con el gen de NSP4 de rotavirus Wa y con el gen NSP4 de las cepas MX04-29 y MX05-71. En los resultados se observó un efecto citopático en células donde se expresó la proteína NSP4 correspondiente a la cepa Wa y a las cepas MX04-29, ambas de cepas de rotavirus asociados a casos de gastroenteritis severa. En algunos estudios se asocia la

expresión de NSP4 con actividad citotóxica en *Escherichia coli*, en células de insectos (línea celular sf9) y en células MA104 y en células Caco-2 (Tian *et al*, 1996; Newton *et al*, 1997; Browne *et al*, 2000). El efecto citopático de NSP4 puede ser consecuencia del incremento intracelular del calcio, de una alteración o remodelación de los microtúbulos o la alteración en membranas. No obstante se requieren estudios adicionales para determinar el efecto de esta proteína en células no infectadas (Dong *et al*, 1997; Yang *et al*, 2012). Así mismo, se ha observado que el extremo carboxil de la proteína NSP4 parece estar involucrado en su actividad citotóxica. En este estudio se observaron variaciones en el extremo carboxil de la secuencia de NSP4 de la cepa MX05-71 que es asintomática con respecto a las secuencias de NSP4 en la cepa Wa y MX04-29 que asociaron a casos de gastroenteritis severa. Sin embargo, el único cambio en NSP4 en la cepa asintomática MX05-71 con respecto a todas las secuencias sintomáticas reportadas es este estudio está en el aa 169 donde una Serina es remplazada por una Metionina.

Por otro lado, para determinar si el efecto de la expresión de NSP4 en aspectos de morfogénesis y patogénesis puede ser modulado por NSP4 se realizaron ensayos con siRNA contra NSP4. Los resultados mostraron un efecto en la disminución de la producción viral, misma que se redujo entre un 38 y 51%. Así mismo, el efecto citotóxico disminuyó considerablemente. Ensayos realizados por López y colaboradores, con respecto a la modulación de la expresión de NSP4 de la cepa SA11 (rotavirus de simio) en células MA104 mostraron que la reducción de ésta proteína producía una acumulación de partículas virales incompletas (López *et al*, 2005). Otro efecto del silenciamiento de NSP4 fue la reducción del flujo de calcio

intracelular el cual se asocia a su vez al efecto citopático, aunque en este aspecto la proteína VP7 también parece estar involucrada en alteraciones en la homeostasis del calcio intracelular pero en menor proporción que NSP4 (Zambrano *et al*, 2008).

En el presente estudio, el análisis de la proteína NSP4 se realizó en base a la caracterización de la proteína en cepas de campo, su actividad al expresarse en células MA104 en ausencia de proteínas virales y las consecuencias de la modulación de su expresión. Aunque el análisis de secuencia no relacionó a NSP4 con la severidad de la gastroenteritis, el efecto citotóxico de esta proteína se hizo evidente en los ensayos donde se analizó el efecto de la expresión de NSP4 en células MA104. Sin embargo, aún se requieren de más estudios para elucidar si el efecto de la expresión de NSP4 es el mismo durante el proceso infeccioso y determinar si la patogénesis de rotavirus se asocia exclusivamente a NSP4 y por consecuencia, si NSP4 puede ser considerada para estrategias enfocadas en la modulación de la severidad de la gastroenteritis por rotavirus.

8. CONCLUSIÓN

El análisis de secuencia de la proteína NSP4 de cepas de rotavirus humano reveló la presencia de variaciones intragenotípicas en el genotipo E1. Estas variaciones de aminoácidos fueron puntuales y consistentes dentro de cada grupo. Así mismo el análisis de secuencias de NSP4 reportadas en GenBank sugiere que aunque NSP4 presenta varios dominios muy conservados puede variar por acumulación de mutaciones puntuales. La expresión de NSP4 de cepas de rotavirus humanas asociadas a casos severos y un caso asintomático mostró una marcada diferencia en el efecto citopático. Aunque la expresión de NSP4 correspondiente a la cepa asintomática no causó daño celular aparente aún se requieren de más estudios para determinar si la atenuación de la citotoxicidad reside en la variación del aa169 donde una serina es reemplazada por metionina. Por su parte, el silenciamiento de NSP4 durante el proceso infeccioso se asocia a la modulación del proceso de replicación viral y al efecto citopático de rotavirus. Esto parece indicar que la actividad de NSP4 como enterotoxina puede residir en su conformación más que en variaciones puntuales en su secuencia.

9. LITERATURA CITADA

Altenburg BC, Graham DY, Estes MK. 1980. Ultrastructural study of rotavirus replication in cultured cells. *J Gen Virol.* 46:75–85.

Anderson E, Rupp A, Shulman S, Wang D, Zheng X, Noskin, G. 2011. Impact of rotavirus vaccination on hospital-acquired rotavirus gastroenteritis. *Pediatrics.* 127, e264–e270.

Ansari SA, Sattar SA, Springthorpe VS, Wells GA, Tostowaryk W. 1988. Rotavirus survival on human hands and transfer of infectious virus to animate and nonporous inanimate surfaces. *J Clin Microbiol* 26:1513-8.

Au KS, Chan WK, Burns JW, Estes MK. 1989. Receptor activity of rotavirus nonstructural glycoprotein NS28. *J Virol.* 63:4553-62.

Ball JM, Mitchell DM, Gibbons TF, Parr R. 2005. Rotavirus NSP4: A Multifunctional Viral Enterotoxin. *Viral Immunol.* 18: 27–40.

Ball JM, Tian P, Zeng CQ, Morris AP, Estes MK. 1996. Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science.* 272:101–104.

Bányai K, Bogdán A, Szucs G, Arista S, De Grazia S, Kang G, Banerjee I, Iturriza-Gómara M, Buonavoglia C, Martella V. 2009. Assignment of the group A rotavirus NSP4 gene into genotypes using a hemi-nested multiplex PCR assay: a rapid and reproducible assay for strain surveillance studies. *J Med Microbiol.* 58, 303–311.

Ben Hadj Fredj M, Zeller M, Fodha I, Heylen E, Chouikha A, Van Ranst M, Matthijssens J, Trabelsi A. 2012. Molecular characterization of the NSP4 gene of human group A rotavirus strains circulating in Tunisia from 2006 to 2008. *Infect Genet Evol.* 12: 997-1004.

Benati FJ, Maranhao AG, Lima RS, da Silva RC, Santos N. 2010. Multiple-gene characterization of rotavirus strains: evidence of genetic linkage among the VP7-, VP4-, VP6-, and NSP4-encoding genes. *J Med Virol.* 82: 1797–1802.

Bergmann C, Maass CD, Poruchynsky MS, Atkinson PH, Bellamy AR. 1989. Topology of the non-structural rotavirus receptor glycoprotein NS28 in the rough endoplasmic reticulum. *EMBO Journal* 8:1695-703.

Betts MJ, Russell RB, Amino Acid properties and Consequences of Substitutions. In *Bioinformatics for Geneticists*; Barnes, M.R., Gray, I.C., Eds; Wiley: New York, New York, USA, 2003.

Bishop R. Davidson FGP, Holmes IH, Ruck BJ. 1973. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet.* 2:1281-3.

Boshuizen JA, Reimerink JHJ, Korteland-Van Male AM, van Ham VJJ, Koopmans MPG, Buller HA, Dekker J, Einerhand AWC. 2003. Changes in small intestinal homeostasis, morphology, and gene expression during rotavirus infection of infant mice. *J Virol.* 77: 13005-13016.

Boshuizen JA, Rossen JWA, Sitaram CK, Kimenai FFP, Simons-Oosterhuis Y, Laffeber C, Büller HA, Einerhand AWC. 2004. The rotavirus enterotoxin NSP4 binds to the extracellular matrix proteins laminin- β 3 and fibronectin. *J Virol.* 78:10045-53.

Bonsdorf CHV, Svensson L. 1988. Human serogroup C rotavirus in Finland. *Scand J Infect Dis.* 20:475–478.

Bowman GD, Nodelman IM, Levy O, Lin SL, P. Tian TJ, Zamb SA, Udem B, Venkataraghavan, Schutt CE.. 2000. Crystal structure of the oligomerization domain of NSP4 from rotavirus Reveals a Core Metal-binding Site. *Journal of Molecular Biology.* 304:861-871.

Bruijning-Verhagen P, Quach C, Bonten M. 2012. Nosocomial Rotavirus Infections: A Meta-analysis. *Pediatrics.* 129: 1011–1019.

Browne EP, Bellamy AR, Taylor JA. 2000. Membrane-destabilizing activity of rotavirus NSP4 is mediated by a membrane-proximal amphipathic domain. *J Gen Virol.* 81: 1955-1959.

Bugarcic A, Taylor JA. 2006. Rotavirus Nonstructural Glycoprotein NSP4 Is Secreted from the Apical Surfaces of Polarized Epithelial Cells. *J Virol.* 80: 12343–12349.

Chizhikov V, Patton JT. (2000). A four-nucleotide translation enhancer in the 39-terminal consensus sequence of the nonpolyadenylated mRNAs of rotavirus. *RNA* 6:814–825.

Clemens J, Rao M, Ahmed F, Ward R, Huda S, Chakraborty J, Yunus M, Khan MR, Ali M, Kay B, *et al.* 1993. Breastfeeding and the risk of life-threatening rotavirus diarrhea: Prevention or postponement? *Pediatrics.* 92: 680–685.

Cohen J, Laporte J, Charpilienne A, Scherrer R. 1979. Activation of rotavirus RNA polymerase by calcium chelation. *Arch Virol.* 60:177-86.

Correia J, Patel M, Nakagomi O, Montenegro F, Germano E, Correia N, Cuevas L, Parashar U, Cunliffe N, Nakagomi T. 2010. Effectiveness of monovalent rotavirus vaccine (Rotarix) against severe diarrhea caused by serotypically unrelated G2P[4] strains in Brazil. *J Infect Dis.* 201:363-369.

Davidson GP, Gall DG, Petric M, Butler DG, Hamilton JR. 1977. Human rotavirus enteritis induced in conventional piglets. Intestinal structure and transport. *J Clin Invest.* 60:1402-9.

De Palma O, Cruz L, Ramos H, de Baires A, Villatoro N, Pastor D, de Oliveira LH, Kerin T, Bowen M, Gentsch J, *et al.* 2010. Effectiveness of rotavirus vaccination against childhood diarrhoea in El Salvador: Case-control study. *BMJ.* 340:2825–2832.

Dector MA, Romero P, Lopez S, Arias CF. 2002. Rotavirus gene silencing by small interfering RNAs. *EMBO Rep.* 3:1175-80.

Denisova E, Dowling R, LaMonica R, Shaw S, Scarlata F, Ruggeri, Mackow ER. 1999. Rotavirus Capsid Protein VP5* Permeabilizes Membranes. *J Virol.* 73:3147-3153.

Dennehy PH. 2008. Rotavirus Vaccines: an Overview. *Clin Microbiol Rev.* 21:198-208.

Didsbury A, Wang C, Verdon D, Sewell MA, McIntosh JD, Taylor JA. 2011. Rotavirus NSP4 is secreted from infected cells as an oligomeric lipoprotein and

binds to glycosaminoglycans on the surface of non-infected cells. *Virology* 8:551-561.

Estes, M. 2001. Rotaviruses and their replication. En: D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, and S. E. Strais (ed.). *Fields virology*. 4th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, Pa. pp. 1747–1785.

Estes MK, Cohen J. 1989. Rotavirus gene structure and function. *Microbiological Reviews* 53:410-49.

Fabbretti, E., I. Afrikanova, F. Vascotto, and O. R. Burrone. 1999. Two non-structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures in vivo. *J Gen Virol*. 80:333-9.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391: 806–811.

Forster J, Guarino A, Parez N, Moraga F, Román E, Mory O, Tozzi AE, López de Aguilera A, Wahn U, Graham C, et al. 2009. Hospital-Based Surveillance to Estimate the Burden of Rotavirus Gastroenteritis Among European Children Younger Than 5 Years of Age. *Pediatrics*.123: 393–400.

Fuentes-Panana EM, Lopez S, Gorziglia M, Arias CF. 1995. Mapping the hemagglutination domain of rotaviruses. *J Virol*. 69:2629-2632.

Gallegos CO, Patton JT. 1989. Characterization of rotavirus replication intermediates: a model for the assembly of single-shelled particles. *Virology* 172:616-27.

Gonzalez RA, Torres-Vega M, Lopez S, Arias CF. 1998. In vivo interactions among rotavirus nonstructural proteins. *Arch Virol*.143:981-96.

Gorziglia M, Larralde G, Kapikian AZ, Chanock RM. 1990. Antigenic relationships among human rotaviruses as determined by outer capsid protein VP4. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87:7155–7159.

Ghosh S, Gatheru Z, Nyangao J, Adachi N, Urushibara N, Kobayashi N. 2011. Full genomic analysis of a simian SA11-like G3P[2] rotavirus strain isolated from an asymptomatic infant: identification of novel VP1, VP6 and NSP4 genotypes. *Infect Genet Evol*. 11:57–63.

Graham KL, Halasz P, Tan Y, Hewish MJ, Takada Y, Mackow ER, Robinson MK, Coulson BS. 2003. Integrin-using rotaviruses bind alpha2beta1 integrin alpha2 I domain via VP4 DGE sequence and recognize alphaXbeta2 and alphaVbeta3 by using VP7 during cell entry. *J Virol.* 77:9969-78.

Guerrero CA, Mendez E, Zarate S, Isa P, Lopez S, Arias CF. 2000. Integrin $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ mediates rotavirus cell entry. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97:14644-9.

Grasset E, Pinto M, Dussaulx E, Zweibaum A, Desjeux JF. 1984. Epithelial properties of human colonic carcinoma cell line Caco-2: electrical parameters. *Am J Physiol Cell Physiol.* 247:C260-267.

Greenberg H, McAuliffe V, Valdesuso J, Wyatt R, Flores J, Kalica A, Hoshino Y, Singh N. 1983. Serological analysis of the subgroup protein of rotavirus, using monoclonal antibodies. *Infect Immun* 39:91–99.

Halaihel N, Lievin V, Alvarado F, Vasseur M. 2000. Rotavirus infection impairs intestinal brush-border membrane Na₊-solute cotransport activities in young rabbits. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 279: G587–G596.

Holmes IH, Bishop R, Davidson GP. 1975. Infantile enteritis viruses morphogenesis and morphology. *J Virol.* 16:937–943.

Horie Y, Masamune O, Nakagomi O. 1997. Three major alleles of rotavirus NSP4 proteins 231 identified by sequence analysis. *J Gen Virol.* 78:2341-2346.

Isa P, Lopez S, Segovia L, Arias CF. 1997. Functional and structural analysis of the sialic acid-binding domain of rotaviruses. *J Virol.* 71:6749-56.

Iturriza-Gómara M, Wong C, Blome S, Desselberger U, Gray J. 2002. Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. *J Virol.* 76:6596–6601.

Jourdan N, Brunet JP, Sapin C, Blais A, Cotte-Laffitte J, Forestier F, Quero AM, Trugnan G, Servin AL. 1998. Rotavirus Infection Reduces Sucrase-Isomaltase Expression in Human Intestinal Epithelial Cells by Perturbing Protein Targeting and Organization of Microvillar Cytoskeleton. *J Virol.* 72: 7228–7236.

Jourdan N, Maurice M, Delautier D, Quero AM, Servin AL, Trugnan G. 1997. Rotavirus is released from the apical surface of cultured human intestinal cells through nonconventional vesicular transport that bypasses the Golgi apparatus. *J Virol.* 71:8268-8278.

Kattoura MD, Chen X, Patton JT. 1994 . The rotavirus RNA binding protein NS35 (NSP2) forms 10S multimers and interacts with the viral RNA polymerase. *Virology*. 202: 803-813.

