



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **Estudio piloto para valorar la producción de eventos patogénicos tempranos asociados a la infección por astrovirus**

**Adriana Milena Olarte Aponte**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Medicina  
Departamento de Ciencias Fisiológicas  
Bogotá, Colombia

2016

# **Estudio piloto para valorar la producción de eventos patogénicos tempranos asociados a la infección por astrovirus**

**Adriana Milena Olarte Aponte**

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:  
Magístra en Bioquímica.

Director:

Ph.D., M.Sc., Microbiólogo Industrial Juan Carlos Ulloa Rubiano

Co-Director:

Ph.D., M.Sc., Doctor Carlos Arturo Guerrero Fonseca

Línea de Investigación.

Caracterización epidemiológica y molecular de virus entéricos

Grupo de investigación:

Enfermedades Infecciosas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina

Departamento de Ciencias Fisiológicas

Bogotá, D.C., Colombia

2016

*A María Camila quien es el motor de mi vida y  
a mis padres Luz Stella y Vicente por el apoyo incondicional en mis proyectos,  
¡Los amo!*

*Hacemos que nuestro mundo tenga significado a través del  
coraje de nuestras preguntas, y de la profundidad de nuestras respuestas  
Carl Sagan.*

# **Agradecimientos**

*En primer lugar, a Dios quien es mi ser superior y me brinda día tras día la capacidad y las ganas de salir siempre adelante en mis proyectos y sueños.*

*A mis padres y mis hermanos por ser el apoyo incondicional en mi vida, gracias a ellos por estar siempre ahí para mí.*

*A mi hija María Camila, sin ella este y muchos otros sueños no serían viables en mi vida es mi motor para seguir día tras día en mi camino.*

*A Samuel quien ha sido apoyo moral en estos últimos años, quien ha estado ahí sin importar nada más, mil gracias por soportar al lado mío, tantas subidas y bajadas de ánimo en este proceso y siempre animarme a seguir.*

*Al Dr. Juan Carlos Ulloa Rubiano por depositar en mí su voto de confianza, por la oportunidad, por creer en mis capacidades como investigadora por asumir conmigo este proceso, este riesgo que significa la labor científica aquí en Colombia; mil gracias.*

*Al Dr. Carlos Guerrero por su apoyo incondicional*

*A mis compañeros de clase durante la maestría y a mis amigos del laboratorio; Mónica Villalba, Sandra Salas, Nury Olaya, Camilo Suarez, Carolina Martinez, Elkin Amaya y las niñas del lab, quienes le dieron una cara amable a este arduo trabajo de la investigación, los aprecio mucho. Finalmente, a la Pontificia Universidad Javeriana por financiar el proyecto y por supuesto a la Universidad Nacional de Colombia.*

## Resumen

Los astrovirus son agentes virales enteropatógenicos que infectan mamíferos y aves, son agentes que producen principalmente diarrea y en algunos casos producen síntomas asociados como fiebre, vómito, dolor abdominal y dolor de cabeza. Por otra parte, su presencia ha sido reportada en los enterocitos que se localizan en la zona apical de las vellosidades del intestino delgado, sin embargo, en estudios más recientes se han determinado asociaciones extra-intestinales en humanos, visones, ganado bovino y recientemente en porcinos. Por otro lado, la producción de estados de viremia ha sido reportada en lechones y humanos.

Teniendo en cuenta que hasta la fecha no se tiene establecido un modelo animal para el estudio de la patogénesis de astrovirus, en este trabajo se planteó utilizar al cerdo convencional como modelo experimental para determinar el organotropismo y algunos síntomas asociados a la infección experimental por astrovirus utilizando la cepa PUJP5 (PoAstV/PUJP5). De este modo, se determinó la presencia del virus en heces y muestras de tejido tanto intestinal como extra-intestinal. De igual manera, se analizaron datos colectados a partir del monitoreo de peso y temperatura corporal, y otras observaciones de los animales incluidos en el estudio.

Los resultados mostraron que el sitio de infección preferencial del astrovirus PoAstV/PUJP5 está ubicado en yeyuno, íleon y colon; aunque también se encontró su presencia incipiente en ganglio mesentérico de los cerdos inoculados, indicando que el organotropismo de este virus es el sistema entérico.

**Palabras Clave:** Astrovirus porcino, patogénesis, PoAstV/PUJP5.

## **Abstract**

Astroviruses are enteropathogenic viral agents that infect mammals and birds. This virus produces diarrhea and in some cases other symptoms associated such as fever, vomiting, abdominal pain and headache can be found. Moreover, their presence has been reported mainly in enterocytes of the small intestine, however, more recent studies have determined extraintestinal infections in humans, minks, cattle and recently in pigs. The production of viremia it has been reported in pigs and humans.

Based on the lack of a reproducible animal model to study the pathogenesis of astrovirus, in this work we used the conventional pig as a possible experimental model in order to determine the early astroviral tropism and some symptoms associated with infection. Thus, astrovirus PUJP5 strain was used to infect weaning pigs for five day and then their presence was evaluated in feces, sera and intestinal and extra-intestinal tissues samples. In addition, data from body weight, rectal temperature and other behavioral observations were collected.

The results showed that the preferential site of PoAstV / PUJP5 infection is located in jejunum, ileum and colon; although it was also determined its incipient presence in the mesenteric ganglion.

**Key words:** Porcine astrovirus, patogenesis, PoAstV/PUJP5.

# Contenido

Contenido	
Resumen .....	5
Abstract .....	6
Contenido .....	7
Lista de figuras .....	9
Lista de tablas .....	12
Lista de símbolos y abreviaturas.....	13
<b>1. Introducción .....</b>	<b>15</b>
Justificación.....	16
Problema científico .....	17
<b>2. Marco Teórico .....</b>	<b>20</b>
2.1. Generalidades de los Astrovirus.....	20
2.1.1. Aspectos históricos .....	20
2.1.2. Aspectos morfológicos y estructurales de astrovirus. ....	21
El ORF2.....	23
2.1.3. Taxonomía y clasificación .....	27
2.2. Ciclo replicativo.....	29
2.3. Gastroenteritis aguda asociada a astrovirus .....	32
2.3.1. Gastroenteritis.....	32
2.3.2. Transmisión de Astrovirus .....	33
2.3.3. Sintomatología producida tras la infección por Astrovirus.....	34
2.3.4. Epidemiología de Astrovirus.....	34
2.3.5. Patogénesis de Astrovirus.....	36
2.4. Enfermedades atípicas de los astrovirus.....	42
2.5. Astrovirus Porcino (PoAstV).....	44
2.5.1 PoAstV/PUJP5.....	45
2.6. Cerdo como modelo experimental.....	46
<b>3. Objetivos.....</b>	<b>48</b>
3.1. Objetivo General .....	48
3.2. Objetivos Específicos.....	48
<b>4. Metodología.....</b>	<b>49</b>
4.1. Fase 1: Infección experimental de lechones y toma de muestras.....	49
4.1.1. Animales .....	49
4.1.2. Virus y células.....	50
4.1.3. Inoculación de la cepa viral PoAstV/PUJP5.....	51
4.1.4. Evaluación de signos clínicos y obtención de muestras.....	51

4.2.	Fase 2 y Fase 3: Estudios histopatológicos y detección viral .....	52
4.3.	Confirmación del enterotropismo viral de cepa PoAstV/PUJP5.....	53
4.3.1.	Estudio histopatológico a nivel intestinal .....	53
4.3.2.	Detección del antígeno viral de PoAstV/PUJP5 en tejidos intestinales.....	53
4.3.3.	Detección de genoma viral a partir de muestras de materia fecal .....	54
4.4.	Determinación de PoAstV/PUJP5 en órganos extra intestinales .....	57
4.4.1.	Estudio histopatológico a nivel extra-intestinal .....	57
4.4.2.	Detección del antígeno viral de PoAstV/PUJP5 en tejidos extra-intestinales...	57
4.5.	Determinación de la viremia o RNAemia generada por PoAstV/PUJP5 en los lechones infectados.....	58
4.5.1.	Detección del antígeno viral de PoAstV/PUJP5 en suero.....	58
4.5.2.	Determinación de un fragmento del ORF2 de PoAstV/PUJP5 a partir del RNA extraído del suero de lechones.....	59
4.5.3.	Secuenciación y análisis bioinformáticos .....	59
4.6.	Consideraciones bioéticas .....	59
<b>5.</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>60</b>
5.1.	Confirmación del enterotropismo de PoAstV/PUJP5 en lechones infectados experimentalmente.....	60
5.1.1.	Hallazgos obtenidos a nivel intestinal: confirmación del enterotropismo de PUJP5. ....	60
5.1.2.	Detección de genoma viral a partir de muestras de materia fecal .....	65
5.1.3.	Análisis bioinformáticos.....	65
5.2.	Determinación de PoAstV/PUJP5 en órganos extra intestinales.....	73
5.3.	Determinación de la viremia o RNAemia generada por PoAstV/PUJP5 en los lechones infectados.....	74
5.3.1.	Detección del antígeno viral de PoAstV/PUJP5 en suero.....	74
5.3.2.	Determinación de un fragmento del ORF2 de PoAstV/PUJP5 a partir del RNA extraído del suero de lechones.....	75
5.4.	Resultados adicionales.....	79
5.4.1.	Análisis de comportamientos asociados a la infección por astrovirus y de pesos y temperaturas corporales de los lechones.....	79
<b>6.</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>82</b>
<b>7.</b>	<b>Conclusiones y perspectivas.....</b>	<b>90</b>
<b>8.</b>	<b>Bibliografía.....</b>	<b>92</b>
<b>9.</b>	<b>Anexos.....</b>	<b>110</b>



# Lista de figuras

FIG. 1. ORGANIZACIÓN GENÓMICA DEL ASTROVIRUS HUMANO, ESTE GENOMA TIENE UNA LONGITUD APROXIMADA DE 6.8 KB, CONTIENE TRES RECONOCIDOS MARCOS ABIERTOS DE LECTURA DENOMINADOS ORF 1A, 1B Y 2, ORF-X (TOMADO DE: KING ET AL., (2011). NINTH REPORT OF THE ICTV.....	22
FIG. 2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE LA PARTÍCULA VIRAL VISUALIZADA A PARTIR DE CULTIVO CELULAR. TOMADO DE: (79) .....	24
FIG. 3. CRIOELECTROMICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE ASTROVIRUS. A) PARTÍCULAS VIRALES AISLADAS DE MATERIA FECAL. B) RECONSTRUCCIÓN TRIDIMENSIONAL DEL HASTV-1. TOMADO DE: (75). .....	25
FIG. 4. RECONSTRUCCIÓN TRIDIMENSIONAL DESDE IMÁGENES DE CRIOELECTROMICROSCOPIA DE LAS PARTÍCULAS DE ASTROVIRUS (IZQ.) Y PARTÍCULAS MADURAS (DERECHA), DESPUÉS DEL PROCESAMIENTO PROTEOLÍTICO CON TRIPSINA. TOMADO DE: (44).....	25
FIG. 5. ESQUEMA DEL CICLO REPLICATIVO DE ASTROVIRUS. TOMADO DE (1) .....	32
FIG. 6. POSIBLES VÍAS DE TRANSMISIÓN AMBIENTAL DE ASTROVIRUS HUMANOS. TOMADO DE: (1).....	34
FIG. 7. INFECCIÓN POR ASTROVIRUS EN CORDEROS GNTOBIOTICOS. (A). MICROFOTOGRAFÍA ELECTRÓNICA DE YEYUNO INFECTADO 23 H.P.I. (B). 38 H.P.I. (C). 38 H.P.I. (D). CONTROL 120 H.P.I.....	37
FIG. 8. MICROFOTOGRAFÍA DE UNA BIOPSIA DE YEYUNO DE UN PACIENTE CON TRANSPLANTE DE MÉDULA ÓSEA QUE PRESENTO INFECCIÓN POR ASTROVIRUS. (A). HISTOPATOLOGÍA H-E YEYUNO, (B Y C). INMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECCIÓN ANTÍGENOS HASTV, (D). MICROFOTOGRAFÍA ELECTRÓNICA DE UN ENTEROCITO YEYUNAL MUESTRA MATRICES VIRALES CITOPASMÁTICAS. TOMADO DE: (168) .....	38
FIG. 9. CÉLULAS EPITELIALES DEL DOMO DE LAS VELLOSIDADES DEL ILEÓN, 50 CM ANTES DE LA UNIÓN ILEAL-CECAL, DE UNA VACA. (A). LOS AGREGADOS DE ASTROVIRUS SE INDICAN CON CABEZAS DE FLECHAS Y INCLUSIONES DE BREA VIRUS SE INDICAN MEDIANTE FLECHAS COMPLETAS. (B) AGREGADO DE PARTÍCULAS ASTROVIRALES Y SU RESPECTIVA MAGNIFICACIÓN. TOMADO DE: (112) ..	39
FIG. 10. INFECCIÓN DE PAVOS CON TASTV-2. (A). HIBRIDACIÓN IN SITU PARA DETECTAR TASTV-2. (B). PAVO INFECTADO CON TASTV-2 (C). PAVO CONTROL TOMADO DE: (18).....	41
FIG. 11. INFECCIÓN POR TASTV-2 NO ESTÁ ASOCIADA CON CAMBIOS CITOPÁTICOS EN LOS INTESTINOS DE PAVOS INFECTADOS. SECCIONES DUODENALES OBTENIDAS DE: CONTROL (A) O INFECTADAS POR TASTV-2 (B), TOMADAS DE PAVOS JÓVENES CON 3 DÍAS POST INFECCIÓN Y TEÑIDAS POR HEMOTOXILINA Y EOSINA AUMENTO: 40X TOMADO DE: (18) .....	41
FIG. 12. TASTV-2 PRESENTE EN TEJIDOS EXTRAINTESTINALES. MICROFOTOGRAFÍAS DE TINCIÓN INMUNOFUORESCENTE ESPECIFICA CONTRA EL ANTÍGENO DE PROTEÍNAS DE CÁPSIDE DE ASTV . (A). TIMO, (B). BURSA, (C). INTESTINOS. TOMADO DE (18).....	42
FIG. 13. HISTOPATOLOGÍA E INMUNOHISTOQUIMICA DONDE SE DETECTA EL ANTIGENO DE CÁPSIDE DE POASTV/PUJP5 EN EL INTESTINO DE LECHONES EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS. (A). TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA AUMENTO 40X Y (C) INMUNOHISTOQUIMICA CON UN AUMENTO 200X REPRESENTAN LOS CONTROLES (LNI). LAS FOTOGRAFÍAS (B) YEYUNO CON TINCIÓN DE HEMATOXILINA-EOSINA EN UN AUMENTO DE 200X Y (D) INMUNOHISTOQUÍMICA DE YEYUNO CON UN AUMENTO DE 200X REPRESENTAN TEJIDOS DE LECHONES INFECTADOS (LI), B MUESTRA YEYUNITIS NECROTIZANTE CON DETERIORO EN LOS ENTEROCITOS DE LA CÚPULA DE LA VELLOSIDAD Y UNA LIGERA INFLAMACIÓN Y D MUESTRA UNA INMUNOTINCIÓN POSITIVA EN CONTRA DE POASTV/PUJP5 EN LOS CITOPASMAS DE ENTEROCITOS. ....	64
FIG. 14. AMPLIFICACION DE LA RT-PCR DE 417 PB DEL ORF2 DE POASTV/PUJP5 DE LAS MUESTRAS DE HECES RECOLECTADAS DIARIAMENTE EN LOS CORRALES DE LOS LECHONES (LI) Y	