Kattoura MD, Clapp LL, Patton JT. 1992. The rotavirus non structural protein NS35, possesses RNA-binding activity *in vitro* and *in vivo*. *Virology*. 192: 698-708.

Khamrin P, Maneekarn N, Malasao R, Nguyen TA, Ishida S, Okitsu S, Ushijima H. 2010. Genotypic linkages of VP4, VP6, VP7, NSP4, NSP5 genes of rotaviruses circulating among children with acute gastroenteritis in Thailand. *Infect Genet Evol*. 10:467-472.

Kudo S, Zhou Y, Cao X, Yamanishi S, Nakata S, Ushijima H. 2001. Molecular characterization in the VP7, VP4 and NSP4 genes of human rotavirus serotype 4 (G4) isolated in Japan and Kenya. *Microbiol Immunol*. 45:167-171.

Lawton JF, Estes MK, Prasad V. 2001. Identification and characterization of a transcription pause site in rotavirus. *J Virol*. 75:1632-1642.

Lee C, Wang Y, Kao C, Zao C, Lee C, Chen H. 2000. NSP4 gene analysis of rotaviruses 236 recovered from infected children with and without diarrhea. *J Clin Microbiol*. 38: 4471-237 4477.

Leonard JN, Schaffer DV. 2006. Antiviral RNAi therapy: emerging approaches for hitting a moving target. *Gene Therapy & Nature Publishing Group*. 13: 532-540.

Linhares A, Velázquez F, Pérez-Schael I, Sáez-Llorens X, *et al*. 2008. Efficacy and safety of an oral live attenuated human rotavirus vaccine against rotavirus gastroenteritis during the first 2 years of life in Latin American infants: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase III study. *The Lancet*. 371: 1181 – 1189.

Lopez S, Arias CF. 2004. Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends in Microbiology*. 12:271-8.

Lopez T, Camacho M, Zayas M, Najera R, Sanchez R, Arias CF, Lopez S. 2005. Silencing the morphogenesis of rotavirus. *J Virol*. 79:184-92.

López T, Silva D, López S, Arias C. 2007. RNA de interferencia: el silencio de los genes. *Biotechnología*. 14:109-118.

Lundgren O, Peregrin AT, Persson K, Kordasti S, Uhnöo I, Svensson L. 2000. Role of the enteric nervous system in the fluid and electrolyte secretion of rotavirus diarrhea. *Science*. 287:491–495.

Maass DR, Atkinson PH. 1990. Rotavirus proteins VP7, NS28, and VP4 form oligomeric structures. *J Virol*. 64:2632-41.

Mackow ER, Shaw RD, Matsui SM, Vo PT, Dang MN, Greenberg HB. 1988. 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 USA*. 85:645-649.

Maruri-Avidal L, Lopez S, Arias C. 2008. Endoplasmic reticulum chaperones are involved in the morphogenesis of rotavirus infectious particles. *J Virol*. 82:5368–5380.

Mirazimi A, Nilsson M, Svensson, L. 1998. The molecular chaperone calnexin interacts with the 214 NSP4 enterotoxin of rotavirus *in vivo* and *in vitro*. *J Virol*. 72, 8705–8709.

Matthijnssens J, Ciarlet M, McDonald SM, Attoui H, Bányai K, Brister JR, Buesa J, Esona MD, Estes MK, Gentsch JR, *et al.* 2011. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol*. 156:1397-223 1413.

Matthijnssens J, Ciarlet M, Rahman M, Attoui H, Bányai K, Estes MK, Gentsch JR, Iturriza-Gómara M, Kirkwood CD, Martella V, Mertens PP, Nakagomi O, Patton JT, Ruggeri FM, Saif LJ, Santos N, Steyer A, Taniguchi K, Desselberger U, Van Ranst M. 2008. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch Virol* 153:1621–1629.

Matthijnssens J, Ciarlet M, Heiman E, Arijs I, Delbeke T, McDonald SM, Palombo EA, Iturriza-Gómara M, Maes P, Patton JT, Rahman M, Van Ranst M. 2008. Full genome- based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *J Virol*. 82, 3204–3219.

Mebus CA, Wyatt RG, Kapikian AZ. 1977. Intestinal lesions induced in gnotobiotic calves by the virus of human infantile gastroenteritis. *Vet Pathol*. 14:273-82.

Meister G, Tuschl T. 2004. Mechanisms of gene silencing by doublestranded RNA. *Nature*. 431:343–349.

Meyer JC, Bergmann CC, Bellamy AR. 1989. Interaction of rotavirus cores with the nonstructural glycoprotein NS28. *Virology*. 171:98-107.

Molyneaux P. 1993. Human immunity to rotavirus. *J Med Microbiol*. 43:397–404.

Morris A, Estes M. 2001. Microbes and Microbial Toxins: Paradigms for Microbial Mucosal Interactions VIII: Pathological consequences of rotavirus infection an enterotoxin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 281: G303-G310.

Munos MK, Fischer CL, Black RE. 2010. The effect of rotavirus vaccine on diarrhoea mortality. *Int J Epidemiol*. 39:56–62.

Nakamura Y, Esparza ML, Garrido L, Palomar VM, Gallardo-Pérez JC. 2009. Aplicaciones terapéuticas del ARN de interferencia. *Bioquímica*. 34: 26-36.

Nishikawa K, Hoshino Y, Taniguchi K, Green GY, Greenberg HB, Kapikian AZ, Chanock RM, Gorziglia M. 1989. Rotavirus VP7 neutralization epitopes of serotype 3 strains. *Virology*. 171:503–515.

Newton K, Meyer JC, Bellamy AR, Taylor JA. 1997. Rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 alters plasma membrane permeability in mammalian cells. *J Virol*. 71: 9458–9465.

Osborne MP, Haddon SJ, Spencer AJ, Collins J, Starkey WG, Wallis TS, Clarke GJ, Worton KJ, Candy DC, Stephen J. 1988. An electron microscopic investigation of time-related changes in the intestine of neonatal mice infected with murine rotavirus. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 7:236–248.

Parashar UD, Gibson CJ, Bresee JS, Glass RI. 2006. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis*. 12:304–306.

Patton JT, Gallegos CO. 1990. Rotavirus RNA replication: singlestranded RNA extends from the replicase particle. *J Gen Virol*. 71:1087-94.

Papp H, Al-Mutairi LZ, Chehadeh W, Farkas SL, Lengyel G, Jakab F, Martella V, Szűcs G, Bányai K. 2012. Novel NSP4 genotype in a camel G10P[15] rotavirus strain. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 59:411-21.

Patel M, Pedreira C, De Oliveira LH, et al. 2009. Association between pentavalent rotavirus vaccine and severe rotavirus diarrhea among children in Nicaragua. *JAMA*. 301:2243-51.

Patton JT, Wentz TM, Xiaobo J, Ramig RF. 1996. Cis-Acting signals that promote genome replication in rotavirus mRNA. *J Virol.* 70:3961-71.

Pérez-Vargas J, Isa P, López S, Arias C. 2005. Rotavirus vaccine early introduction in Latin America-risks and benefits. *J Virol.* 37:1-10.

Petrie BL, Graham DY, Hanssen H, Estes MK. 1982. Localization of rotavirus antigens in infected cells by ultrastructural immunocytochemistry. *J Gen Virol.* 63:457-67.

Poncet D, Laurent S, Cohen J. 1994. Four nucleotides are the minimal requirement for RNA recognition by rotavirus non-structural protein NSP3. *EMBO Journal* 13:4165-73.

Rahman M, Matthijnsens J, Yang X, Delbeke T, Arijs I, Taniguchi K, Iturriza-Gómara M, Iftekharuddin N, Azim T, Van Ranst M. 2007. Evolutionary history and global spread of the emerging G12 human rotaviruses. *J Virol.* 81:2382–2390.

Raisler J, Alexander C, O'Campo P. 1999. Breast-feeding and infant illness: A dose-response relationship? *Am. J. Public Health.* 89, 25–30.

Ramig, RF. 2004. Pathogenesis of Intestinal and Systemic Rotavirus Infection. *J Virol.* 78:10213–10220.

Riepenhoff-Talty M, Morse K, Wang C, Shapiro C, Roberts J, Welter M, Allen M, Evans M, Flanagan T. 1997. Epidemiology of C rotavirus infection in western new york women of childbearing age. *J Clin Microbiol.* 35:486-488.

Ruiz MC, Charpilienne A, Liprandi F, Gajardo R, Michelangeli F, Cohen J. 1996. The concentration of Ca²⁺ that solubilizes outer capsid proteins from rotavirus particles is dependent on the strain. *J Virol.* 70:4877-83.

Ruíz-Palacios G, Perez-Schael I, Valazquez F, *et al.* 2006. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N Engl J Med.* 354: 11–22.

Ruíz-Palacios G, Guerrero ML, Bautista-Marquez A, *et al.* 2007. Dose response and efficacy of a live, attenuated human rotavirus vaccine in Mexican infants. *Pediatrics.* 120: e253–61.

Ruuska T, Vesikari T. 1991. Rotavirus disease in Finnish children: use of numerical scores for clinical severity of diarrhoeal episodes. *Scand J Infect Dis.* 22:259-67.

Salinas B, Pérez-Schael I, Linhares AC, Ruiz-Palacios GM, Guerrero ML, Yarzabal JP, Cervantes Y, Costa-Clemens S, Damaso S, Hardt K, De Vos B. 2005. Evaluation of safety, immunogenicity and efficacy of an attenuated rotavirus vaccine, RIX4414: A randomized, placebo-controlled trial in Latin American infants. *Pediatr Infect Dis J.* 24:807–16.

Sanekata T, Ahmed M, Kader A, Taniguchi K, Kobayashi N. 2003. Human group B rotavirus infections cause severe diarrhea in children and adults in Bangladesh. *J Clin Microbiol.* 41: 2187-2190.

Sattar SA, Lloyd-Evans N, Springthorpe VS, Nair RC. 1986. Institutional outbreaks of rotavirus diarrhoea: potential role of fomites and environmental surfaces as vehicles for virus transmission. *J Hyg (Lond).* 96:277-89.

Seo N, Zeng CQ-Y, Hyser JM, Utama B, Crawford SE, Kim KJ, Höök M, Estes MK. 2008. Integrins $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ are receptors for the rotavirus enterotoxin. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 105:8811–8818.

Silvestri LS, Tortorici MA, Vasquez-De R. 2005. Rotavirus glycoprotein NSP4 is a modulator of viral transcription infected cell. *J Virol.* 79:15165-74.

Snelling T, Andrews R, Kirkwood C, Culvenor S, Carapetis J. 2011. Case-control evaluation of the effectiveness of the G1P[8] Human Rotavirus Vaccine during an outbreak of rotavirus G2P[4] infection in central Australia. *CID.* 52:191–199.

Storey SM, Gibbons TF, Williams CV, Parr RD, Schroeder F, Ball JM. 2007. Full-length, glycosylated NSP4 is localized to plasma membrane caveolae by a novel raft isolation technique. *J Virol.* 81:5472-5483.

Suzuki H, Konno T, Numazaki Y. 1993. Electron microscopic evidence for budding process-independent assembly of double-shelled rotavirus particles during passage through endoplasmic reticulum membranes. *J Gen Virol.* 74:2015-8.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 28:2731–2739.

Taraporewala Z, Chen D, Patton JT. 1999. Multimers formed by the rotavirus nonstructural protein NSP2 bind to RNA and have nucleoside triphosphatase activity. *J Virol.* 73:9934-43.

Taraporewala ZF, Schuck P, Ramig RF, Silvestri L, Patton JT. 2002. Analysis of a Temperature-Sensitive Mutant Rotavirus Indicates that NSP2 Octamers Are the Functional Form of the Protein. *J Virol.* 76:7082-7093.

Tavares TM, Brito WMED, Fiaccadori FS, Leal de Freitas ER, Parente JA, Sucasas da Costa PS, Giugliano LG, Andreasi MSA, Soares CMA, Cardoso DDP. 2008. Molecular characterization of the NSP4 gene of human group A rotavirus samples from the West Central region of Brazil. *Mem I Oswaldo Cruz.* 103:288-294.

Tian P, Ball J, Zeng C, Estes M. 1996. Rotavirus Protein Expression is important for virus assembly and pathogenesis. *Arch Virol.* 12:69-77.

Torres-Vega MA, Gonzalez RA, Duarte M, Poncet D, Lopez S, Arias CF. 2000. The C-terminal domain of rotavirus NSP5 is essential for its multimerization, hyperphosphorylation and interaction with NSP6. *J Gen Virol.* 81:821-30.

Tuschl T, Zamore PD, Lehmann R, Bartel DP, Sharp PA. 1999. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes and Development.* 13: 3191–3197.

Valenzuela S, Pizarro J, Sandino AM, Vásquez M, Fernandez J, Hernandez O, Patton J, Spencer E. 1991. Photoaffinity labeling of rotavirus VP1 with 8-azido-ATP: identification of the viral RNA polymerase. *J Virol.* 65:3964–3967.

Vende P, Piron M, Castagne N, Poncet D. 2000. Efficient translation of rotavirus mRNA requires simultaneous interaction of NSP3 with the eukaryotic translation initiation factor eIF4G and the mRNA 39 end. *J Virol.* 74:7064–7071.

Vende P, Taraporewala ZF, Patton JT. 2002. RNA-binding activity of the rotavirus phosphoprotein NSP5 includes affinity for double-stranded RNA. *J Virol.* 76:5291-9.

Vizzi E, Piñeros O, González GG, Zambrano JL, Lurdet JE, Liprandi F. 2011. Genotyping of human rotaviruses circulating among children with diarrhea in Valencia, Venezuela. *J Med Virol.* 2011. 83:2225-32.

Ward RL, Mason BB, Bernstein DJ, Sander DS, Smith VE, Zandle GA, Rappaport RS. 1997. Attenuation of a human rotavirus vaccine candidate did not correlate with mutations in the 234 NSP4 protein gene. *J Virol.* 71:6267–6270.

Ward R, Bernstein D. 2009. Rotarix: a rotavirus vaccine for the world. *Clin Infect Dis.* 48:222-228.

World Health Organization. 2007. Rotavirus Vaccines. *Wkly Epidemiol Rec.* 82: 285–96.

Xu A, Bellamy AR, Taylor JA. 2000. Immobilization of the early secretory pathway by a virus glycoprotein that binds to microtubules. *EMBO J.* 19:6465–6474.

Yang W, McCrae MA. 2012. The rotavirus enterotoxin (NSP4) promotes remodeling of the intracellular microtubule network. *Virus Research.* 163:269-274.

Zambrano JL, Diaz Y, Pena F, Vizzi E, Ruiz MC, et al. 2008. Silencing of rotavirus NSP4 or VP7 expression reduces alterations in Ca²⁺ homeostasis induced by infection of cultured cells. *J Virol.* 82:5815–5824.

Zarate S, Cuadras MA, Espinosa R, Romero P, Juarez KO, Camacho-Nuez M, Arias CF, Lopez S. 2003. Interaction of rotaviruses with Hsc70 during cell entry is mediated by VP5*. *J Virol.* 77:7254-60.

Zarate S, R. Espinosa, P. Romero, C. A. Guerrero, C. F. Arias, and S. Lopez. 2000. Integrin $\alpha 2\beta 1$ mediates the cell attachment of the rotavirus neuraminidase-resistant variant nar3. *Virology.* 278:50-4.

Zhang M, Zeng C, Morris A, Estes M. 2000. A functional NSP4 enterotoxin peptide secreted from rotavirus-infected cells. *J Virol.* 74:11663-11670.

Zijlstra RT, Odle J, Hall WF, Petschow BW, Gelberg HB, Litov RE. 1994. Effect of orally administered epidermal growth factor on intestinal recovery of neonatal pigs infected with rotavirus. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition* 19:382-90.