(LNI), LAS FLECHAS ROJAS INDICAN EL CONTROL POSITIVO AMPLIFICADO POR DUPLICADO (PoAstV/PUJP5 PURIFICADO CON CsCl – POS 1 – 2) Y LAS MUESTRAS DE HECES RECOLECTADAS EN EL CORRAL DE LOS LECHONES INFECTADOS LOS DÍAS 3, 4 Y 5 POST INFECCIÓN, CON UN FRAGMENTO A LA MISMA ALTURA DEL CONTROL EN EL DÍA 4. NO SE OBSERVARON AMPLIFICACIONES EN LAS MUESTRAS DE LOS LECHONES NO INFECTADOS.....	65
FIG. 15. ALINEAMIENTO BINARIO (CLC SEQUENCE VIEWER 7) ENTRE LA SECUENCIA REPORTADA DE PoAstV/PUJP5 (ULLOA ET AL., 2010) (ACC. NUM. FJ160483) Y LA SECUENCIA OBTENIDA A PARTIR DE LAS HECES DE LECHONES INFECTADOS EN EL DÍA 4 (PI/4DPI/7). SE OBTUVO UN PORCENTAJE DE IDENTIDAD DEL 95%.....	66
FIG. 16. ALINEAMIENTO BINARIO RELIZADO CON EL PROGRAMA MEGA 6.0 SOFTWARE, ENTRE LA SECUENCIA REPORTADA EN EL GENE BANK DE PoAstV/PUJP5 Y PI/4DPI/7. ....	67
FIG. 17. A) BLASTN REALIZADO PARA LA SECUENCIA CORRESPONDIENTE AL DÍA 4 (PI/4DPI/7). B) ALINEAMIENTOS SIGNIFICATIVOS DE LA SECUENCIA QUE CORRESPONDE AL 4 DÍA POST INOCULACIÓN. ....	68
FIG. 18. TRADUCCION IN SILICO DE SECUENCIAS ANALIZADAS CON EL PROGRAMA MEGA 6.0. FRANJA SUPERIOR REGIÓN DEL A.A.1 AL 81. FRANJA INFERIOR REGION A.A. 82-132. SE OBSERVA COMPARACION DE LA SECUENCIA DE REFERENCIA (PoAstV/PUJP5) CON SECUENCIA OBTENIDA A PARTIR DE HECES DE LECHONES INFECTADOS EN EL DIA 4 (PI/4DPI/7) POST INOCULACIÓN.....	69
FIG. 19. ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> DE MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES (SUMOILACION). (A). SECUENCIA REPORTADA DE PoAstV/PUJP5. Y (B). SECUENCIA OBTENIDA DE LAS HECES DE LOS LECHONES CORRESPONDIENTES AL DIA 4 POST INOCULACIÓN (PI/4DPI/7).....	71
FIG. 20. ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> DE MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE POSIBLES SITIOS DE C-MANOSILACIONES. (A). SECUENCIA REPORTADA DE PoAstV/PUJP5. Y (B). SECUENCIA OBTENIDA DE LAS HECES DE LOS LECHONES CORRESPONDIENTES AL DIA 4 POST INOCULACIÓN (PI/4DPI/7).....	72
FIG. 21. ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> DE MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE POSIBLES SITIOS DE N-GLICOSILACIONES. (A). SECUENCIA REPORTADA DE PoAstV/PUJP5. Y (B). SECUENCIA OBTENIDA DE LAS HECES DE LOS LECHONES CORRESPONDIENTES AL DIA 4 POST INOCULACIÓN (PI/4DPI/7).....	72
FIG. 22. ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> DE MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE POSIBLES SITIOS DE O-GLICOSILACIONES. (A). SECUENCIA REPORTADA DE PoAstV/PUJP5. Y (B). SECUENCIA OBTENIDA DE LAS HECES DE LOS LECHONES CORRESPONDIENTES AL DIA 4 POST INOCULACIÓN (PI/4DPI/7).....	73
FIG. 23. RESULTADOS DE LA RT-PCR PARA VERIFICAR LA PRESENCIA DEL GENOMA DE PoAstV/PUJP5 EN SUEROS DE LECHONES INOCULADOS (LI) EN EL DÍA DE LA INOCULACIÓN Y 24 HPI.....	76
FIG. 24. RESULTADOS DE LA RT-PCR PARA VERIFICAR LA PRESENCIA DEL GENOMA DE PoAstV/PUJP5 EN SUEROS DE LECHONES INOCULADOS (LI) EN EL SEGUNDO Y TERCER DÍA DEL ENSAYO. ....	76
FIG. 25. RESULTADOS DE LA RT-PCR PARA VERIFICAR LA PRESENCIA DEL GENOMA DE PoAstV/PUJP5 EN SUEROS DE LECHONES INOCULADOS (LI) EN EL CUARTO Y QUINTO DÍA DEL ENSAYO POST-INFECCIÓN.....	77
FIG. 26. RESULTADOS DE LA RT-PCR PARA VERIFICAR LA PRESENCIA DEL GENOMA DE PoAstV/PUJP5 EN SUEROS DE LECHONES NO INOCULADOS (LNI) EN EL DÍA DE LA INOCULACIÓN, 24 HPI Y 48 HPI.....	77
FIG. 27. RESULTADOS DE LA RT-PCR PARA VERIFICAR LA PRESENCIA DEL GENOMA DE PoAstV/PUJP5 EN SUEROS DE LECHONES NO INOCULADOS (LNI) EN EL SEGUNDO, TERCERO Y CUARTO DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN. ....	78

FIG. 28. RESULTADOS DE LA RT-PCR PARA VERIFICAR LA PRESENCIA DEL GENOMA DE POASTV/PUJP5 EN SUEROS DE LECHONES NO INOCULADOS (NIPLNI) EN EL QUINTO DÍA DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN.....	78
FIG. 29. GRAFICAS CORRESPONDIENTES A LOS PESOS CORPORALES DE LECHONES NO INOCULADOS E INOCULADOS DURANTE LOS 5 DÍAS DEL EXPERIMENTO (A-B), Y TEMPERATURAS CORPORALES DE LOS MISMOS DURANTE LOS DÍAS DE DURACIÓN DEL ESTUDIO (C-D).....	80

# Lista de tablas

TABLA 1. CARACTERISTICAS PRINCIPALES DE LOS ASTROVIRUS. ....	26
TABLA 2. ESPECIES DE ASTROVIRUS REPORTADAS SEGÚN EL HOSPEDERO. ....	28
TABLA 3. LISTA DE PRIMERS O CEBADORES ESPECÍFICOS USADOS EN LA AMPLIFICACIÓN DEL SEGMENTO DE 417 PB DEL ORF-2 POR PCR CONVENCIONAL. ....	55
TABLA 4. HALLAZGOS HISTOPATOLÓGICOS EN EL INTESTINO DELGADO DE LECHONES EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS (LI) Y NO INFECTADO (LNI). FUERON EVALUADOS LOS TEJIDOS INTESTINALES DE TODOS LOS LECHONES NO INFECTADOS Y TRES MUESTRAS AL AZAR DE LOS LECHONES INFECTADOS. SE UTILIZÓ LA ESCALA DE PUNTAJE HISTOPATOLÓGICO PROPUESTA POR GIBSON-CORLEY 2013 PARA DAR VALORES A LOS RESULTADOS OBTENIDOS. ....	63
TABLA 5. PRESENCIA DEL ANTÍGENO VIRAL A PARTIR DE TEJIDOS INTESTINALES DE LECHONES INFECTADOS (LI) Y NO INFECTADOS (LNI). ....	64
TABLA 6. TRANSICIONES Y TRANSVERSIONES ENCONTRADAS EN LA SECUENCIA OBTENIDA (PI/4DPI/7) CORRESPONDIENTE A LAS HECE DE LOS LECHONES INFECTADOS EN EL CUARTO DÍA POST INFECCION CON REALCION A LA SECUENCIA REPORTADA DE PoAstV/PUJP5. ....	70
TABLA 7. RESUMEN DE LAS TRANSICIONES Y TRANSVERSIONES ENCONTRADAS EN LA SECUENCIA (PI/4DPI/7) CUARTO DÍA POST INFECCIÓN. ....	70
TABLA 8. RESULTADOS RESUMIDOS DE LA INMUNOHISTOQUIMICA LLEVADA A CABO PARA DETECTAR EL ANTÍGENO DE LA CÁPSIDE DE PoAstV/PUJP5 EN TEJIDOS EXTRAINTESTINALES (RIÑÓN, BAZO, TONSILA, HÍGADO, CEREBRO, CORAZÓN, PULMÓN Y GANGLIO MESENTÉRICO) DE LECHONES INFECTADOS (LI) (IP1-IP4) Y NO INFECTADOS (LNI) (NIP1-NIP4). EL ANTÍGENO CITOPLASMÁTICO VIRAL FUE OBSERVADO EN DOS DE LOS ANIMALES INFECTADOS EN GANGLIO MESENTERICO. NO SE ENCONTRÓ EL ANTIGENO DE PoAstV/PUJP5 EN NINGUNO DE LOS ANIMALES NO INFECTADOS. ....	74
TABLA 9. PESOS OBTENIDOS PARA LECHONES INFECTADOS Y NO INFECTADOS DURANTE 5 DÍAS DE OBSERVACIÓN. ....	79
TABLA 10. TEMPERATURAS OBTENIDAS DE LOS LECHONES INFECTADOS Y NO INFECTADOS DURANTE 5 DÍAS DE OBSERVACIÓN. ....	80

## Lista de símbolos y abreviaturas.

Abreviatura	Termino
°C	Grados Celsius
Aa	Aminoácido
AstV	Astrovirus
ATCC	American Tissue Culture Collection
ANV	Virus de la nefritis aviar (Avian nephritis virus)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CsCl	Cesium chloride (cloruro de cesio)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAc	ADN complementario
DMEM	Dulbeccos modified essential medium
dNTPs	Desoxiribonucleotide triphosphate (desoxirribonucleótido trifosfato)
DTT	Dithiothreitol
EIA	Análisis inmunoenzimático (Enzyme immunoassay)
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay (ensayo inmunoenzimático)
Fig.	Figura
HAstV	Human astrovirus (astrovirus humano)
HVR	Hipervariable region (región hipervariable)
ICTV	International Comitee for Taxonomy of Viruses
IEM	Inmunolectromicroscopía
IgG	Inmunoglobulina G
$\lambda$	longitud de onda
MAb	Monoclonal antibody (anticuerpo monoclonal)
ME	Microscopía Electrónica
MEM	Minimal essential medium (medio mínimo esencial)
M.O.I.	Multiplicity of infection (multiplicidad de infección)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NSP	Non structural protein (proteína no estructural)
Nt	Nucleótido
ORF	Open reading frame (marco de lectura abierta)
PBS	Phosphate buffered saline (tampón fosfato salino)

PCR	Polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
PoAstV	Astrovirus porcino
PoAstV/PUJP5	Cepa Astrovirus porcino PUJP5
RNasa	Ribonucleasa
RNA	Ácido ribonucleico
RT	Reverse-transcriptase (transcriptasa reversa)
RT-PCR	Retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa (Reversetranscription polymerase chain reaction)
SFB	Suero fetal bovino (bovine fetal serum)
Tween-20	Sorbitan monolaurato polioxietileno
μ	micro
UFF	Unidades formadoras de focos
VP	Viral protein (proteína vírica), normalmente estructural
VPg	Proteína vírica unida al genoma (Genome-linked viral protein)
v/v	unidad de concentración volumen/volumen

# 1. Introducción

Los Astovirus (AstVs) son virus que poseen forma de estrella han sido descritos en mamíferos y en aves, pertenecen a la familia *Astroviridae*, son virus sin cubierta con un RNA de cadena sencilla de sentido positivo con una longitud de 6.4 a 7.9 kb, su genoma contiene 3 marcos abiertos de lectura (ORF: Open Reading Frames) denominados ORF1A, ORF1B y ORF2 (1).

Este virus esta relacionado con gastroenteritis de origen viral en mamíferos (humanos, cerdos, ovejas, ciervos, visones, bovinos, entre otros) y también en aves (pollos, patos y pavos), actualmente astrovirus es el tercer agente causante de gastroenteritis viral después de rotavirus y norovirus (1–3); en humanos, se han descrito con prevalencia y relevancia en la población infantil, ancianos, adultos que se encuentran en guarniciones militares y en personas que tienen comprometido su sistema inmune. El principal síntoma que se produce en la infección con AstVs es la diarrea, y en algunos casos vómito, dolor abdominal, dolor de cabeza, fiebre y anorexia (4,5). Algunas evidencias han mostrado que los enterocitos del intestino delgado son los blancos de la infección de astrovirus, pero hallazgos recientes sugieren que no son el único, ya que se han encontrado también en macrófagos de la lámina propia, células gliales y otros tejidos extra intestinales tanto en humanos como en animales, además parece que en algunos individuos animales o humanos la infección es asintomática. Es importante destacar que hasta el momento no existe un modelo animal en el que se haya podido evaluar de manera concluyente la patogénesis de astrovirus en mamíferos, es por esta razón que se pretende en este estudio, dar una aproximación al modelo de patogénesis usando al cerdo convencional infectados experimentalmente.

## Justificación

La familia *Astroviridae* agrupa cepas que infectan tanto humanos como distintos animales. Desde su descubrimiento en 1975, la percepción de la relevancia de los astrovirus en la salud pública se ha incrementado con el descubrimiento de nuevas cepas aisladas de humanos que tienen similitud con cepas animales, algunas de estas asociadas a gastroenteritis virales y otras a enfermedades del sistema nervioso. Asimismo, se desconocen todos los efectos que causan los astrovirus sobre los hospederos susceptibles, aunque se han hecho acercamientos al conocimiento de estos en ovejas y en pavos, pero no se ha establecido un modelo *in vivo* de estudio.

Conocer las células susceptibles de infección astroviral y los efectos que produce a nivel sistémico, constituirá un notable avance que permitirá, en caso de ser necesario, definir el manejo adecuado de los infectados. Ante esta clara necesidad, proponer nuevos modelos animales de estudio para conocer la patogénesis de los astrovirus contribuye significativamente al cierre de esta brecha de conocimiento.

Por último, es necesario tener en cuenta que, para la realización de esta clase de trabajos, es necesario tener un conocimiento básico sobre la cepa viral a utilizar. La cepa PoAstV/PUJP5, fue aislada a partir de un lechón lactante y en sus análisis filogenéticos, se encontró que presentaba una estrecha relación filogenética con los astrovirus tipo 1 porcino y cierta cercanía con los astrovirus humanos clásicos asociados a diarrea (6), razón por la cual ésta representa un modelo de infección relevante que podría sugerir los comportamientos patogénicos astrovirales de las infecciones humanas.