RESUMEN CURRICULAR

Guadalupe González Ochoa

Candidato para el Grado de
Doctor en Ciencias con acentuación en Microbiología

Tesis: Proteína NSP4 de rotavirus como factor de patogénesis.

Campo de estudio: Ciencias de la salud.

Datos personales: Nacida el 3 de Julio de 1980, en Navojoa, Sonora. Hija de José Antonio González León y Guadalupe Ochoa Félix.

Educación: En 2003 concluye la carrera de Químico Biólogo con especialidad en análisis clínico en la Universidad de Sonora. Del 2004 a 2006 realizó estudios de maestría con acentuación en Microbiología en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. En 2006 inicia sus estudios de doctorado con acentuación en Microbiología en la misma institución donde obtuvo el grado de maestría. Publicó un artículo y ha presentado dos trabajos en congresos internacionales.

Experiencia profesional: Del 2009 al 2011 trabajó en la Univeridad Regiomontana y del 2011 al 2013 ha trabajado como profesor de tiempo completo en el departamento de Ciencias Químico Biológicas y Agropecuarias en la universidad de Sonora.

:

ANEXOS

Anexo1

Tabla que resume cada uno de los síntomas de la gastroenteritis, la frecuencia de cada uno y el puntaje específico asignado de acuerdo a la escala de Ruuska y Vesikari, 1991. La sumatoria de los puntos en un caso determinado puede asociarse a la severidad de la gastroenteritis una puntuación ≤ 10 se relaciona con casos de gastroenteritis leve, ≥ 11 casos moderados y ≥ 15 severos.

SINTOMATOLOGÍA	FRECUENCIA	PUNTOS
Días con diarrea	<1	0
	1-4	1
	5	2
	6	3
Evacuaciones en 24 h	1-3	1
	4-5	2
	>6	3
Días con vómito	No vómitos	0
	1	1
	2	2
	3	3
Episodios de vómito en 24 h	0	0
	1	1
	2-4	2
	>5	3
Temperatura en °C	37 °C	0
	37.1 °C - 38.4 °C	1
	38.5 °C - 38.9 °C	2
	>39 °C	3
Deshidratación	Nada	0
	Leve	2
	Moderada/severa	3
Tratamiento	Ninguno u otro	0
	Medicamento supervisado	1
	Hospitalizado	2

Anexo 2
Publicaciones y congresos

Article

Mutation Distribution in the NSP4 Protein in Rotaviruses Isolated from Mexican Children with Moderate to Severe Gastroenteritis

Guadalupe González-Ochoa *, Griselda E. Menchaca, Carlos E. Hernández, Cristina Rodríguez, Reyes S. Tamez and Juan F. Contreras

Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Av. Universidad S/N Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, CP. 66451, México

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: lupitaglezo@hotmail.com; Tel.:+(81)-82982734; Fax:+(81)-83-52-42-12.

Received: 13 February 2013; in revised form: 4 March 2013 / Accepted: 5 March 2013 /

Published: 11 March 2013

Abstract: The NSP4 protein is a multifunctional protein that plays a role in the morphogenesis and pathogenesis of the rotavirus. Although NSP4 is considered an enterotoxin, the relationship between gastroenteritis severity and amino acid variations in NSP4 of the human rotavirus remains unclear. In this study, we analyzed the sequence diversity of NSP4 and the severity of gastroenteritis of children with moderate to severe gastroenteritis. The rotavirus-infected children were hospitalized before the rotavirus vaccine program in Mexico. All children had diarrhea within 1–4 days, 44 (88%) were vomiting and 35 (70%) had fevers. The severity analysis showed that 13 (26%) cases had mild gastroenteritis, 23 (46%) moderate gastroenteritis and 14 (28%) severe. NSP4 phylogenetic analysis showed three clusters within the genotype E1. Sequence analysis revealed similar mutations inside each cluster, and an uncommon variation in residue 144 was found in five of the Mexican NSP4 sequences. Most of the amino acid variations were located in the VP4 and VP6 binding site domains, with no relationship to different grades of gastroenteritis. This finding indicates that severe gastroenteritis caused by the rotavirus appears to be related to diverse viral or cellular factors instead of NSP4 activity as a unique pathogenic factor.

Keywords: rotavirus; severe gastroenteritis; NSP4

1. Introduction

Rotaviruses cause gastroenteritis in almost all mammals and some birds [1]. Group A, B and C rotaviruses are known to infect humans and animals; however, group A is responsible for gastroenteritis in children less than five years old [2]. The common symptoms of this disease are diarrhea, fever and vomiting [3]. Dehydration is a consequence of severe diarrhea that may cause infant death [2,3]. Statistics reveal that rotaviruses cause approximately 453,000 child deaths per year worldwide, with the highest mortality rates primarily in developing countries [4]. The rotavirus pathogenesis is related to the non-structural protein 4 (NSP4), which is a known enterotoxin [5]. NSP4 induces an intracellular calcium imbalance, resulting in membrane instability and loss of water; the same effect would be present by phospholipase C-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate production when NSP4 interacts with non-infected cells [2,6–8].

NSP4 is a glycosylated protein of 175 amino acids and a molecular mass of 28 kDa in its mature form. This protein is characterized by three hydrophobic domains named H1 (residues 7–21), H2 (29–47) and H3 (67–85) and a coiled α -helical domain (95–137) [9]. The NSP4 amino-terminal region (1–44) is located in the lumen of the endoplasmic reticulum, whereas its carboxy-terminal region (45–175) is in the cytoplasm and interacts with different proteins including VP6 and VP4 during rotavirus morphogenesis [10–12]. NSP4 also interacts with some cellular proteins and extracellular matrix proteins [13–15].

On the other hand, the NSP4 sequence analysis has revealed at least 14 genotypes named E1–E14 (for Enterotoxin). The human rotavirus genotypes are E1 (Wa-like), E2 (Kun-like) and E3 (AU-1), previously known as genotypes B, A and C, respectively [16]. Information related to rotavirus infection and the role of NSP4 pathogenesis in humans has not been described in detail. Some reports indicate that changes in the sequence of NSP4, VP4 and VP7 are related with asymptomatic strains isolated from humans [17,18], but amino acids variation in NSP4 has not always been associated with asymptomatic infections [19–21]. In this study, we analyzed NSP4 of human rotavirus strains in Mexican children with different grades of gastroenteritis to determine the genotype, distribution and frequency of mutations in NSP4.

2. Results and Discussion

2.1. Rotavirus Positive Samples and Gastroenteritis Severity

A total of 123 diarrheic feces collected from October 2004 to March 2005 from hospitalized children with gastroenteritis in Monterrey, Nuevo Leon, México, were analyzed to detect rotavirus. Of all the analyzed samples, sixty-six (53.7%) were positive for the presence of a rotavirus. This is a high percentage, because usually rotavirus infection is associated with 25–39% of hospitalizations for acute gastroenteritis [22]. To further analyze the gastroenteritis severity, 16 of the 66 rotavirus positive samples were discarded due to incomplete data about the infected children or their symptoms. The remaining 50 gastroenteritis cases were considered in this study and the signs and symptoms of the rotavirus gastroenteritis were examined. Twenty-eight (56%) cases were male children and 22 (44%) were female children. Most of the rotavirus gastroenteritis cases (86%) were related to children under two years old, this is in agreement with previous reports on rotavirus infection [23–25]. All the

infected children included in this study had diarrhea within 1 to 4 days, 44 (88%) of them were vomiting and 35 (70%) had a fever. The results of the rotavirus gastroenteritis severity showed that 13 (26%) cases had a score ≤ 10 , whereas 23 (46%) infections showed a score ≥ 11 and 14 (28%) cases had a score ≥ 15 . Those scores were grouped as mild, moderate and severe gastroenteritis, respectively (Table 1). Although some studies describe breastfeeding as an important factor to avoid severe gastroenteritis, we did not find a relationship between breastfeeding and the rotavirus gastroenteritis severity [26–28]. This type of analysis of rotavirus regarding the prevalence and severity of the gastroenteritis may represent a basis to compare the epidemic seasons of the rotavirus before and after the introduction of the Rotarix® vaccine (GSK) [29]. In this aspect, some studies have shown that this vaccine can diminish the cases of hospitalization by the rotavirus from 40 to 60% [30–32]. Additionally, studies in Latin America have shown the efficiency of the vaccine to decrease the severity of the rotavirus gastroenteritis [33,34].

2.2. The NSP4 Genotype

NSP4 is a main factor of rotavirus pathogenesis [35,36]. Therefore, in this study we have focused on the analysis of the NSP4 genotype and its sequence relationship with the rotavirus gastroenteritis severity. To amplify and identify the NSP4 genotype in all the rotavirus positive samples we used a combination of different primers that have been previously described [20,21,37]. This was a useful strategy that identified 61 (92.4%) of the samples as NSP4 genotype E1. The predominant NSP4 genotype E1 identified in the studied area is commonly reported; some studies identified the E2 genotype as the second common genotype [38–41]. Furthermore, others reported non-common NSP4 genotypes E3, E5, E6 and E13 in human rotavirus strains in Thailand, Brazil, Bangladesh and Kenya [42–46].

2.3. The NSP4 Sequence Analysis

According to the gastroenteritis severity analysis (Table 1), the rotavirus positive samples were classified as mild (26%), moderate (46%) and severe (28%). Based on these results a stratified random sampling was done to select representative samples to the NSP4 sequence analysis, this selection included 4(31%) of 13 samples of mild cases, 7 (30%) of 23 cases of moderate and 5 (36%) of 14 severe cases. The analysis of the deduced amino acid sequences of NSP4 reported in this study showed three clusters inside the same genotype E1 (Figure1). The NSP4 sequences MX04-29, MX05-58, MX05-126 reported here grouped in the cluster I; the samples MX05-48, MX05-71, MX05-88, MX05-137, and MX05-144 were in the cluster II and the samples MX04-27, MX04-28, MX05-36, MX05-51, MX05-64, MX05-68, MX05-107 and MX05-119 in the cluster III (Table 3). Previous reports have shown the presence of at least two clusters within this genotype, and in some of them the clusters were related to the location or to the isolation date of the rotavirus strains, in this study we did not observed such relation [41,47,48]. The NSP4 amino acids variations showed in the cluster I (amino acids AK in position 136-137 respectively) were related with rotavirus strains reported in Italy, China, Spain, United States of America (USA) and Russia (Accession number ACF77154, AFU36983, ADU55685, ADO78536 and ACY01369). The sequences in the cluster II share the same amino acid variations in the positions 141-145 with sequences from China, Russia, Thailand and USA

(AAOO6852, ACQ99541, AFQ20926, ADO78564) and the cluster III shared common amino acid variations in aa 141, 142, 144 and 145 with the strain Vanderbilt isolated in USA (AEB80046). Further analyses on NSP4 were performed using the amino acid frequency in each specific position in the protein. The analysis of 349 NSP4 sequences from the GenBank database showed that this protein is highly conserved in some specific domains (Table 2). These conserved regions include the glycosylation sites (aa 8 and 18), the hydrophobic region H1, H2 and H3 (aa 7–21, 29–47 and 67–85), the transmembrane domain (aa 22–44) and the coiled α -helical domain (aa 97–137) where the frequency of the consensus amino acid in a specific position was 97.6 to 100%; however, the H3 domain showed an amino acid frequency of 88.9% for I72 and 87.4% for I76 (Table 2). Conversely, punctual variations in the NSP4 sequence fell in the VP4 binding site domain where the lowest amino acid frequency was at position 141 with a valine present for 58% of the studied sequences, and also the VP6 binding site where a serine at position 169 had a frequency of 56% (Table 2). Most of the amino acids variations in the NSP4 sequences reported were positioned in the carboxyl terminal region (Table 3). However, the samples MX04-29, MX05-58 and MX05-126 showed punctual variations in conserved amino acids 111, 136 and 137 (85.7–92.8%), respectively (Table 3). In addition, five of the NSP4 sequences reported in this study had an uncommon amino acid change at position 144, where a methionine was replaced by a valine. Usually methionine is present in this position in 97.9% of all the 349 NSP4 sequences analyzed (Figure 1), and thus this amino acid variation is unique in our sequences. Moreover, we did not find valine in this position in any other NSP4 genotype E1 sequence in the NCBI database. The replacement of a methionine may be not significant when it is replaced by another hydrophobic amino acid such as valine, because both amino acids can play a role in binding or recognition of hydrophobic ligands such as lipids. However, the sulfur atom in methionine can be involved in binding metals [49] and NSP4 presents a metal binding domain between residues 114 and 135 [50,51]; nevertheless, further analysis is required to explain the importance of the mutations in such conserved amino acid position within NSP4.

Table 1. Characteristics and symptoms of the children infected with the rotavirus and the analysis of the rotavirus severity score from slight to severe according to the Ruuska score [52].

Gastroenteritis severity (Ruuska score)	Gastroenteritis severity	Incidence	Breastfeeding	Sex		Age* (months)	diarrhea episodes* /24 h	Days with diarrhea*	Vomiting episodes* / 24hrs	Days of vomiting*
				M	F					
≤ 10	Mild	13 (26%)	61.5%	6	7	8	6.1	2.4	2.6	1.0
≥ 11	Moderate	23 (46%)	82.3%	15	8	12	8.1	3.1	4.8	2.7
≥ 15	Severe	14 (28%)	71.4%	7	7	14	10.4	4.3	9.3	3.6

* Average Data

Table 2. Consensus NSP4 sequence and the frequency of each amino acid in a specific position from residues 1 to 175. The analysis was obtained from 349 NSP4 sequences from the GenBank and is complemented with the description of some of the NSP4 domains. Abbreviations: **GS:** Glycosylation site, **H:** Hydrophobic domain.