## Problema científico

Aunque los astrovirus fueron descubiertos hace ya 40 años, en 1975 identificándose por primera vez como agentes infecciosos causantes de gastroenteritis viral (7,8) . En esa época se determinó que su prevalencia era baja, y que la sintomatología después de la infección era escasa ya que los individuos infectados con este virus no manifiestan síntomas comunes a esta clase de infecciones virales como por ejemplo las producidas por rotavirus (9–11). Aunque en la mayoría de los casos las infecciones con astrovirus son leves, en algunos la infección requiere de manejo intrahospitalario y en otros, se han encontrado de manera frecuente en infecciones nosocomiales (12,13).

Posteriormente la epidemiología molecular se encargó del diseño de novedosos y sensibles sistemas de diagnóstico con los que hoy en día se consideran al astrovirus como la tercera causa importante de gastroenteritis no bacteriana en la población infantil, adultos mayores y personas inmunocomprometidas, después de rotavirus y norovirus (14).

Se ha tratado de profundizar en el conocimiento de su patogénesis y epidemiología, pero hasta el momento no se ha establecido un modelo animal con el que se puedan describir los efectos que produce la infección por astrovirus. Los estudios reportados hasta el momento describen que este virus puede infectar corderos, terneros y pavos, en cada uno de estos sistemas de modelos, la replicación del virus se ha demostrado en el intestino delgado, aunque el patrón exacto de la infección y las manifestaciones clínicas de la misma difiere entre los animales (1).

Por ejemplo En corderos gnotobióticos, se les administró una cepa a partir de un brote de AstV ovino que les produjo diarrea moderada por infección de los enterocitos maduros en dos tercios de la región apical de las vellosidades y macrófagos sub epiteliales del intestino, seguido por una atrofia de las vellosidades e hipertrofia críptica. Los corderos desarrollaron la diarrea al segundo o cuarto día, expulsando virus desde el segundo día hasta el noveno después de la inoculación (15). En bovinos, la replicación del virus fue identificada entre los días 1 a 3 post infección y se localizó en la superficie de los enterocitos. Adicionalmente, se observaron lesiones en las que los enterocitos pasaron de planos a cuboides (16,17). En experimentos realizados con pavos infectados con astrovirus de pavo tipo 2 (TAstV2), se detectó el virus a las 24 horas postinfección en la zona apical de las vellosidades del

intestino delgado y se correlacionó con la producción de necrosis. Si bien la replicación estuvo limitada al intestino delgado, TAstV-2 fue aislado de la bursa, timo, hígado, riñón, músculo esquelético, páncreas y plasma (18).

Los mecanismos involucrados en la producción de diarrea asociada a los astrovirus, no han sido dilucidados. Experimentos *in vitro* han sugerido que para que se produzca la diarrea aguda no es únicamente necesario el desprendimiento de los enterocitos apicales, si no también son necesarios efectos celulares como la disrupción y reorganización de la ocludina y modulación de la permeabilidad epitelial (19–22).

Por otro lado los astrovirus que infectan cerdos, se han estudiado de manera escasa. Se conocen aspectos básicos de su estructura, arquitectura genómica, taxonomía, y han sido igualmente asociados con la producción de diarrea en cerdos jóvenes y recientemente fueron asociados con la producción de temblores congénitos en lechones recién nacidos (23,24). En el año 2011, la cepa de cerdo PUJP5 (PoAstV/PUJP5) (6) fue aislada de una muestra de diarrea de un lechón menor de 20 días de nacido y luego se adaptó a cultivo celular en células embrionarias de riñón de cerdo (ESK-4) (ATCC-CL184). Las características de cultivo de PoAstV/PUJP5 demostraron que es un virus citopático y que tiene una eficiencia replicativa (6,25).

Asimismo el cerdo doméstico (*Sus scrofa domesticus*) ha demostrado su utilidad como modelo de infección para estudiar la patogénesis de enfermedades bacterianas (*Cryptosporidium parvum*, *Helicobacter pylori*) y virales (*Rotavirus* y *Norovirus*). Sin embargo muchos de los estudios han utilizado animales gnotobioticos (26–30), pero otros han sido desarrollados en porcinos utilizando cerdos convencionales criados con buenas prácticas agrícolas que permiten un óptimo estado sanitario de los animales generando resultados reproducibles (31–34).

Teniendo en cuenta el desconocimiento existente frente a la patogénesis de los astrovirus, en el que no se conoce la patogénesis que produce la infección, los síntomas asociados y los cambios que presenta el epitelio intestinal; este trabajo pretendió realizar un acercamiento a la utilidad de un modelo animal, a través de la identificación de algunos efectos tempranos patogénicos como el organotropismo intestinal y extra-intestinal y otras valoraciones adicionales (temperatura y peso corporal, aparición de comportamientos y

síntomas) asociados a la posible enfermedad producida por la infección experimental de lechones convencionales destetos con la cepa PoAstV/PUJP5.

### **Pregunta de investigación:**

¿Es posible conocer eventos patogénicos tempranos asociados a la infección experimental con astrovirus usando al cerdo doméstico convencional como modelo?.

## 2. Marco Teórico

### 2.1. Generalidades de los Astrovirus

Los astrovirus (AstV), pertenecen a la familia *Astroviridae*, la cual agrupa tanto virus humanos como animales, incluyendo mamíferos y aves. Son virus con apariencia de estrella de simetría icosaédrica con un RNA monocatenario de polaridad positiva (+) ssRNA, una longitud de 6.4 a 7.9 kb, organizado en 3 marcos abiertos de lectura ORFs, (Open Reading Frames) ORF1a, ORF1b, ORF2 y un marco solapado entre ORF1b y 2 denominado ORFX. (3,35–38).

#### 2.1.1. Aspectos históricos

Appleton y Higgins identificaron en 1975, por primera vez a astrovirus (AstV) como el agente infeccioso que causó un brote de diarrea y vómitos en una sala de maternidad en el sur de Inglaterra (8). Al analizar las muestras de materia fecal por medio de microscopía electrónica reportaron la existencia de unas partículas víricas diferentes morfológicamente de rotavirus y calicivirus, virus que también son enteropatógenos asociados a enfermedad diarreica aguda. (3,8). En este mismo año, Madeley y Cosgrove en Glasgow dieron a conocer el término astrovirus (del griego “astron”) tras visualizar, por medio de microscopía electrónica con tinción negativa, unos virus icosaédricos de pequeño tamaño y con apariencia de estrella en muestras diarreicas de niños hospitalizados y recién nacidos con gastroenteritis (3,7).

Lee y Kurtz lograron aislar, adaptar y propagar con éxito en el año 1981 una cepa de astrovirus humano (HAstV) en un cultivo de células HEK (células embrionarias de riñón de humano) y posteriormente, se pudieron identificar cinco serotipos diferentes de astrovirus humanos (HAstV) en 1984 (3,35,39). Diez años después se identificaron dos nuevos serotipos de astrovirus en el Reino Unido (40). Estos descubrimientos dieron paso a estandarizar un sistema de diagnóstico por inmunoensayo (EIA) de anticuerpos monoclonales (MAb) que facilitarían su detección (3,41,42), demostrando su causalidad para las gastroenteritis como el segundo agente causal (43–46).

Los avances técnicos en biología molecular permitieron el clonaje y la secuenciación completa del genoma de astrovirus humano tipo 1 (HAstV-1) (47), y la construcción del primer clon de DNA complementario (cDNA) del genoma completo de HAstV-1 (48); de igual forma, se desarrollaron varias técnicas de detección de este virus como la reacción de retrotranscripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), la cual ha tenido una gran influencia, ya que esta técnica se ha consolidado como un ensayo "gold estándar" para la detección del genoma viral (44,48–52). Desde el año 2008 la investigación en astrovirus se ha intensificado, debido al uso de herramientas de metagenómica, análisis *in silico* y variadas herramientas bioinformáticas en estudios de vigilancia y control a gran escala en humanos. (53–55). Recientemente, la presencia de AstV fue reportada en el cerebro de visones (54), además en un niño con agamaglobulinemia ligada al cromosoma X que murió con encefalitis indeterminada (53), asociada a meningitis (56) y 4 reportes en los que se encontró astrovirus en ganado ovino con encefalitis y ganglioneuritis (57–60) sugiriendo que no solamente pueden producir la enfermedad gastrointestinal sino también desordenes neurológicos.

### **2.1.2. Aspectos morfológicos y estructurales de astrovirus.**

#### **Genoma viral**

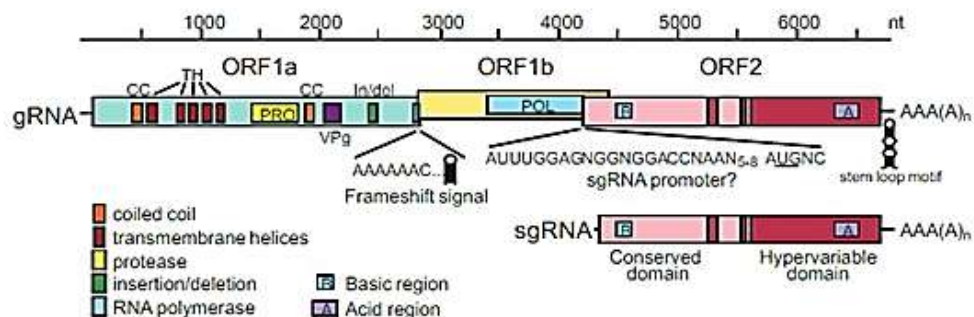
Teniendo presente que este es un virus de RNA de cadena sencilla, comparte ciertas propiedades con otros virus que tienen esta misma característica. Sin embargo, por particularidades encontradas para el astrovirus, no fue posible incluirlo dentro de las otras dos familias de virus con RNA monocatenarios de polaridad positiva establecidas en 1991 (*Picornaviridae* y *Caliciviridae*) pese a sus semejanzas, esto se determinó por medio del análisis de las proteínas y RNAs sintetizados durante la infección de cultivos celulares con el virus (44,61).

A comienzos de la década del 90 se identificó que astrovirus tiene un RNA subgenómico, una señal de cambio de lectura ribosomal (ribosomal frameshifting RFS) y un motivo de RNA polimerasa dependiente de RNA, así como la falta de un dominio helicasa (47,62,63). Todos estos datos, junto con la disponibilidad de la secuencia completa del genoma (47), establecieron una organización genómica propia para estos virus; identificando

principalmente 3 marcos abiertos de lectura, los cuales codifican tanto para proteínas estructurales como no estructurales (44).

Como particularidad del astrovirus, en el extremo 5' de su genoma, se encuentra el ORF 1a y 1b, los cuales codifican para las proteínas no estructurales, siendo estas la proteasa y la RNA polimerasa dependiente de RNA, respectivamente. Hacia la mitad del genoma hasta el extremo 3' del mismo, se encuentra el ORF2, que codifica el precursor proteico de la cápside y es común tanto para el RNA genómico como para el RNA subgenómico (47,51,64–66). Las proteínas codificadas por el ORF2 corresponden a las proteínas estructurales del virus que se traducen inicialmente como una poliproteína la cual es procesada por proteasas. La expresión de estas proteínas es mediada por la utilización de un RNA sub-genómico para la síntesis de grandes cantidades de proteínas estructurales; a diferencia de otros virus RNA de polaridad positiva, astrovirus no presenta un dominio helicasa, siendo esta una señal de inicio de la traducción, pero si consta de una poliadenilacion en el extremo 3' que actua como señal reguladora para el fin de su traducción. La longitud aproximada de todo el genoma viral se encuentra entre 6 kb y 7.9 kb (1,47,62,67).

Ha sido descrito un nuevo ORF (ORF-X) de entre 91-122 codones dentro del ORF2, que tiene el codón de inicio a la altura de 41-50 nucleótidos corriente abajo del codón de inicio del ORF-2 y una patrón de lectura +1, aunque se desconoce si la proteína putativa que codifica este segmento se sintetiza en células infectadas, se ha propuesto que la traducción de este segmento podría darse a través de un mecanismo de “fugas de barrido” o *leaky scanning* (44,68) (Ver Fig. 1.)



**Fig. 1.** Organización genómica del astrovirus humano, este genoma tiene una longitud aproximada de 6.8 kb, contiene tres reconocidos marcos abiertos de lectura denominados ORF 1a, 1b y 2, ORF-X (Tomado de: King et al., (2011). Ninth report of the ICTV.

## **ORF1a y ORF1b**

La longitud del fragmento correspondiente al ORF1a del genoma de astrovirus es variable, debido a que en este ORF se encuentra una región de inserción y deleción localizada al extremo 3' del mismo; por el contrario el ORF1b es un segmento con una longitud estable de 1600 nucleótidos (38,64).

La proteína codificada por el ORF1a (NSP1a) es un polipéptido de 920-935 a.a. En los análisis de esta secuencia se reveló que tiene cinco a seis motivos transmembranales; por su parte, el ORF1b codifica para una RNA polimerasa dependiente de RNA con un tamaño de 515-528 a.a. (69,70).

Entre el ORF1a y el 1b de los MAstV (Mamastrovirus) existe un solapamiento que varía entre 10 y 148 nucleótidos y donde se localiza la señal para sintetizar la poliproteína NSP1ab a través de un mecanismo de RFS (44,47,71). Esta señal consta de dos estructuras fundamentales: una secuencia heptamérica (AAAAAAC), en la que el ribosoma se desliza para retroceder una posición y modifica la pauta de lectura, y una secuencia rica en GC constituida por una repetición invertida de 7 nucleótidos (GGGCCCCAGAAGACCAAGGGGCC), que genera una estructura en forma de bucle (44,47).

## **ORF2**

El ORF2 es la secuencia más variable del genoma de astrovirus porque allí se codifican los polipéptidos estructurales. Su tamaño se modifica dependiendo de la cepa viral y el hospedero, partiendo de la secuencia de nucleótidos asociados a esta región, la cual puede tener tamaños distintos por inserciones o deleciones lo que puede cambiar la proteína final, dando como resultado, la presencia de diferentes serotipos virales (70,72). Hasta el momento, se tiene como referencia los estudios de HAstV donde se reporta una proteína aproximada de 782-796 aminoácidos (1,70).

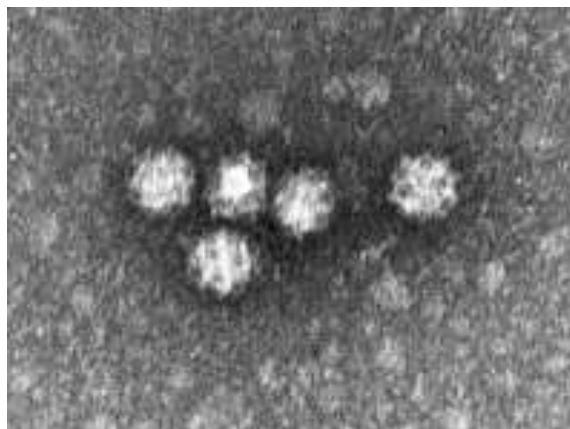
Ahora bien, se ha demostrado un alto grado de conservación hasta el aminoácido 415 del extremo N-terminal de las poliproteínas de la capsida de cepas de astrovirus humanos de

diferentes serotipos que se traducen del ORF2 (70,72,73). A partir de este residuo, se han encontrado dos pequeñas regiones hipervariables en las que se puede presentar el reconocimiento del RNA viral durante el ensamblaje de la partícula (74).