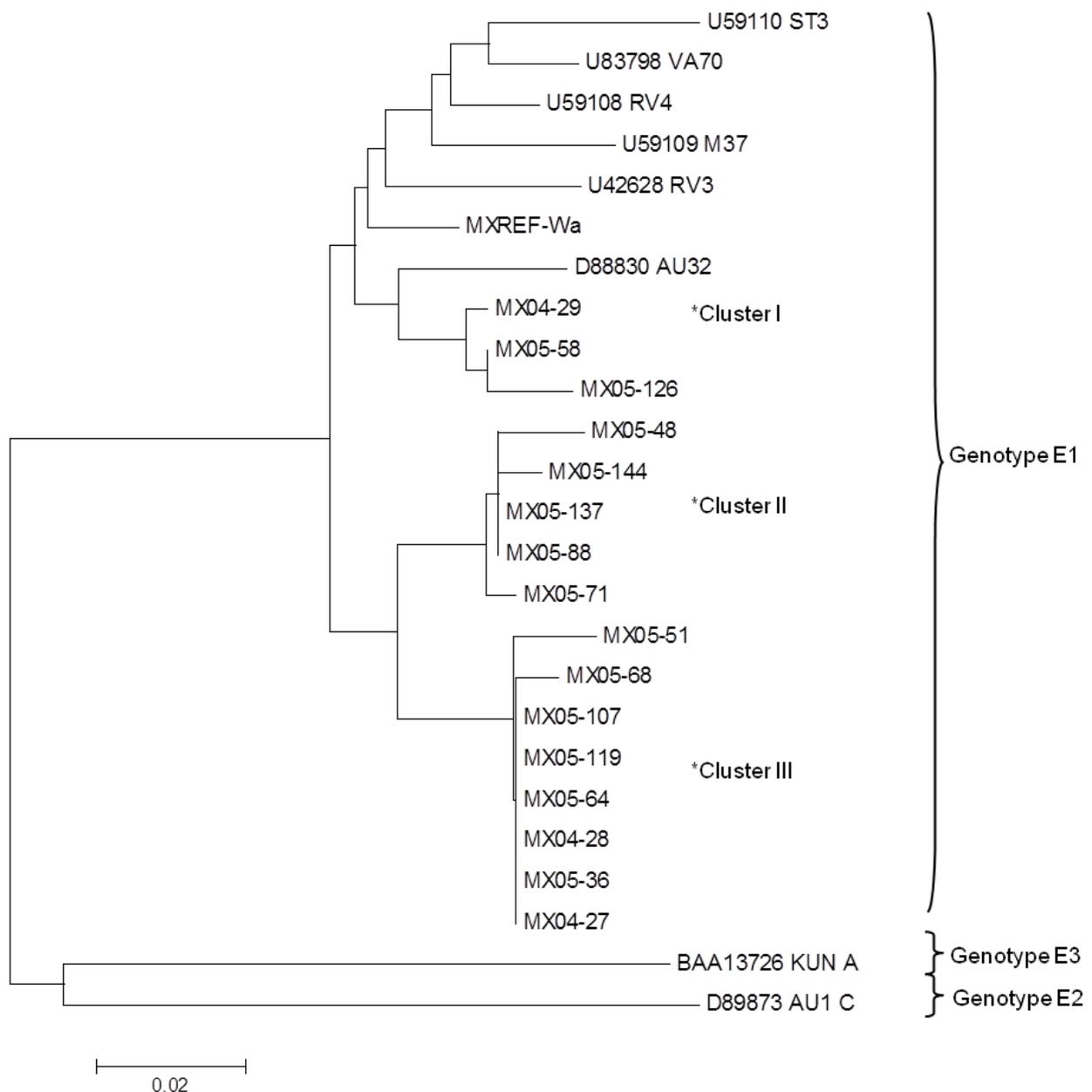
								GS1	H1 (aa 7–21)										GS2	Transmembrane site (22–44)					
Consensus seq	M	D	K	L	A	D	L	N	Y	T	L	S	V	I	T	L	M	N	D	T	L	H	S	I	I
Frequency %	100	98.5	99.7	98	97.6	99.5	100	99.7	100	99.4	99.4	92.7	99.7	97.9	98.2	99	100	99.4	97.9	98.8	100	98.8	98.8	100	98.8
aa position	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
				H2 (29–47)										Transmembrane domain (22–44)											
Consensus seq.	Q	D	P	G	M	A	Y	F	P	Y	I	A	S	V	L	T	V	L	F	T	L	H	K	A	S
Frequency %	97.6	99.7	100	100	96.4	100	100	100	97.8	100	98.8	100	99.7	99.4	100	100	994	99.4	99.7	98.4	100	99.4	99.4	100	99.4
aa position	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
																H3 (aa 67–85)									
Consensus seq.	I	P	T	M	K	I	A	L	K	T	S	K	C	S	Y	K	V	I	K	Y	C	I	V	T	I
Frequency %	99.4	99.4	99.1	99	99.7	99.4	100	99.4	96.6	99.4	100	98.8	99.1	100	99.7	100	99.4	97.9	99.1	98.5	98.8	88.9	99.1	99.4	95.5
aa position	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
	H3 (67–85)										Alpha coiled Domain (95–137)														
Consensus seq.	I	N	T	L	L	K	L	A	G	Y	K	E	Q	V	T	T	K	D	E	I	E	Q	Q	M	D
Frequency %	87.4	99.7	98.5	100	99.1	98.8	98.2	98.8	100	99.4	98.5	100	99.1	96.7	98.8	98	99.1	98.5	98.8	99.7	100	98.2	99.7	99.7	99.1
aa position	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125
	Alpha coiled Domain (95–137)															VP4 Binding site (112–148)									
																Enterotoxin (114–135)									
Consensus seq.	R	I	V	K	E	M	R	R	Q	L	E	M	I	D	K	L	T	T	R	E	I	E	Q	V	E
Frequency %	99.7	98.8	99.1	99	99.7	99.4	99.7	100	98.5	99.7	93.4	99.4	99.7	99.1	99.1	100	100	98.8	99.1	99.7	99.7	99.7	99.7	99.4	100
aa position	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150
	Alpha coiled Domain (95–137)										VP4 Binding site (112–148)														
	Enterotoxin (114–135)																								
Consensus seq.	L	L	K	R	I	H	D	N	L	I	T	R	P	V	D	V	I	D	M	S	K	E	F	N	Q
Frequency %	99.4	100	99.7	99	99.7	92.8	99.1	78.6	100	90.7	93.4	87.1	78.4	88	89.8	58	76	99.4	97.9	64.3	99.1	99.1	97.3	99.1	100
aa position	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175
																VP6 Binding site (167–175)									
Consensus seq.	K	N	I	K	T	L	D	E	W	E	S	G	K	N	P	Y	E	P	S	E	V	T	A	S	M
Frequency %	98.8	99.7	94	93	100	99.7	98.2	99.1	100	95.8	77	99.7	97.6	99.1	100	100	99.1	100	56	99.1	99.4	99.7	100	98.8	100

Table 3. Sequence analysis of the amino acid variations in the NSP4 protein from rotavirus strains reported in this study.

NSP4 Sequence	Severity scores	Cluster	Amino acid variability and distribution																	
			H3 *			TD	ACD *	E/VP4 *	VP4 *						VP6 *					
			76	77	85	94	111	132	136	137	141	142	144	145	161	169	172	173	174	175
MX04-29	16	I					N		A	K										
MX05-58	14	I					D		A	K										
MX05-126	16	I		V			D		A	K										
MX05-48	8	II	V		H						T				T	N	I			
MX05-144	13	II	V								T				T	N	I			
MX05-137	15	II	V								T				T	N	I			
MX05-88	16	II	V								T				T	N	I			
MX05-71	0	II	V								T				T	N	M			
MX04-27	11	III									S	V	V	T			I			
MX04-28	14	III									S	V	V	T			I			
MX05-36	8	III									S	V	V	T			I			
MX05-51	14	III						N			S	V	V	T			I	I		
MX05-64	12	III									S	V	V	T			I			
MX05-68	8	III				G					S	V	V	T			I			
MX05-107	14	III									S	V	V	T			I			
MX05-119	15	III									S	V	V	T	N		I			
Consensus amino acids			I	N	Y	E	E	D	T	R	V	I	M	S	S	S	T	A	S	M
Frequency %			86	99.7	99.4	99.1	89.4	99.4	92.8	85.7	56.2	75.9	99.4	61	76	56	100	100	99	100

* **H3**: hydrophobic region 3; **TD**: Tetramerization Domain; **ACD**: Alpha Coiled Coil Domain **E**: Enterotoxin Domain; **VP4**: VP4 Binding site domain; **VP6**: VP6 binding site domain

Figure 1. Phylogenetic analysis of the deduced amino acid NSP4 sequences reported in this study and other NSP4 genotypes previously reported in the NCBI. The phylogenetic tree was constructed based on the neighbor-joining method. The bootstrap consensus tree inferred from 500 replicates is taken to represent the evolutionary history of the taxa analyzed. The evolutionary distances were computed using the p-distance method and are in the units of the number of amino acid differences per site. Evolutionary analyses were conducted in MEGA5 package [54]. Accession number of the sequences reported in this study in the GenBank: MX04-28: JX458969, MX04-29: JX458970, MX04-27:JX458971, MX05-51:JX458972, MX05-144: JX458973, MX05-58: JX458974, MX05-68: JX458975, MX05-71:JX458976, MX05-88:JX458977, MX05-119:JX458978, MX05-107: JX458982, MX05-126: JX458983, MX05-137: JX458984.



3. Experimental Section

3.1. Samples Recollection and Gastroenteritis Severity Score

A total of 123 stool samples were collected from hospitalized children with gastroenteritis in Monterrey, Nuevo León, México, from October 2004 to March 2005. The inclusion criteria were the age of the child, up to five years old, and the hospitalization for nonbacterial gastroenteritis. Diarrhea, vomiting and fever were used as registered symptoms to calculate the gastroenteritis severity, and formed the basis of the Ruuska score [52].

3.2. Extraction of Rotavirus RNA.

The feces samples were used to isolate, purify and detect the rotavirus RNA genome by TRI Reagent® (Molecular Research Center, Cincinnati, OH) as suggested by the supplier. The viral RNA was loaded onto a 10% polyacrylamide gel under native conditions, and then stained by a silver-staining procedure. A sample was considered positive to the rotavirus when a characteristic double-stranded RNA genome was observed in the gel [53].

3.3. NSP4 Genotype Identification and Sequence

RNA positive samples for the rotavirus were retro transcribed and amplified by PCR to isolate the NSP4 gene using the primers Beg16-End722 or NSP41F-NSP42R [20,21]; although in several experiments, combinations of both primer pairs were required to achieve amplification. NSP4 genotype identification was performed by a multiplex-semi-nested PCR, with 10END722 or NSP42R as the external primers and Wa, Kun or RRV as the internal primers, which corresponds to genotypes E1, E2 and E3, respectively [37]. Samples of the amplified NSP4 gene were cloned using the pGEM-T vector (Promega Inc, Madison, WI) according to the manufacturer's instructions. The plasmid with the NSP4 insert was purified by the Wizard SV Minipreps kit (Promega Inc, Madison, WI) and sequenced by the dideoxynucleotide chain termination method, using an ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (PE Applied Biosystems, Whashington, DC). The DNA sequence was confirmed by sequencing both DNA strands of each of the different clones using the pUCM13 sense and antisense standard primers. The resulting sequences were analyzed with MEGA 5.0 and compared with other sequences reported in the GenBank data base; the phylogenetic tree was determined by the Neighbor joining method [54]. The GenBank accession numbers of NSP4 sequences used in sequence analysis were AB361285, AB008233, AB008237, AB213391, AB326290, AB326294, AB326963, AB361282, AF170830, AF260930, AY159640, AY159642, AY353740, AY353800, DQ909069, DQ909070, EF033202, EF033203, EF672575, EU679377, EU679382, U42628, U83798, AAO06852, AAT48079, AB008229 - AB008231, AB008234-AB008236, AB008238-AB008245, AB008247-AB008257, AB008259 - AB008263, AB022772, AB043026, AB043069-AB043078, AB196491, AB196492, AB196958, AB196959, AB211987-AB213392, AB232699, AB269688, AB303218, AB326286-AB326289, AB326293, AB326295, AB326297, AB326334, AB326336, AB326337, AB326347, AB326348, AB326962, AB326966, AB326969, AB326971, AB361276, AB361281, AB361284, AB361286-AB361288,

ABK62862, ABU49806, ACF77153, ACF77154, ACJ54826, ACJ66758, ACJ66769, ACL80635, ACL80638, ACQ99541, ACY01369, ACY01381, ACZ51671, ADA70484, ADK46705, ADK46715, ADO78533, ADO78536, ADO78564, AEB79485, AEB79550, AEK69633, AET43468, AF161810-AF161815, AF170831-AF170833, AF173179, AF173181-AF173208, AF173211 - AF173214, AF174300 - AF174302, AF260928, AF260929, AF284776-AF284778, AF469676 - AF469679, AF506016, AF541921, AFJ68184, AFJ68397, AFK27432, AJ236757 - AJ236770, AJ236772 - AJ236774, AJ236778 - AJ236782, AJ400634, AY159630 - AY159632, AY159634 - AY159639, AY159641, AY159643, AY159644 - AY159647, AY353727, AY353728, AY353730 - AY353739, AY353741 - AY353746, AY353753 - AY353765, AY353767 - AY353790, AY353792 - AY353805, AY601540 - AY601544, AY629562, BAD84188, BAF97950, CAB36938, D88830, DQ146647, DQ146658, DQ146669, DQ146680, DQ189233 - DQ189237, DQ189240, DQ299876, DQ339147 - DQ339151, DQ490543, DQ492678, DQ525182 - DQ525188, EF011980, EF033204, EF059918, EF059919, EF059924, EF159574, EU679378 - EU679380, GAU78558, Q9YJN7, U59108, U59110.

4. Conclusions

The presence of intra-genotypic clusters and punctual amino acid variations in the NSP4 genotype E1 may indicate that NSP4 mutates mainly via accumulation of single point mutations. Since most of the variations in NSP4 fell in the carboxylic terminal region, especially in the VP4 binding site segment, it is important to consider that NSP4 is involved in morphogenesis and pathogenesis activities. Further analysis of NSP4 in the VP4 and VP6 binding site segment should be studied, especially with respect to structural conformational changes caused by amino acid variations. NSP4 is an important factor in rotavirus pathogenesis, and in this study an analysis examining the amino acid variations in the sequence and the gastroenteritis severity score was performed. The results failed to show a relationship between punctual variations in NSP4 and the severity of rotavirus gastroenteritis. The study of the NSP4 protein and its interaction with other viral proteins may aid our understanding of the pathogenesis of the rotavirus.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest

References and Notes

1. Kapikian, A.; Hoshino, Y.; Chanock, R. Rotaviruses. In *Fields virology*, 4th Edition; Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B., Strais S.E., Eds.; Lippincott Williams and Wilkins: Philadelphia, Pennsylvania Pa, USA, 2001; pp. 1787–1833.
2. Morris, A.P.; Estes, M.K. Microbes and microbial toxins: Paradigms for microbial mucosal interactions VIII: Pathological consequences of rotavirus infection an enterotoxin. *Am. J. Physiol.-Gastr. L.* **2001**, *281*, 303–310.
3. Ramig, R.F. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *J. Virol.* **2004**, *78*, 10213–10220.

4. Tate, J.E.; Burton, A.H.; Boschi-Pinto, C.; Steele, A.D.; Duque, J.; Parashar, U.D. 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* **2012**, *12*, 131–141.
5. Ball, J.M.; Tian, P.; Zeng, C.Q.; Morris, A.P.; Estes, M.K. Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science* **1996**, *272*, 101–104.
6. Dong, Y.; Zeng, C.; Ball, J.; Estes, M.; Morris, A. The rotavirus enterotoxin NSP4 mobilizes intracellular calcium in human intestinal cells by stimulating phospholipase C-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 3960–3965.
7. Brunet, J.P.; Cotte, J.; Linxe, C.; Quero, A.M.; Géniteau-Legendre, M.; Servin, A. Rotavirus infection induces an increase in intracellular calcium concentration in human intestinal epithelial cells: Role in microvillar actin alteration. *J. Virol.* **2000**, *74*, 2323–2332.
8. Zhang, M.; Zeng, C.Q.; Morris, A.P.; Estes, M.K. A functional NSP4 enterotoxin peptide secreted from rotavirus-infected cells. *J. Virol.* **2000**, *74*, 663–11670.
9. Estes, M.K. Rotaviruses and their replication. In *Fields virology*, 4th Edition; Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B., Strais, S.E., Eds.; Lippincott Williams and Wilkins: Philadelphia, Pennsylvania, USA, 2001; pp. 1747–1785.
10. Au, K.; Chan, W.; Burns, J.W.; Estes, M.K. Receptor activity of rotavirus nonstructural glycoprotein NS28. *J. Virol.* **1989**, *63*, 4553–4562.
11. Bergmann, C.C.; Maas, D.; Poruchynsky, M.S.; Atkinson, P.H.; Bellamy, A.R. Topology of the non-structural rotavirus receptor glycoprotein NS28 in the rough endoplasmic reticulum. *EMBO J.* **1989**, *8*, 1695–1703.
12. Tian, P.; Ball, J.; Zeng, C.; Estes, M. Rotavirus Protein Expression is important for virus assembly and pathogenesis. *Arch. Virol.* **1996**, *12*, 69–77.
13. Mirazimi, A.; Nilsson, M.; Svensson, L. The molecular chaperone calnexin interacts with the NSP4 enterotoxin of rotavirus *in vivo* and *in vitro*. *J. Virol.* **1998**, *72*, 8705–8709.
14. Xu, A.; Bellamy, A.R.; Taylor, J.A. Immobilization of the early secretory pathway by a virus glycoprotein that binds to microtubules. *EMBO J.* **2000**, *19*, 6465–6474.
15. Storey, S.M.; Gibbons, T.F.; Williams, C.V.; Parr, R.D.; Schroeder, F.; Ball, J.M. Full-length, glycosylated NSP4 is localized to plasma membrane caveolae by a novel raft isolation technique. *J. Virol.* **2007**, *81*, 5472–5483.
16. Matthijnssens, J.; Ciarlet, M.; McDonald, S.M.; Attoui, H.; Bányai, K.; Brister, J.R.; Buesa, J.; Esona, M.D.; Estes, M.K.; Gentsch, J.R.; *et al.* Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch. Virol.* **2011**, *156*, 1397–1413.
17. Kirkwood, C.D.; Coulson, B.; Bishop, R. G3P2 rotaviruses causing diarrhoeal disease in neonates differ in VP4, VP7 y NSP4 sequence from G3P2 strains causing asymptomatic neonatal infection. *Arch. Virol.* **1996**, *141*, 1661–1676.
18. Pager, C.T.; Alexander, J.J.; Steele, A.D. South African G4P[6] asymptomatic and symptomatic neonatal rotavirus strains differ in their NSP4, VP8*, and VP7 genes. *J. Med. Virol.* **2000**, *62*, 208–216.