Por último, la región hipervariable carboxi-terminal (corriente abajo del residuo 415) forma las puntas del virión y participa en las interacciones tempranas del virus con su receptor en la célula hospedera, mientras que la región conservada amino-terminal de la proteína de la cápside contribuye al ensamblaje de la capa interna de la misma (70,75).

### **Morfología y arquitectura genómica**

Con relación a la morfología de las partículas virales se tiene claro que son virus pequeños de un tamaño aproximado de 28 a 30 nm, sin cubierta, con simetría icosaédrica (3,44,69). Su nombre es otorgado debido a que al visualizarlo por microscopía electrónica presenta una morfología similar al de una estrella de 5 ó 6 puntas (Ver Fig. 2) (3,69,76). Las partículas de astrovirus pueden aumentar su tamaño hasta 41 nm con un tratamiento a pH 10, en el que se evidencian espículas protuberantes y bien definidas en su superficie y aparece la típica morfología estrellada con agujeros triangulares, constatada por análisis detallados de ultraestructura de los astrovirus como lo planteado por Risco y colaboradores, en 1995 (76,77) (ver Fig. 2.).

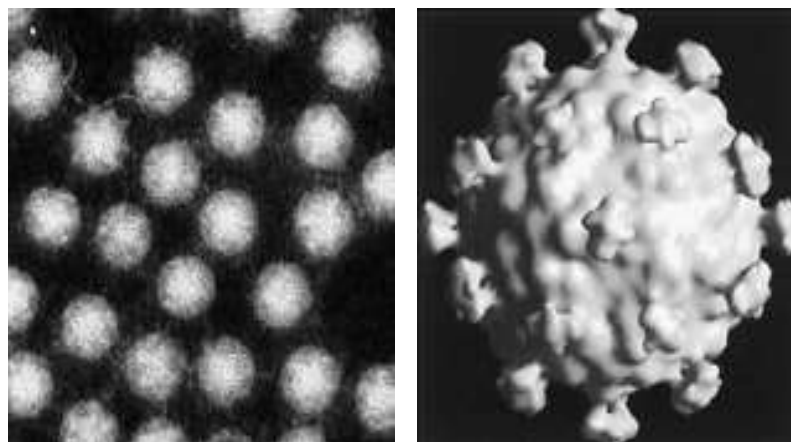


**Fig. 2.** Microscopía electrónica de la partícula viral visualizada a partir de cultivo celular. Tomado de: (79)

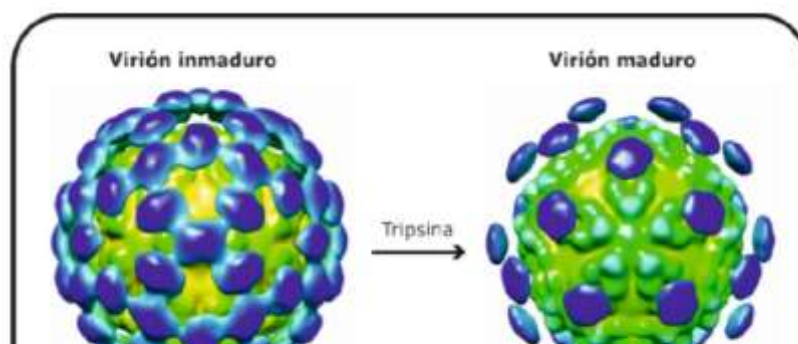
Por medio de estudios de crio-electromicroscopía realizados al astrovirus humano tipo 1 (HAstV-1), se pudo determinar su ultra estructura tridimensional donde se plantea que las



partículas de HAstV-1 tienen una cápside central de 330 Å ó 33 nm de diámetro con 30 espículas diméricas que se extienden 50 Å ó 5nm desde la superficie de la cápside obteniéndose un tamaño total de la partícula vírica de 43 nm (74,76,78). Esto mismo fue comprobado con otros estudios realizados a HAstV-2 donde evidenciaron que el virión posee dos capas proteicas, una externa formada por VP26 asociada con las espículas virales y una capa interna, que forma una superficie continua e integrada mayoritariamente por las proteínas VP32, lo que se puede observar en la figura 3 (77). También, por medio de estudios similares se ha podido determinar la diferencia entre viriones maduros e inmaduros, donde se observa que al someter viriones inmaduros al tratamiento con tripsina, se genera un cambio conformacional de 90 espículas diméricas a 30, siendo esta es la forma que se sugiere que puede tener contacto con los receptores celulares (ver Fig. 3 y 4.)



(79).



**Fig. 3.** Crio-electromicroscopía electrónica de astrovirus. **A)** Partículas Virales aisladas de materia fecal. **B)** Reconstrucción tridimensional del HAstV-1. Tomado de: (75).

**Fig. 4.** Reconstrucción tridimensional desde imágenes de crio-electromicroscopía de las partículas de astrovirus (izq.) y partículas maduras (derecha), después del procesamiento proteolítico con tripsina. Tomado de: (44).

Esto nos lleva a decir, que las proteínas de la cápside están conformadas por las proteínas VP32, VP29 y VP26 de aproximadamente 90 kDa (61,80).

Los extremos amino-terminales de las proteínas VP26 y VP29 se encuentran a la altura de los aminoácidos 361 y 394, respectivamente, de acuerdo a los resultados generados por secuenciación en la poliproteína de 90kDa (80,81). Las proteínas que forman las espículas de la cápside (VP29 y VP26) podrían ser importantes en la inmunidad heterotípica, la neutralización y la unión del virus a la célula donde tiene tropismo, de acuerdo con los estudios en los que se han usado anticuerpos monoclonales frente a astrovirus humano (80–82); en especial la VP26 tiene a cargo la variación antigénica entre los diferentes serotipos (65,80).

Los estudios diseñados con anticuerpos policlonales revelan que la proteína VP34 se encuentra en la región conservada de la poliproteína estructural y tiene epítomos conservados para todos los serotipos, en cambio, las proteínas VP25/26, y VP27/29, ubicados en la región variable, tienen epítomos específicos de serotipo y se encuentran en la superficie del virión, direccionando el tropismo específico celular de este (41,44,77,82).

A modo de resumen, las características principales de astrovirus se detallan en la Tabla 1.

Característica del virus	Descripción
Estructura del Virion	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Partículas icosaédricas de 28-43 nm de diámetro.</li> <li>• Sin envuelta lipídica. Genoma sin cubierta</li> <li>• Apariencia de estrella de 5 o 6 puntas al ser observado en el microscopio electrónico en aproximadamente el 10% de los viriones</li> </ul>
Genoma	<ul style="list-style-type: none"> <li>• RNA monocatenario de polaridad positiva de entre 6,4 ~ 7,7 kb y poliadenilado en el extremo 3´</li> <li>• Organización genómica en tres ORFs: ORF1a y ORF1b ubicado en el extremo 5´ codifica para proteínas no estructurales; proteasas y RdRp y ORF2 ubicado en el extremo 3´ codifica para proteínas estructurales, cápside.</li> <li>• Presencia de una señal de RFS entre ORF1a y ORF1b.</li> <li>• Falta de dominio de helicasa.</li> </ul>
Replicación	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Utilización de un RNA subgenómico de ~ 2.8 kb para la síntesis de las proteínas estructurales.</li> <li>• El RNA transfectado en células CaCo-2 y BHK-21 es capaz de generar partículas víricas infecciosas.</li> <li>• Replicación citoplasmática.</li> <li>• Necesidad de utilizar tripsina para su propagación en cultivo celular.</li> </ul>

**Tabla 1.** Características principales de los astrovirus.

### **2.1.3. Taxonomía y clasificación**

La clasificación de los astrovirus se ha generado a partir de varios criterios. En primera instancia el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) lo clasificó en 1995 dentro de una familia nueva (*Astroviridae*), con posterior subdivisión en los géneros Mamastrovirus (MAstV) y Avastrovirus (AAstV) (44,49,52). Adicional a esto, se les otorgó una clasificación por especies virales según el hospedero infectado, las especies reportadas para astrovirus se pueden encontrar en la tabla 2. (83).