19. Horie, Y.; Masamune, O.; Nakagomi, O. Three major alleles of rotavirus NSP4 proteins identified by sequence analysis. *J. Gen. Virol.* **1997**, *78*, 2341–2346.
20. Ward, R.L.; Mason, B.B.; Bernstein, D.J.; Sander, D.S.; Smith, V.E.; Zandle, G.A.; Rappaport, R.S. Attenuation of a human rotavirus vaccine candidate did not correlate with mutations in the NSP4 protein gene. *J. Virol.* **1997**, *71*, 6267–6270.
21. Lee, C.; Wang, Y.; Kao, C.; Zao, C.; Lee, C.; Chen, H. NSP4 gene analysis of rotaviruses recovered from infected children with and without diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* **2000**, *38*, 4471–4477.
22. Parashar, U.D.; Gibson, C.J.; Bresee, J.S.; Glass, R.I. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg. Infect. Dis.* **2006**, *12*, 304–306.
23. Linhares, A.C.; Velázquez, F.R.; Pérez-Schael, I.; Sáez-Llorens, X.; Abate, H.; Espinoza, F.; López, P.; Macías-Parra, M.; Ortega-Barría, E.; Rivera-Medina, D.M.; *et al.* Efficacy and safety of an oral live attenuated human rotavirus vaccine against rotavirus gastroenteritis during the first 2 years of life in Latin American infants: Randomised, double-blind controlled study. *Lancet* **2008**, *371*, 1181–1189.
24. Forster, J.; Guarino, A.; Perez, N.; Moraga, F.; Román, E.; Mory, O.; Tozzi, A.E.; López de Aguilera, A.; Wahn, U.; Graham, C.; *et al.* Hospital-Based Surveillance to Estimate the Burden of Rotavirus Gastroenteritis Among European Children Younger Than 5 Years of Age. *Pediatrics* **2009**, *123*, 393–400.
25. Bruijning-Verhagen, P.; Quach, C.; Bonten, M. Nosocomial Rotavirus Infections: A Meta-analysis. *Pediatrics* **2012**, *129*, 1011–1019.
26. Clemens, J.; Rao, M.; Ahmed, F.; Ward, R.; Huda, S.; Chakraborty, J.; Yunus, M.; Khan, M.R.; Ali, M.; Kay, B.; *et al.* Breastfeeding and the risk of life-threatening rotavirus diarrhea: Prevention or postponement? *Pediatrics* **1993**, *92*, 680–685.
27. Molyneaux, P. Human immunity to rotavirus. *J. Med. Microbiol.* **1993**, *43*, 397–404.
28. Raisler, J.; Alexander, C.; O'Campo, P. Breast-feeding and infant illness: A dose-response relationship? *Am. J. Public Health* **1999**, *89*, 25–30.
29. Ward, R.L.; Bernstein, D.I. Rotarix: A rotavirus vaccine for the world. *Clin. Infect. Dis.* **2009**, *48*, 222–228.
30. De Palma, O.; Cruz, L.; Ramos, H.; de Baires, A.; Villatoro, N.; Pastor, D.; de Oliveira, L.H.; Kerin, T.; Bowen, M.; Gentsch, J.; *et al.* Effectiveness of rotavirus vaccination against childhood diarrhoea in El Salvador: Case-control study. *BMJ* **2010**, *340*, 2825–2832.
31. Munos, M.K.; Fischer, C.L.; Black, R.E. The effect of rotavirus vaccine on diarrhoea mortality. *Int. J. Epidemiol.* **2010**, *39*, 56–62.
32. Anderson, E.J.; Rupp, A.; Shulman, S.T.; Wang, D.; Zheng, X.; Noskin, G.A. Impact of rotavirus vaccination on hospital-acquired rotavirus gastroenteritis. *Pediatrics* **2011**, *127*, 264–270.
33. Salinas, B.; Pérez-Schael, I.; Linhares, A.C.; Ruiz-Palacios, G.M.; Guerrero, M.L.; Yarzabal, J.P.; Cervantes, Y.; Costa-Clemens, S.; Damaso, S.; Hardt, K.; De Vos, B. Evaluation of safety, immunogenicity and efficacy of an attenuated rotavirus vaccine, RIX4414: A randomized, placebo-controlled trial in Latin American infants. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2005**, *24*, 807–16.

34. Ruiz-Palacios, G.M.; Perez-Schael, I.; Velazquez, F.R.; Abate, H.; Breuer, T.; Costa-Clemens, S.; Chevart, B.; Espinoza, F.; Gillard, P.; Innis, B.L.; *et al.* Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N. Engl. J. Med.* **2006**, *354*, 11–22.
35. Ball, J.M.; Mitchell, D.M.; Gibbons, T.F.; Parr, R. Rotavirus NSP4: A Multifunctional Viral Enterotoxin. *Viral Immunol.* **2005**, *18*, 27–40.
36. Lorrot, M.; Vasseur, M. How do the rotavirus NSP4 and bacterial enterotoxins lead differently to diarrhea? *Viol. J.* **2007**, *4*, 31–37.
37. Kudo, S.; Zhou, Y.; Cao, X.; Yamanishi, S.; Nakata, S.; Ushijima, H. Molecular characterization in the VP7, VP4 and NSP4 genes of human rotavirus serotype 4 (G4) isolated in Japan and Kenya. *Microbiol. Immunol.* **2001**, *45*, 167–171.
38. Tavares, T.M.; Brito, W.M.E.D.; Fiaccadori, F.S.; Leal de Freitas, E.R.; Parente, J.A.; Sucasas da Costa, P.S.; Giugliano, L.G.; Andreasi, M.S.A.; Soares, C.M.A.; Cardoso, D.D.P. Molecular characterization of the NSP4 gene of human group A rotavirus samples from the West Central region of Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2008**, *103*, 288–294.
39. Bányai, K.; Bogdán, A.; Szucs, G.; Arista, S.; De Grazia, S.; Kang, G.; Banerjee, I.; Iturriza-Gómara, M.; Buonavoglia, C.; Martella, V. Assignment of the group A rotavirus NSP4 gene into genotypes using a hemi-nested multiplex PCR assay: A rapid and reproducible assay for strain surveillance studies. *J. Med. Microbiol.* **2009**, *58*, 303–311.
40. Vizzi, E.; Piñeros, O.; González, G.G.; Zambrano, J.L.; Lurdet, J.E.; Liprandi, F. Genotyping of human rotaviruses circulating among children with diarrhea in Valencia, Venezuela. *J. Med. Virol.* **2011**, *83*, 2225–2232.
41. Ben Hadj Fredj, M.; Zeller, M.; Fodha, I.; Heylen E.; Chouikha, A.; Van Ranst, M.; Matthijnssens, J.; Trabelsi, A. Molecular characterization of the NSP4 gene of human group A rotavirus strains circulating in Tunisia from 2006 to 2008. *Infect. Genet. Evol.* **2012**, *12*, 997–1004.
42. Rahman, M.; Matthijnssens, J.; Yang, X.; Delbeke, T.; Arijs, I.; Taniguchi, K.; Iturriza-Gómara, M.; Iftekharuddin, N.; Azim, T.; Van Ranst, M. Evolutionary history and global spread of the emerging G12 human rotaviruses. *J. Virol.* **2007**, *81*, 2382–2390.
43. Matthijnssens, J.; Ciarlet, M.; Heiman, E.; Arijs, I.; Delbeke, T.; McDonald, S.M.; Palombo, E.A.; Iturriza-Gómara, M.; Maes, P.; Patton, J.T.; *et al.* Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *J. Virol.* **2008**, *82*, 3204–3219.
44. Benati, F.J.; Maranhao, A.G.; Lima, R.S.; da Silva, R.C.; Santos N. Multiple-gene characterization of rotavirus strains: Evidence of genetic linkage among the VP7-, VP4-, VP6-, and NSP4-encoding genes. *J. Med. Virol.* **2010**, *82*, 1797–1802.
45. Khamrin, P.; Maneekarn, N.; Malasao, R.; Nguyen, T.A.; Ishida, S.; Okitsu, S.; Ushijima, H. Genotypic linkages of VP4, VP6, VP7, NSP4, NSP5 genes of rotaviruses circulating among children with acute gastroenteritis in Thailand. *Infect. Genet. Evol.* **2010**, *10*, 467–472.
46. Ghosh, S.; Gatheru, Z.; Nyangao, J.; Adachi, N.; Urushibara, N.; Kobayashi, N. Full genomic analysis of a simian SA11-like G3P[2] rotavirus strain isolated from an asymptomatic infant: Identification of novel VP1, VP6 and NSP4 genotypes. *Infect. Genet. Evol.* **2011**, *11*, 57–63.

47. Kirkwood, C.D.; Gentsch, J.R.; Glass, R.I. Sequence analysis of the NSP4 gene from human rotavirus strains isolated in the United States. *Virus Genes* **1999**, *19*, 113–122.
48. Araujo, I.T.; Heinemann, M.B.; Mascarenhas, J.D.P.; Santos Assis, R.M.; Fialho, A.M.; Leite, J.P.G. Molecular analysis of the NSP4 and VP6 genes of rotavirus strains recovered from hospitalized children in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Med. Microbiol.* **2007**, *56*, 854–859.
49. Betts, M.J.; Russell, R.B. Amino Acid properties and Consequences of Substitutions. In *Bioinformatics for Geneticists*; Barnes, M.R., Gray, I.C., Eds; Wiley: New York, New York, USA, 2003.
50. Bowman, G.D.; Nodelman, I.M.; Levy, O.; Lin, S.L.; Tian, P.; Zamb, T.J.; Udem, S.A.; Venkataraghavan, B.; Schutt, C.E. Crystal structure of the oligomerization domain of NSP4 from rotavirus reveals a core metal-binding site. *J. Mol. Biol.* **2000**, *304*, 861–871.
51. Seo, N.; Zeng, CQ-Y, Hyser, J.M.; Utama, B.; Crawford, S.E.; Kim, K.J.; Höök, M.; Estes, M.K. Integrins $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ are receptors for the rotavirus enterotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 8811–8818.
52. Ruuska, T.; Vesikari, T. Rotavirus disease in Finnish children: use of numerical scores for clinical severity of diarrhoeal episodes. *Scand. J. Infect. Dis.* **1991**, *22*, 259–267.
53. Verly, E.; Cohen, J. Demonstration of size variation of RNA segments between different isolates of calf rotavirus. *J. Gen. Virol.* **1977**, *35*, 583–586.
54. Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* **2011**, *28*, 2731–2739.

© 2013 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

FACTORES VIRALES QUE INFLUYEN EN LA SEVERIDAD DE LA GASTROENTERITIS POR ROTAVIRUS

Guadalupe González Ochoa (1), Cristina Rodríguez Padilla (2), Reyes Tamez Guerra (2) y Juan Francisco Contreras Cordero (2)

(1) Departamento de Ciencias Químico Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Sonora, Unidad Regional Sur, Blvd. Lázaro Cárdenas No. 100, CP. 85800, Navojoa, Sonora.
e-mail: guadalupe.gonzalez@navojoa.uson.mx

(2) Laboratorio de Inmunología y Virología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. Av. Pedro de Alba S/N Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León. CP 66451

VIRAL FACTORS RELATED TO ROTAVIRUS GASTROENTERITIS SEVERITY

ABSTRACT: Rotavirus is the most common cause of acute gastroenteritis in children worldwide. Rotavirus-induced diarrhea is the main symptom, which may cause severe dehydration and death of patients. However, the infection by rotavirus can vary from asymptomatic to asymptomatic infection. This overview presents the role of several proteins of rotavirus and possible function as viral factors involved in the pathogenesis of rotavirus. In previous studies, it had been reported that both non structural and structural proteins can be implied to rotavirus pathogenesis. Of them, NSP4 have been characterized as viral enterotoxin, while VP4 and VP7 are implicated in elicit the immune response to rotavirus. Due to the diarrhea inducing activity of NSP4 enterotoxin, this protein is one of the most important factors in the gastroenteritis severity.

Keywords: Rotavirus, gastroenteritis, diarrhea, NSP4

RESUMEN

Rotavirus es el principal agente causal de la gastroenteritis severa en niños. Un síntoma común de la gastroenteritis por rotavirus es la diarrea. La infección puede variar desde una infección asintomática hasta una deshidratación severa que puede causar la muerte del infante. En este trabajo se analiza el rol que pueden tener diferentes proteínas virales como factores involucrados en la patogénesis viral. Algunas de las proteínas virales, estructurales y no

estructurales, pueden actuar como factores que influyen en la severidad de la gastroenteritis. De ellas, la proteína no estructural NSP4 se ha caracterizado como la enterotoxina viral. Por su parte, las proteínas estructurales VP4 y VP7 están íntimamente implicadas en la inducción de la inmunidad contra rotavirus. Debido a que la enterotoxina NSP4 está involucrada en la producción de la diarrea se considera uno de los factores más importantes en severidad de la gastroenteritis por rotavirus.

Palabras clave: Rotavirus, gastroenteritis, diarrea, NSP4

INTRODUCCIÓN

Rotavirus es el principal agente causal de la gastroenteritis severa en niños menores de dos años de edad. Se asocia con una mortalidad de casi medio millón de infantes al año, principalmente en países en vías de desarrollo (Desselberger *et al.*, 2009). Una de las manifestaciones cardinales en una infección por rotavirus es la diarrea; la cual puede conducir a un proceso de deshidratación en muy poco tiempo y poner en riesgo la vida del menor infectado (Ramig, 2004). Algunos estudios han mostrado que la gastroenteritis por rotavirus es más severa que la gastroenteritis bacteriana o la causada por otros agentes virales (Ruuska y Vesikari, 1991). Estos hallazgos impulsaron la búsqueda de los factores virales asociados a los diferentes grados de severidad de la gastroenteritis por rotavirus. Aunque varias proteínas se han implicado en este rol, la proteína NSP4 destaca como un importante factor de patogénesis viral. Esta proteína ha sido descrita como la primera enterotoxina viral entre los virus que causan gastroenteritis y ha sido blanco de varios estudios para determinar su participación en este proceso (Ball *et al.*, 1996). Se ha observado que NSP4 puede inducir un incremento de Ca^{+2} intracelular, tanto en células infectadas como en células no infectadas por rotavirus, este incremento se asocia a la desestabilización de la membrana celular y al proceso que desencadena la diarrea (Dong *et al.*, 1997). Por otro lado, el rotavirus presenta seis proteínas estructurales, de las cuales las denominadas VP4 y VP7 forman la capa externa del virus. Estas proteínas inducen la producción de anticuerpos neutralizantes, mismos que reducen la infectividad del virus en su fase extracelular (Kapikian *et al.*, 2001). Por lo tanto, en los procesos de patogénesis es importante abordar tanto la biología del virus como la inmunidad que desencadena, dos factores que pueden dilucidar los mecanismos de patogénesis viral. En el presente trabajo se describen algunos factores virales involucrados en la severidad de la gastroenteritis por rotavirus.

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE ROTAVIRUS

Los rotavirus son causantes de gastroenteritis severa en un gran número de mamíferos y aves (Kapikian *et al.*, 2001). En humanos, los rotavirus del grupo A se asocian a casos de gastroenteritis en niños menores de cinco años. Comúnmente las infecciones se presentan en las temporadas más frías del año y su incidencia se da por igual tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. No obstante, debido a las deficiencias nutricionales de los menores y a la falta de atención médica oportuna la mayor mortalidad se presenta en los países más pobres (Parashar *et al.*, 2003). Se considera que la gastroenteritis por rotavirus es responsable de cerca de 600,000 muertes de niños por año a nivel mundial (Desselberger *et al.*, 2009). En México, hasta el año 2005, se consideraba que aproximadamente 2,000 niños menores de tres años de edad morían por gastroenteritis por rotavirus cada año (Pérez-Vargas *et al.*, 2005). Sin embargo, la introducción de la vacuna Rotarix[®] (GSK) ha disminuido significativamente esta cifra (Richardson *et al.*, 2010).

El rotavirus pertenece a la familia Reoviridae, se caracteriza por una estructura icosaédrica de 70 nm de diámetro. Las partículas virales presentan tres capas concéntricas de proteínas que envuelven el genoma viral, mismo que consta de once segmentos de RNA de doble cadena (RNAdc). Cada segmento de RNAdc codifica al menos una proteína, con excepción del gen once que presenta dos marcos de lectura. En total el genoma viral codifica seis proteínas estructurales (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7) y seis proteínas no estructurales (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 y NSP6). La capa proteica que envuelve el núcleo está constituida por las proteínas VP1, VP2 y VP3. La capa intermedia está formada por la proteína VP6. Mientras que las proteínas VP7 y VP4 forman la cápside externa, ambas proteínas son indispensables para el proceso de infección viral (Estes, 2001).

En base a la proteína VP6, los rotavirus se clasifican en grupos (A-G). Así mismo, en base a las proteínas VP4 y VP7 se clasifican en serotipos y genotipos. La proteína VP7 por ser una proteína glicosilada define los serotipos G mientras que VP4 por ser una proteína que se procesa proteolíticamente durante la entrada del virus a la célula, define los genotipos P. Ambos genotipos G y P se manejan en conjunto para determinar la clasificación binomial de las distintas cepas de rotavirus. Los genotipos de rotavirus predominantes a nivel mundial son los genotipos G1P[8], G4P[8], G2P[4], G3P[8] los cuales juntos son responsables del 90% de las infecciones por rotavirus (Arista *et al.*, 1997; Ramachandran *et al.*, 1998; Argüelles *et al.*, 2000; O'Halloran

et al., 2002; Rahman *et al.*, 2003, Iturriza-Gómara *et al.*, 2004). Recientemente se ha introducido una clasificación en base al análisis de todos los genes virales (Matthijnssens *et al.*, 2008). Este sistema es de gran utilidad para detectar cepas de rotavirus rearrreglantes durante cada brote epidémico y por lo tanto detectar la introducción a la población de una nueva variante genética de rotavirus.

FISIOPATOLOGÍA DE LA GASTROENTERITIS POR ROTAVIRUS

La gastroenteritis por rotavirus tiende a ser más severa que la causada por otros agentes infecciosos (Ruuska y Vesikari, 1991). Se considera que de un 29 al 45% de los casos de infecciones por rotavirus requieren hospitalización (Parashar *et al.*, 2006). El síntoma más común es la diarrea profusa, en algunos casos de más de 20 evacuaciones acuosas por día, generalmente acompañada de vómito, fiebre, anorexia y dolor abdominal, que se manifiestan después de un periodo de incubación corto de uno a dos días (Ramig, 2004). El proceso infeccioso puede auto limitarse entre 5 y 7 días después de la infección (Morris y Estes, 2001). Sin embargo, la falta del manejo oportuno del paciente puede conducir a una deshidratación severa, lo que a su vez puede culminar con la muerte del infante (Wickelgren, 2000; Parashar *et al.*, 2006).

Para determinar el efecto patológico causado por rotavirus, se ha recurrido a voluntarios humanos y al uso de modelos animales. En ambos, la manifestación de los síntomas de la gastroenteritis por rotavirus muestra una marcada dependencia a la edad donde a menor edad mayor susceptibilidad. Aunque los adultos también son susceptibles a la infección por rotavirus, no es común la manifestación de síntomas, a menos que su sistema inmune se encuentre comprometido (Gerber *et al.*, 2011). Comúnmente las cepas de rotavirus se limitan a infectar a un huésped en particular, no obstante, existe evidencia donde se han detectado cepas de rotavirus animales infectando humanos, lo que muestra que estos virus pueden traspasar la barrera de las especies (Ghosh *et al.*, 2011).

El rotavirus se transmite por la vía fecal-oral. Una vez que las partículas virales se exponen a la tripsina presente en los jugos intestinales, la proteína VP4, que forma parte de la cápside externa de rotavirus, sufre un reacomodo en su estructura y se fragmenta parcialmente en dos subunidades denominadas VP5* y VP8*. Este cambio le confiere estabilidad a la partícula viral e incrementa de manera considerable la infectividad del virus (Arias *et al.*, 1996). En el intestino delgado los rotavirus tienen afinidad por los enterocitos maduros, los cuales se localizan en la

parte superior de las vellosidades intestinales (Ramig, 2004). Estas células al ser infectadas por rotavirus sufren una fuerte inhibición del transportador de sodio-glucosa (SGLT1), lo que causa alteraciones en la absorción de glucosa y en la reabsorción de agua. Además, se ha observado un incremento de los niveles de calcio intracelular que se ha asociado con el efecto citopático producido por rotavirus (Brunet *et al.*, 2001). Así mismo, se describe una disminución de disacaridasas como maltasas, lactasas y sacaridasas a nivel de la mucosa en el lumen intestinal (Lundgren y Svensson, 2001). Estas alteraciones dificultan la digestión de carbohidratos, lo que induce el proceso de malabsorción de nutrientes. La destrucción de los enterocitos después del proceso de replicación viral, puede traer como consecuencia alteraciones en la superficie del epitelio intestinal, infiltración de monocitos e inflamación leve. Estas alteraciones en el epitelio intestinal además de asociarse con una malabsorción, se relacionan con cambios en la osmolaridad celular, secreción de fluidos y electrolitos, lo que a su vez se relacionan al proceso de diarrea en alguna de sus etapas (Morris y Estes, 2001).

Un aspecto interesante en el estudio de la patogénesis muestra que la lisis celular no siempre esta asociada al proceso de la diarrea. En algunos estudios *in vitro* con células de mamíferos, se ha observado que la infección de células intestinales polarizadas con rotavirus no se asocia con la destrucción de las células infectadas (Jourdan *et al.*, 1997). Aunado a esto, en un estudio con biopsias del epitelio intestinal de niños infectados con rotavirus durante la fase aguda de la infección, se mostró que solo 2 (5%) biopsias de las 40 realizadas presentaban evidencias de daño en el epitelio intestinal (Köhler *et al.*, 1990). Por lo que los factores que involucran a la patogénesis pueden ser muy variados e incluir no solo factores virales sino además celulares. En este sentido, el mecanismo que desencadena la diarrea también se ha relacionado con alteraciones en el Sistema Nervioso Entérico (SNE), esto se debe a que fármacos como la tetradoxina (TTX) y lidocaína, que bloquean el SNE, se asocian a la disminución de la intensidad de la diarrea (Lundgren *et al.*, 2000). Por tal motivo, la causa de la diarrea por una infección por rotavirus, puede deberse a varios factores presentes en las diferentes etapas del proceso infeccioso. Sin embargo, en las primeras etapas de la infección e incluso en la fase aguda, el proceso que desencadena la diarrea parece no estar asociado directamente al daño en la mucosa intestinal.

PROTEÍNAS VIRALES ASOCIADAS A LA SEVERIDAD DE LA GASTROENTERITIS POR ROTAVIRUS

En la búsqueda de los factores virales asociados a la diarrea por rotavirus, diversas investigaciones han revelado la importancia de algunos genes virales en relación con el proceso patogénico. Entre éstos factores virales se identifican los genes que codifican las proteínas estructurales VP3, VP4, VP6, y VP7, y para las proteínas no estructurales NSP1, NSP2, NSP3 y NSP4 (Hoshino *et al.*, 1995; Morris y Estes, 2001). La función de estas proteínas ha sido estudiada en gran medida por el papel que desempeñan en los procesos de infección, replicación y morfogénesis del virus. En este trabajo se analizan las evidencias de cada una de ellas para ser consideradas como un factor de patogenicidad.

PROTEÍNAS ESTRUCTURALES

Proteína VP3: Es una proteína estructural de 88 kDa codificada por el gen 3, ha sido descrita como una metil y guaniltransferasa que interacciona con el RNA de cadena sencilla (Patton and Chen, 1999). En las primeras etapas de la infección y una vez que el rotavirus se internaliza en las células, la baja concentración de calcio induce la pérdida de la cápside externa (Ruíz et al, 1996). Por consecuencia, se activa el proceso de transcripción y maduración del transcrito (RNA mensajero; RNAm) por la acción de la proteína VP3, mediante la adición del cap (m7GpppGm) en los transcritos virales en su extremo 5' (Estes, 2001; Cohen *et al.*, 1979). VP3 ha sido considerada un factor de patogénesis por su participación en la eficiencia de la replicación del virus y su actividad parece limitarse a la especificidad de huésped (Subodh *et al.*, 2006). Varios estudios han señalado a VP3 junto con VP4, VP7 y NSP4 como factores virales indispensables en la inducción de la diarrea (Hoshino *et al.*, 1995).

Proteína VP6: Es una de las proteínas más abundantes en la estructura viral y constituye la cápside intermedia de rotavirus. Esta proteína de 41 kDa codificada por el gen 6, es importante en la morfogénesis viral debido a que interacciona con la proteína VP2 de la cápside interna y con las proteínas VP4 y VP7 de la cápside externa durante el proceso de replicación. Esta interacción permite establecer la conformación estructural de los viriones infectivos de rotavirus. Al igual que VP4 y VP7, la proteína VP6 induce la producción de anticuerpos, y debido a que presenta antígenos específicos de grupo y subgrupo, se ha utilizado para establecer métodos serológicos de diagnóstico para rotavirus (Estes, 2001). Estudios previos reportan que VP6 puede jugar un papel

importante en la protección contra infecciones por rotavirus, debido a que el uso de anticuerpos no neutralizantes contra VP6 puede reducir la liberación crónica de virus en ratones inmunosuprimidos (Burns *et al.*, 1996). Por tal motivo, la participación de VP6 como factor de patogénesis puede estar en el marco de la replicación, y/o estimulación de una respuesta antiviral efectiva.

Proteínas VP4 y VP7: Los rotavirus muestran un tropismo celular hacia los enterocitos maduros en las vellosidades intestinales y hacia las líneas celulares de origen renal o intestinal (*in vitro*). En ambos casos el ingreso del virus a la célula depende tanto de receptores celulares como de las proteínas VP4 y VP7 de la cápside externa de rotavirus (Estes y Cohen, 1989). VP4 es una proteína de 88 kDa codificada por el gen 4, mientras que VP7 es una proteína de 37 kDa y es codificada por el gen 9 (Estes, 2001). Durante las primeras etapas de la infección un segmento entre los aa 93-208 en la fracción de VP8* en la proteína VP4, interacciona con una molécula de ácido siálico. Esta interacción, induce cambios en la conformación de VP4, en el segmento conocido como VP5*, lo que permite su interacción con la integrina $\alpha 2\beta 1$. Asimismo, se considera que el segmento VP5* también interactúa con la proteína de choque térmico hsc70, la cual se considera un receptor clave en el ingreso del virus a la célula (Isa *et al.*, 1997; Zárate *et al.*, 2000; Guerrero *et al.*, 2002; Graham *et al.*, 2003; Zárate *et al.*, 2003). Por su parte la proteína VP7, en los dominios de aa 161-169 y aa 253-255, interacciona con las integrinas $\alpha \nu \beta 3$ y $\alpha \nu \beta 2$ respectivamente, para dar inicio al proceso del ingreso del virus a la célula (Guerrero *et al.*, 2000; Graham *et al.*, 2003).

Se ha demostrado que además de participar en la penetración del virus a la célula, estas proteínas inducen la producción de anticuerpos neutralizantes contra rotavirus (Arias *et al.*, 1994; Kapikian *et al.*, 2001). Por tal motivo, inducen protección contra cepas de rotavirus en subsecuentes infecciones. No obstante, estudios antigénicos con VP4 han mostrado que los epitopes responsables del serotipo viral pueden variar de una cepa a otra (Contreras *et al.*, 1995). Lo que indica que variantes antigénicas están presentes entre las cepas que aparecen en los brotes epidémicos. Por tal motivo, un factor importante asociado a VP4 y VP7 puede radicar en la circulación de cepas relacionadas antigénicamente. Situación que se puede observar con la disminución de la magnitud y severidad de los brotes epidémicos después de la aplicación masiva de la vacuna contra rotavirus (Ruíz-Palacios *et al.*, 2007; Anderson *et al.*, 2011).

Además de aspecto antigénico, algunos investigadores han relacionado variaciones en los genes de VP4 y VP7 con cepas asintomáticas. Con respecto a VP4 estas variaciones de aminoácidos se presentan en la región de aa73-188 y en el aa 303. En el caso de VP7 los cambios asociados a cepas asintomáticas se observan en los aa 27, 29, 42, 70, 96 y 238 (Gorziglia *et al.*, 1988; Kirwood *et al.*, 1996; Pager *et al.*, 2000). Aunque algunos estudios se han enfocado en determinar dónde radica la atenuación de las cepas patógenas de rotavirus, a la fecha no está claro el rol de estas proteínas en la atenuación. No obstante, un estudio en niños mexicanos sugiere una relación entre los genotipos VP4 circulantes entre la población infantil y la severidad de la gastroenteritis (Mota-Hernández *et al.*, 2003). Aunque estos estudios sugieren que el gen que codifica la proteína VP4 e incluso VP7 puede asociarse con la virulencia, es necesario ampliar los estudios en infantes con infecciones primarias para establecer el rol de estas proteínas en la severidad de la gastroenteritis, así como la importancia de la memoria inmunológica para las futuras infecciones.

PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES

Proteína NSP1: Aunque la mayoría de las proteínas no estructurales de rotavirus se asocian con funciones en la replicación viral, la proteína NSP1 parece ser la excepción, puesto que no se le asocia a las actividades de transcripción, traducción o replicación en general. Esta proteína de 53 kDa codificada por el gen 5 ha sido relacionada con la evasión de la respuesta inmune innata durante una infección por rotavirus, por la inhibición o degradación de algunos componentes del interferón tipo 1 (IFN) (Graff *et al.*, 2007; Graff *et al.*, 2009). En un estudio donde la expresión de NSP1 fue silenciada por RNAs de interferencia, se observó que esta proteína juega un rol importante en la propagación de rotavirus de célula a célula (Barro y Patton, 2005). Esta habilidad de NSP1 para evadir la respuesta inmune la coloca como una proteína que aunque no está directamente relacionada con la severidad de la gastroenteritis, su rol en evadir la respuesta inmune permite que los demás elementos virales realicen su función en la replicación viral y por consecuencia en la alteración celular que conduce a la diarrea por rotavirus.

Proteína NSP2: Esta proteína de 35 kDa es codificada por el gen 8. Se caracteriza por interactuar con el RNAdc y el RNA de cadena sencilla (RNAs). Tiende a formar octámeros e interacciona con proteínas virales como VP1 y NSP5. Se ha observado que *in vitro* presenta una actividad enzimática de nucleósido trifosfatasa (NTPasa) (Kattoura *et al.*, 1992; Taraporewala *et*

al., 2002). La presencia de Mg^{+2} favorece la actividad de NSP2 para catalizar la hidrólisis de NTP a NDP, como consecuencia, la proteína es fosforilada. La fosforilación y desfosforilación de NSP2 puede favorecer su interacción con el RNA viral que será empaquetado en la cápside interna de los viriones (Taraporewala *et al.*, 1999). Al igual que VP3 la participación de NSP2 en la patogénesis viral parece limitarse a su rol en la eficiencia del proceso de replicación viral, lo cual a su vez se refleja en la carga viral infectiva que se produce después del proceso de replicación.

Proteína NSP3: Durante el proceso de transcripción del genoma de rotavirus, VP3 modifica el RNAm al adicionar el cap en su extremo 5' (Patton y Chen, 1999). No obstante, los RNAm de rotavirus no sufren modificación en su extremo 3' ya que les falta la cola de poly A. En los RNAm eucarióticos tanto el cap como la poliadenilación son esenciales para el inicio de la traducción. En esta etapa participa un compuesto multimérico que asegura la interacción del factor de inicio eIF4E con el cap del extremo 5' y de eIF4G con la proteína de unión a la cola poli A que posteriormente se une a esta región. Esta doble interacción permite iniciar la traducción de las proteínas eucarióticas de una manera eficiente (Wells *et al.*, 1998).

Durante la infección por rotavirus, la traducción de proteínas celulares es inhibida de una forma eficiente durante las primeras horas de infección. Este rol lo realiza la proteína NSP3, proteína no estructural de 34 kDa codificada por el gen 7. Durante este proceso de inhibición, NSP3 se asocia al factor de iniciación eIF4G evitando la interacción con la proteína de unión a poli A (Vende *et al.*, 2000). Al evitar esta interacción se inhibe la traducción celular y se impulsa la síntesis de proteínas virales (Piron *et al.*, 1998). Esta disminución de la síntesis de proteínas celulares no es compatible con la sobrevivencia de la célula. Por lo que NSP3 puede ser considerada como una proteína importante en la patogénesis por rotavirus.

Proteína NSP4: De todas las proteínas asociadas a la patogénesis viral, la proteína NSP4 ha sido de las más estudiadas por ser una proteína multifuncional. Esta proteína glicosilada de 28 kDa codificada por el gen 10, ha sido relacionada con la morfogénesis viral en las últimas etapas de la replicación y con la patogénesis de rotavirus. Por un lado, participa en la morfogénesis de rotavirus al actuar como receptor intracelular en el retículo endoplásmico donde interacciona con VP6 en partículas virales que sólo presentan la cápside interna e intermedia y con las proteínas VP4 y VP7 de la cápside externa. Esta interacción favorece el ensamblaje de la partícula viral completa durante las últimas etapas del ciclo replicativo de rotavirus (Tian *et al.*, 1996). En

ensayos donde la expresión de NSP4 es silenciada por RNA de interferencia, se observa un gran número de partículas virales incompletas (López *et al.*, 2005). Por otro lado, NSP4 ha sido descrita como una enterotoxina, debido a que la proteína por sí sola ha inducido diarrea en ratones neonatos (Ball *et al.*, 1996), así como en otros mamíferos y aves (Zhang *et al.*, 1998; Halaihel *et al.*, 2000; Mori *et al.*, 2002). Sin embargo, en humanos aún se desconoce si NSP4 pueda tener el mismo efecto. Debido a lo anterior, NSP4 ha sido considerada uno de los principales y más estudiados factores de patogénesis de rotavirus.

ACTIVIDAD DE NSP4 COMO ENTEROTOXINA VIRAL

La actividad de NSP4 como enterotoxina se descubrió durante la producción de anticuerpos contra la misma. En 1996, Ball y colaboradores inocularon la proteína NSP4 en el peritoneo de ratones de nueve días de nacidos y observaron que en poco tiempo éstos padecían diarrea. Estudios posteriores realizados por el mismo equipo de trabajo, mostraron que la proteína NSP4, una fracción de la misma (aa 112-175) e incluso un pequeño segmento de ésta (aa 115-135) podían inducir diarrea en ausencia de cualquier otra proteína de rotavirus (Ball *et al.*, 1996). Para tratar de explicar la actividad de NSP4 al inducir la diarrea, se realizaron algunos estudios *in vitro*, los resultados describen la habilidad de NSP4 para inducir un incremento del flujo de calcio intracelular del retículo endoplásmico hacia el citoplasma; este incremento se relaciona con la desestabilización de la membrana celular y los procesos que desencadenan la diarrea (Dong *et al.*, 1997; Brunet *et al.*, 2001). Por otro lado, estudios posteriores han indicado que un fragmento de NSP4 puede ser secretado de las células infectadas por una vía no clásica dependiente de Ca^{+2} previa a la lisis celular (Gibbons *et al.*, 2011). El fragmento de NSP4 liberado puede unirse a receptores no definidos en células no infectadas y desencadena una cascada iniciada por fosfolipasa C-inositol 1,3,5-trifosfato (PLC-IP3) que culmina en la liberación de Ca^{+2} del retículo endoplásmico incrementando el Ca^{+2} intracitoplásmico. Si NSP4 actúa en enterocitos induce una disrupción en las uniones celulares, resultando en permeabilidad paracelular de agua; si actúa en células crípticas incrementa el Ca^{+2} intracelular induciendo secreciones mediadas por la activación del transporte de Cl^- . También se considera que la proteína NSP4 secretada o alguna otra molécula liberada de las células infectadas pueden estimular el SNE, lo que contribuye con el proceso de la diarrea (Dong *et al.*, 1997; Lundgren *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000). Debido a la actividad de NSP4 como enterotoxina, se visualizó la posibilidad de producir vacunas contra

rotavirus utilizando a NSP4 como proteína blanco; sin embargo, por lo menos para la cepa de rotavirus humano denominada 89-12, la cual fue la base de la producción de la vacuna monovalente que actualmente se utiliza en México, la atenuación no estaba relacionada a mutaciones en NSP4 (Ward *et al.*, 1997). Otros estudios tampoco han mostrado correlación entre los péptidos señal de la proteína NSP4 de rotavirus aislados de casos sintomáticos o asintomáticos (Horie *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2000). Estas evidencias indican la necesidad de realizar más estudios para mostrar que ciertas características de NSP4 son relevantes para determinar su actividad de enterotoxina.

ESTRATEGIAS DE PREVENCIÓN CONTRA ROTAVIRUS

La diarrea por rotavirus puede ser multifactorial y de todos los factores de patogénesis de rotavirus las proteínas VP4 y VP7 han sido el blanco para el diseño de estrategias de prevención como las vacunas. Hasta el momento el diseño de vacunas se basa en la incorporación de los genotipos P y G predominantes. En México a partir del 2006 se introdujo la vacuna contra rotavirus en el programa nacional de vacunación (Rotarix[®], GSK). Esta vacuna se aplica vía oral y consta de dos dosis, mismas que se aplican a los dos y cuatro meses de vida (World Health Organization, 2007). La vacuna Rotarix[®] está basada en la atenuación de la cepa 89-12 del rotavirus, la cual fue aislada de un niño con gastroenteritis en Cincinnati, Ohio, en los Estados Unidos de América (Ward y Bernstein, 2009). Esta cepa de rotavirus atenuada es de genotipo G1P[8] y ha mostrado que confiere protección contra otras cepas G1, y no G1 incluyendo G3, G4 y G9. Sin embargo, se requieren más estudios para probar su efectividad contra cepas G2P[4] (Pérez-Vargas *et al.*, 2005; Snelling *et al.*, 2011). Por otro lado, se ha mostrado que la vacuna es segura y brinda protección contra rotavirus a niños de entre 6 y 11 meses de edad aunque después de los 12 meses su efectividad puede disminuir (Correia *et al.*, 2010). Esta vacuna también ha mostrado que reduce la incidencia de gastroenteritis severa desde un 60 hasta un 80% incluso en países en vía de desarrollo, donde la gastroenteritis por rotavirus tiende a ser más severa debido a las deficiencias nutricionales de los niños infectados (Ruíz-Palacios *et al.*, 2006; Anderson *et al.*, 2011; Linhares *et al.*, 2008). En México, estudios para evaluar diferentes dosis de Rotarix[®] (GSK) y su eficiencia, mostraron que la vacuna puede conferir protección hasta de un 100% en contra de casos severos de gastroenteritis por rotavirus (Ruíz-Palacios *et al.*, 2007).

El análisis de los diferentes factores virales de rotavirus y la forma en que interactúan entre sí y con algunas proteínas celulares contribuye a elucidar los mecanismos de infección, replicación y patogénesis viral. De manera indirecta, algunas de las proteínas asociadas a mecanismos de infección y replicación pueden influir en la virulencia de rotavirus. En este aspecto resaltan las proteínas VP3, NSP3 y NSP2, debido a que estas proteínas influyen en la eficiencia de la replicación viral, lo que a su vez favorece la propagación del virus de célula a célula propagando la infección a lo largo del epitelio intestinal. Por otro lado, otras proteínas virales como VP4, VP7, VP6 y NSP1 pueden asociarse directamente con la patogénesis de rotavirus al inducir una respuesta inmune o al evadir la misma. Sin embargo, el factor más importante que se relaciona con la patogénesis de rotavirus es la toxina viral NSP4, la cual a diferencia de otros factores de patogénesis virales que pueden depender unos de otros, desencadena los procesos que conllevan a la diarrea.

Aunque se considera que la respuesta inmune del niño infectado con rotavirus juega un rol importante en la atenuación de la severidad de la gastroenteritis, se deben de considerar también todos aquellos indicios que señalan los factores de patogénesis que influyen en el proceso infeccioso. El comprender los mecanismos por los cuales los factores virales influyen en las diferentes cepas de rotavirus que se describan como severas o asintomáticas, dará la clave para disminuir o eliminar la virulencia de rotavirus. Por consecuencia se tendrá una mejor visión para la elaboración de estrategias de prevención y/o tratamiento una vez establecida la infección viral.

REFERENCIAS

- Anderson, E. Rupp, A. Shulman, S. Wang, D. Zheng, X & Noskin, G. (2011). Impact of rotavirus vaccination on hospital-acquired rotavirus gastroenteritis. *Pediatrics*. 127, e264–e270.
- Argüelles, M. Villegas, G. Castello, A. Abrami, A. Ghiringhelli, P. Semorille, L. & Glikmann, G. (2000). VP7 and VP4 of human group A rotavirus in Buenos Aires, Argentina. *J Clin Microbiol*. 38, 252-259.
- Arias, C.F. López, S. Mascarenhas, J.D.P. Romero, P. Cano, P. Gabbay, Y.B. Freitas, R & Linhares, A.C. (1994). Neutralizing antibody immune response in children with primary and secondary rotavirus infections. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1, 89-94.
- Arias, C.F. Romero, P. Alvarez, V. & López, S. (1996). Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *J Virol*. 70, 5832-5839.

- Arista, S. Vizzi, E. Ferraro, D. Cascio, A. & Stefano, R. (1997). Distribution of VP7 serotypes and VP4 genotypes among rotavirus strains recovered from Italian children with diarrhea. *Arch Virol.* 142, 2065-2071.
- Ball, J.M. Tian, P. Zeng, C. Morris, A. & Estes, M. (1996). Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science.* 272, 101-104.
- Barro, M & Patton, J.T. (2005). Rotavirus nonstructural protein 1 subverts innate immune response by inducing degradation of IFN regulatory factor 3. *PNAS.* 102, 4114-4119.
- Brunet, J.P. Cotte, J. Linxe, C. Quero, A.N. Niteau, M & Servin, A. (2001). Rotavirus infection induces an increase in intracellular calcium concentration in human intestinal epithelial cells: role in microvillar actin alteration. *J Virol.* 74, 2323-2332.
- Burns, J. Siadat-Pajouh, M. Krishnaney, A & Greenberg, H. (1996). Protective effect of rotavirus VP6-specific IgA monoclonal antibodies that lack neutralizing activity. *Science.* 272, 104-107.
- Cohen, J. Laporte, J. Charpilienne, A & Scherrer, R. (1979). Activation of rotavirus RNA polymerase by calcium chelation. *Arch Virol.* 60, 177-186.
- Contreras, J. Menchaca, G. Padilla-Noriega, L. Tamez, R. Greenberg, H. López, S & Arias, C. (1995). Heterogeneity of VP4 neutralization epitopes among serotype P1A human rotavirus strain. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2, 506-508.
- Correia, J. Patel, M. Nakagomi, O. Montenegro, F. Germano, E. Correia, N. Cuevas, L. Parashar, U. Cunliffe, N & Nakagomi, T. (2010). Effectiveness of monovalent rotavirus vaccine (Rotarix) against severe diarrhea caused by serotypically unrelated G2P[4] strains in Brazil. *J Infect Dis.* 201, 363-369.
- Desselberger, U. Manktelow, E. Li, W. Cheung, W. Iturriza-Gómara, M. & Gray, J. (2009). Rotaviruses and rotavirus vaccines. *British Medical Bulletin.* 90, 37-51.
- Dong, Y. Zeng, C. Ball, J. Estes, M & Morris, A. (1997). The rotavirus enterotoxin NSP4 mobilizes intracellular calcium in human intestinal cells by stimulating phospholipase C-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate production. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94, 3960-3965.
- Estes, M. (2001). Rotaviruses and their replication. En: D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, and S. E. Strais (ed.). *Fields virology.* 4th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, Pa. pp. 1747-1785.
- Estes, M. K. & Cohen, J. (1989). Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev* 53:410-49.
- Gerber, S. Cortese, M & Bowen, M. (2011). Notes from the field: Outbreaks of rotavirus gastroenteritis among elderly adults in two retirement communities. *JAMA.* 306, 2667-2668.
- Ghosh, S. Gatheru, Z. Nyangao, J. Adachi N. Urushibara, U & Kobayashi, N. (2011). Full genomic analysis of a simian SA11-like G3P[2] rotavirus strain isolated from an asymptomatic infant: identification of novel VP1, VP6 and NSP4 genotypes infection. *Infection Genetics and Evolution.* 11, 57-63.
- Gibbons, T. Storey, S. Williams, C. McIntosh, A. Mitchell, D. Parr, R. Schroeder, M. Schroeder, F & Ball, J. (2011). Rotavirus NSP4: Cell type-dependent transport kinetics to the exofacial plasma membrane and release from intact infected cells. *Virology Journal.* 8, 278-297.

- Gorziglia, M. Green, K. Nishiwaka, K. Taniguchi, K. Jones, R. Kapikian, A. & Chanok, R. (1988). Sequence of the fourth gene of human rotavirus recovered from asymptomatic or symptomatic infections. *J Virol.* 62, 2978-2984.
- Graff, J. Ewen, J. Ettayebi, K & Hardy M. (2007). Zinc-binding domain of rotavirus NSP1 is required for proteasome-dependent degradation of IRF3 and autoregulatory NSP1 stability. *J Gen Virol.* 88, 613-620.
- Graff, J. Ettayebi, K. & Hardy, M. (2009). Rotavirus NSP1 inhibits NF κ B activation by inducing proteasome-dependent degradation of b-TrCP: A novel mechanism of IFN antagonism. *PLoS Pathogens.* 5, 1-12.
- Graham, K. Halasz, P. Tan, Y. Hewish, M. Takada, Y. Mackow, E. Robinson, M & Coulson, B. (2003). Integrin-using rotaviruses bind alpha2beta1 integrin alpha2 I domain via VP4 DGE sequence and recognize alphaXbeta2 and alphaVbeta3 by using VP7 during cell entry. *J Virol.* 77, 9969-9978.
- Guerrero, C. Bouyssounade, D. Zárate, S. Iša, P. López, T. Espinosa, R. Romero, P. Méndez, E. López, S & Arias, C. (2002). Heat Shock Cognate Protein 70 Is Involved in Rotavirus Cell Entry. *J Virol.* 76, 4096-4102.
- Guerrero, C. Mendez, E. Zarate, S. Isa, P. López, S & Arias, C.F. (2000). Integrin α v β 3 mediates rotavirus cell entry. *PNAS.* 97, 14644-14649.
- Halaihel, N. Lievin, V. Ball, J. M. Estes, M. K. Alvarado, F. & Vasseur, M. (2000). Direct inhibitory effect of rotavirus NSP4(114-135) peptide on the Na⁺-D-glucose symporter of rabbit intestinal brush border membrane. *J Virol.* 74, 9464-9470.
- Horie, Y. Masamune, O & Nakagomi, O. (1997). Three major alleles of rotavirus NSP4 proteins identified by sequence analysis. *J Gen Virol.* 78, 2341-2346.
- Hoshino, Y. L. Saif, J.L. Kang, S.Y. Sereno, M.M. Chen, W.K & Kapikian, A.Z. (1995). Identification of group A rotavirus genes associated with virulence of a porcine rotavirus and host range restriction of a human rotavirus in the gnotobiotic piglet model. *Virology.* 209, 274-280.
- Isa, P. López, S. Segovia, L & Arias, C. (1997). Functional and structural analysis of the sialic acid-binding domain of rotaviruses. *J Virol.* 71:6749-56.
- Iturriza-Gómara, M. Kang, G. Mammen, A. Jana, A. Abraham, M. Desselberg, U. Brown, D & Gray, J. (2004). Characterization of G10P[11] rotaviruses causing acute gastroenteritis in neonates and infants in Vellore, India. *J Clin Microbiol.* 42, 2541-2547.
- Jourdan, N. Maurice, M. Delautier, D. Quero, A.M. Servin, A.L. & Trugnan, G. (1997). Rotavirus is released from the apical surface of cultured human intestinal cells through nonconventional vesicular transport that bypasses the Golgi apparatus. *J Virol.* 71 (11), 8268-8278.
- Kapikian, A. Hoshino, Y & Chanock, R. (2001). Rotaviruses. En: D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, and S. E. Strais (ed.), *Fields virology*, 4th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, Pa. pp. 1787-1833.
- Kattoura, M. Clapp, L. & Patton, J. (1992). The rotavirus nonstructural protein NS35, possesses RNA-binding activity in vitro and in vivo. *Virology.* 192, 698-708.

- Kirwood, C. Coulson, B & Bishop, R. (1996). G3P2 rotaviruses causing diarrhoeal disease in neonates differ in VP4, VP7 y NSP4 sequence from G3P2 strains causing asymptomatic neonatal infection. *Arch Virol.* 141, 1661-76.
- Köhler, T. Erben, U. Wiedersberg, H & Bannert, N. (1990). [Histological findings of the small intestinal mucosa in rotavirus infections in infants and young children]. *Kinderarztl Prax.* 58, 323-327.
- Lee, C. Wang, Y. Kao, C. Zao, C. Lee, C & Chen, H. (2000). NSP4 gene analysis of rotaviruses recovered from infected children with and without diarrhea. *J Clin Microbiol.* 38, 4471-4477.
- Linhares, A. Velázquez, F. Pérez-Schael, I. Sáez-Llorens, X. et al. (2008). Efficacy and safety of an oral live attenuated human rotavirus vaccine against rotavirus gastroenteritis during the first 2 years of life in Latin American infants: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase III study. *The Lancet.* 371, 1181 – 1189.
- López, T. Camacho, M. Zayas, M. Nájera, R. Sánchez, R. Arias, C & López, S. (2005). Silencing the Morphogenesis of Rotavirus. *J of Virol.* 79, 184-192.
- Lundgren O & Svensson L. (2001). Pathogenesis of rotavirus diarrhea. *Microbes and Infection.* 3, 1145-1156.
- Lundgren, O. Peregrin, A. Persson, K. Kordasti, S. Uhnoo, I & Svensson L. (2000). Role of enteric nervous system in the fluid and electrolyte secretion of rotavirus diarrhea. *Science.* 287, 491-495.
- Matthijnssens, J. Ciarlet, M. Heiman, E. Arijs, I. Delbeke, T. McDonald, S. Palombo, E. Iturriza-Gomara, M. Maes, P. Patton, J. Rahman, M & Van Ranst, M. (2008). Full genome-based classification of rotaviruses reveals common origin between human Wa-like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *J Virol.* 82, 3204-3219.
- Mori, Y. Borgan, M. Ito, N. Sugiyama, M & Minamoto, N. (2002). Diarrhea-Inducing Activity of Avian Rotavirus NSP4 Glycoproteins, Which Differ Greatly from Mammalian Rotavirus NSP4 Glycoproteins in Deduced Amino Acid Sequence, in Suckling Mice. *J Virol.* 76, 5829-5834.
- Morris, A & Estes, M. (2001). *Microbes and Microbial Toxins: Paradigms for Microbial Mucosal Interactions VIII: Pathological consequences of rotavirus infection an enterotoxin.* *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 281, G303-G310.
- Mota-Hernández, F. Calva, J. Gutierrez, C. Villa, S. Arias, C. Padilla L. Guiscafré, H. Cedillo, R. Herrera, I & Puerto, F. (2003). Rotavirus diarrhea severity is related to the VP4 type in mexican children. *J Clin Microbiol.* 41, 3158-3162.
- O'Halloran, F. Lynch, M. Cryan, B & Fanning, S. (2002). Application of restriction fragment length polymorphism analysis of VP7- encoding genes fine comparison of Irish and global rotavirus isolates. *J Clin Microbiol.* 40, 524-531.
- Pager, C. Alexander, J & Steele, A. (2000). South African G4P[6] asymptomatic and symptomatic neonatal rotavirus differ in their NSP4, VP8 and VP7 genes. *J Med Virol.* 62, 208-216.
- Parashar, U. Gibson C. Bresee, J & Glass R. (2006). Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis.* 12, 304-306.

- Parashar, U. Hummelman, G. Bresee, J. Miller, M & Glass, R. (2003). Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis.* 9, 565-571.
- Patton, J & Chen, D. (1999). RNA-binding and capping activities of proteins in rotavirus open cores. *J Virol.* 73,1382-1391.
- Pérez-Vargas, Isa, P. López, S. & Arias, C. (2005). Rotavirus vaccine early introduction in Latin America-risks and benefits. *J Virol.* 37,1-10.
- Piron, M. Vende, P. Cohen, J & Poncet, D. (1998). Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *EMBO J.* 17, 5811-21.
- Rahman, M. Leener, L. Goegebuer, T. Wollants, E. Van der Dock, I. Van Hoves, L & Ranst, M. (2003). Genetic characterization of a novel, naturally occurring recombinant human G6P[6] rotavirus. *J Clin Microbiol.* 41, 2088-2095.
- Ramachandran, M. Gentsch, J. Parashar, U. Jin, S. Woods, P. Holmes, J. Kirwood, C. Bishop, R. Greenberg. Gerna, G. Coulson, B. Taniguchi, K. Bresee, J & Glass, R. (1998). Detection and characterization of novel rotavirus strain in the United States. *J Clin Microbiol.* 36, 3223-3229.
- Ramig, R. (2004). Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *J Virol.* 78, 10213–10220.
- Richardson, V. Hernandez-Pichardo, J. Quintanar-Solares, M. Esparza-Aguilar, M. Johnson, B. Gomez-Altamirano, C. Parashar, U. & Patel, M. (2010). Effect of rotavirus vaccination on death from childhood diarrhea in Mexico. *N Engl J Med.* 362, 299-305.
- Ruíz, M. Charpilienne, A. Liprandi, F. Gajardo, R. Michelangeli, F & Cohen, J. (1996). The concentration of Ca²⁺ that solubilizes outer capsid proteins from rotavirus particles is dependent on the strain. *J Virol.* 70,4877-83.
- Ruíz-Palacios, G. Perez-Schael, I. Valazquez, F. et al. (2006). Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N Engl J Med.* 354, 11–22.
- Ruíz-Palacios, G.M. Guerrero, M.L. Bautista-Marquez, A. et al. (2007). Dose response and efficacy of a live, attenuated human rotavirus vaccine in Mexican infants. *Pediatrics.* 120, e253–61.
- Ruuska, T & Vesikari, T. (1991). Rotavirus disease in Finnish children: use of numerical scores for clinical severity of diarrhoeal episodes. *Scand J Infect Dis.* 22, 259-267.
- Snelling, T. Andrews, R. Kirkwood, C. Culvenor, S. & Carapetis J. (2011). Case-control evaluation of the effectiveness of the G1P[8] Human Rotavirus Vaccine during an outbreak of rotavirus G2P[4] infection in central Australia. *CID.* 52, 191–199.
- Subodh, S. Bhan, M.K & Ray P. (2006). Genetic characterization of VP3 gene of group A rotaviruses. *Virus Genes.* 33, 143-145.
- Taraporewala, Z. Chen, D & Patton, J. (1999). Multimers formed by the rotavirus nonstructural protein NSP2 bind to RNA and have nucleoside triphosphatase activity. *J Virol.* 73,9934-9943.

- Taraporewala, Z. Schuck, P. Ramig, R. Silvestri, L & Patton, J. (2002). Analysis of a Temperature-Sensitive Mutant Rotavirus Indicates that NSP2 Octamers Are the Functional Form of the Protein. *J Virol.* 76:7082-7093.
- Tian, P. Ball, J., Zeng, C. & Estes, M. (1996). The rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 possesses membrane destabilization activity. *J Virol.* 70, 6973–6981.
- Vende, P. Piron, M. Castagne, N & Poncet, D. (2000). Efficient translation of rotavirus mRNA requires simultaneous interaction of NSP3 with the eukaryotic translation initiation factor eIF4G and the mRNA 3' end. *J Virol* 74, 7064–7071.
- Ward, R. & Bernstein, D. (2009). Rotarix: a rotavirus vaccine for the world. *Clin Infect Dis.* 48, 222-228.
- Ward, R. Mason, B. Bernstein, D. Sander, D. Smith, V. Zandle, G & Rappaport, R. (1997). Attenuation of a human rotavirus vaccine candidate did not correlate with mutations in the NSP4 protein gene. *J Virol.* 71, 6267–6270.
- Wells, S. Hillner, P. Vale, R & Sach A. (1998). Circularization of mRNA by Eukaryotic Translation Initiation Factors. *Molecular Cell*, 2, 135–140.
- World Health Organization. (2007). Rotavirus Vaccines. *Wkly Epidemiol Rec.* 82: 285–96.
- Wickelgren I. (2000). How rotavirus causes diarrhea. *Science.* 287, 409-411.
- Zárate, S. Espinosa, R. Romero, P. Guerrero, C. Arias, C & López, S. (2000). Integrin $\alpha 2\beta 1$ mediates the cell attachment of the rotavirus neuraminidase-resistant variant nar3. *Virology* 278:50-4.
- Zárate, S. Cuadras, M. Espinosa, R. Romero, P. Juárez, K. Camacho-Nuez, M. Arias, C & López, S. (2003). Interaction of rotaviruses with Hsc70 during cell entry is mediated by VP5*. *J Virol.* 77,7254-60.
- Zhang, M. Zeng, Q. Dong, Y. Ball, J. Saif, L. Morris, A & Estes, M. (1998). Mutations in rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 are associated with altered virus virulence. *J Virol.* 72, 3666–3672.
- Zhang, M. Zeng, C. Morris, A & Estes MK. (2000). A functional NSP4 enterotoxin peptide secreted from rotavirus-infected cells. *J Virol.* 74, 663-11670.



AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY

Boston
JUNE 1-5, 2008
**108TH
GENERAL
MEETING**

ABSTRACTS

ISBN 978-1555814939

T-005. NSP4 Gene Analysis of Rotavirus Isolated of Infants with and without Gastroenteritis

J. F. Contreras, G. Gonzalez, R. S. Tamez;

Univ. Autonoma de Nuevo Leon, San Nicolas de los Garza, Nuevo Leon, MEXICO.

Rotavirus NSP4 is a multifunctional protein of 175 amino acids that is capable to induce diarrhea and is considered the viral enterotoxin. This protein is encoded by gene 10 and sequence analyses from humans and animals have revealed the existence of six different genotypes (A to F), with human genotypes belonging to NSP4 A, B or C. During viral morphogenesis, different regions in this protein interact with other cellular and viral molecules, but it is unknown if mutations in these regions could be important in the modulation of the severity of the disease. In the present work we are interested in determine if there is a correlation between the mutations inside the interacting regions of NSP4 gene with the grade of severity of diarrhea. We analyzed 66 samples of feces with rotavirus from children less than two years of age with gastroenteritis and four samples from asymptomatic children. The presence of the RNA characteristic of rotavirus was determined by electrophoresis in a continuous system. RNA was analyzed by RT-PCR to amplify the gene 10 using different combinations of two set of primers, to increase the number of strains that can be amplified. Afterward we determine the human genotypes of NSP4. The PCR products were denatured and put under a SSCP system to detect differences in migration patterns and representative samples were used for nucleotide sequence. We were able to amplify the complete or partial gene in 62 (93%) of symptomatic samples and 4 (100%) of asymptomatic samples. The results of genotyping showed the presence of 58 (93%) symptomatic and 4 (100%) asymptomatic strains with genotype Wa. Studies by SSCP of these genotypes showed five patterns. With less severe cases and asymptomatic strain inside model two and the most severe cases in the model 4. The nucleotide sequence showed a mutation in the residue 111 that correspond to alpha helix region of the model 2 and a mutation in the position 132 that correspond to the interaction site of caveolin and the region of enterotoxin. These results indicate that mutations of these regions of the NSP4 protein can be considered as an important factor of modulating the grade of severity of the gastroenteritis by rotavirus.

Contreras JF. **González G. 2008.** NSP4 Gene Analysis of Rotavirus Isolated of Infants with and without Gastroenteritis. Abstract. ASM, 108th General Meeting. ISBN 978-1555814939

American Society for Microbiology

General **107th** Meeting

Tor  **nto**

May 21-25, 2007

Abstracts

ISBN 1-55581-4344

T-005. NSP4 Gene Analysis of Rotavirus Isolated of Infants with Severe Gastroenteritis

J. F. Contreras, G. Gonzalez, R. Tamez;

Universidad Autonoma de Nuevo Leon, San Nicolas de los Garza, Nuevo León,
MEXICO.

Rotaviruses are an important cause of hospitalization of infants under two years old during fall and winter seasons. Previous studies have shown that the glycoprotein NSP4 plays a role in rotavirus pathogenesis by functioning as an enterotoxin, increasing Ca^{2+} level and triggering the diarrheic processes. However, the mechanisms by which rotavirus can cause severe gastroenteritis is not known. In the present study, the principal goal is to determine if exist a correlation between the polymorphism of the NSP4 gene with the severe cases of diarrhea. In this study, 123 samples of faeces of children less than 5 years of age collected of October of 2004 to March of 2005 were analyzed. The presence of the RNA characteristic of rotavirus was determined by electrophoresis in a continuous system. Later the RNA was put under RT-PCR to determine the genotypes of NSP4. The PCR products were denatured and put under a SSCP system to detect the intragenotypic polymorphic. The results show us that 64 (52%) samples presented the model of migration characteristic of rotavirus and the predominance of Wa genotype with 57 (89%) of them. Studies by SSCP of these genotypes showed five patters. The nucleotide sequence of each models showed for the models 1, 2, 3 and 5 variations principally in the regions that codified amino acids 115-140 but it does not for the model 4 that was related to the most severe cases. These results indicate that mutations of this protein can be considered as an important factor of viral pathogenesis in natural infections.

Contreras JF, **González G**, Tamez R. **2007**. NSP4 Gene Analysis of Rotavirus Isolated of Infants with Severe Gastroenteritis. Abstract. ASM, 107th General Meeting. ISBN 1-55581-4344.