Sin embargo, la taxonomía de los astrovirus se modificó desde el año 2008, debido a que se ha incrementado el descubrimiento de nuevos AstVs tanto en mamíferos como en aves. Los astrovirus son muy diversos genéticamente y con un grupo muy heterogéneo de especies hospedadoras, además, hay que sumar el hecho que una misma especie animal puede ser infectada por AstV distintos genéticamente, haciendo que estos no sean específicos para una especie; un ejemplo de esto es lo evidenciado con el AstV de gatos que puede infectar guepardos (84), o el caso del virus de la nefritis aviar (ANV) que infecta a pollos y pavos (44,85). Teniendo en cuenta estos antecedentes el grupo de estudios de los astrovirus estableció en 2010 un nuevo criterio de clasificación basado, no solamente en la especie hospedadora, sino también en las diferencias filogenéticas (44,76,83) (ver Tabla. 2.).

	Hospederos	Especie AstV	Referencias	
<b>MAMIFEROS</b>	Humanos	HAstV 8 Serotipos clásicos (Genotipos). HAstV1-8. MLB1- MLB2. HAstVVA1- VA4 HMO-A. y HAstV-PS	(35,49,53,86-90)	
	Ovejas	OAstV	(91), (92)	
	Vacas	BoAstV- BoAstVNeuroS1 BoAstV CH13 B18- B76-B170	(57-59,93)	
	Cerdos	**PoAstV 5 serotipos	(94), (24,95)	
	Perros	CaAstV	(96),	
	Gatos	**FAstV	(97)	
	Ciervos rojos		(98)	
	Ratones	MAstV	(99)	
	Murciélagos	**BatAstV	(100),(100,101)	
	Guepardos	**FAstV	(84)	
	Leones marinos	CsIAstV Genotipo. 1-2	(102), (102)	
	Ratas	RatAstV	(103),	
	Corzos	CcAstV	(104)	
	Visones	MinkAstV-SMSAstV	(54)	
	Conejos	RabAstV	(105)	
	León marino de California	CsIAstV-1, -2, -3	(102)	
	León marino de Steller	SsIAstV-1	(102)	
	Delfines	BdAstV-1	(102)	
	<b>AVES</b>	Pollos	CAstV - AVN	(85)
		Pavos	TAstV-1 y 2	(106)(107)
Patos		(DAstV-1 y 2)	(108)	
Gallinas de guinea			(109)	
Palomas		(Pi-ANV, WPIAstV, FPIAstV)	(110)	

**Tabla 2.** Especies de astrovirus reportadas según el hospedero.

Con los nuevos descubrimientos desde la biología molecular, han permitido ampliar la clasificación de los AstVs en especies genotipo, nombradas con números arábigos, según la especie hospedadora de origen y el análisis genético de la secuencia completa del ORF2. Así entonces, son reconocidos 10 genotipos para AAstV y 38 genotipos para MAstV,

incluyendo los 8 serotipos de HAstV clásicos (76,111). Los HAstV son reconocidos por anticuerpos policlonales específicos, entre ellos, se destaca (HAstV-1) porque es el serotipo que predomina en casos de gastroenteritis viral. En algunos países subdesarrollados se ha encontrado también la presencia de los serotipos 2, 3 y 4 (38,76,111).

Gracias a la secuenciación se logró hacer estudios de otro nivel como la metagenómica y se pudo descubrir cepas de astrovirus que poseen un tropismo alterno al sistema entérico, produciendo una bifurcación en la taxonomía de los astrovirus y generándose así el grupo de los astrovirus divergentes o atípicos (1,57,88) debido a su presencia en tejidos del sistema nervioso central (SNC) de bovinos, visones y humanos (23,53,54,57).

También se han estudiado muestras de heces de gran cantidad de mamíferos y aves en las que se ha encontrado el genoma viral de astrovirus y se han realizado ensayos de inoculación de astrovirus en corderos gnotobioticos, pavos y teneros gnotobioticos (15,37,112), obteniéndose resultados relevantes con relación a la presentación de la patogénesis, pero se consideran aún modelos no reproducibles, con excepción del modelo del pavo.

## **2.2. Ciclo replicativo**

La propagación de los astrovirus en cultivo celular ha caracterizado parcialmente, su ciclo replicativo (113). En el inicio de la infección, el astrovirus maduro con su proteína viral VP70 pasa por un proceso de escisión proteolítica, dada la interacción con tripsina pancreática en el duodeno permitiendo obtener VP25/26, VP27/29 y VP34, incrementando la infectividad y adherencia del virus en las células intestinales (3,61,86,114–118).

Posterior a su proceso proteolítico, el astrovirus entra en contacto con su hospedero y una vez ha llegado a su célula blanco, este se adhiere a su receptor con un tiempo promedio de 10 minutos. Un estudio realizado en células HEK-293 infectadas con HAstV-1 demostró la presencia de viriones en vesículas recubiertas, sugiriendo que el mecanismo de entrada del virus podría ser por endocitosis mediada por clatrina (119). Luego, se activa la ruta de señalización, mediada por las MAP quinasas y mensajeros secundarios como la ERK1 y 2 (1,120).

El mecanismo por el cual se libera el genoma de AstV de las vesículas en el citoplasma para su traducción es desconocido, sin embargo, en células CaCo-2 infectadas con HAstV-8 se ha observado que la liberación del genoma de astrovirus se presenta por acción de enzimas lisosomales sobre el endosoma y su posterior acidificación, liberándose el contenido genético viral en un proceso denominado descapsidación, el cual transcurre en un tiempo estimado de 130 minutos (1,3,79).

Cuando el genoma viral es liberado, se inicia el proceso de traducción temprana de las poliproteínas no estructurales NSP1a (~102 kDa) y NSP1ab (~160 kDa) a nivel citoplasmático (66,74,121–123). La proteína NSP1ab sufre un proceso proteolítico por la serina proteasa viral, que da origen a la RNA polimerasa viral (NSP1b) de 57 kDa. Por otra parte, la proteína NSP1a también se procesa originando varias proteínas maduras las que se proponen que pueden estar asociadas al complejo de replicación viral, hay que aclarar que si bien el mecanismo no está completamente descrito, es posible que proteasas celulares también se encuentren involucradas en esta parte del ciclo replicativo (1,74). El procesamiento proteolítico que tienen las poliproteínas no estructurales da origen a proteínas más pequeñas de las que se desconoce con certeza el número total de proteínas resultantes derivadas en este proceso (111).

Los procesos de traducción y replicación no se conocen al detalle, sin embargo, la información disponible acerca de otros virus (+) ssRNA hace suponer que en AstV la replicación del genoma se da de manera similar (44,124). Se asume, entonces, que después de la traducción del RNA genómico y el procesamiento de las proteínas no estructurales se forma un complejo de replicación viral que utiliza como molde el RNA genómico para la síntesis de RNA de cadena negativa (antigenómico), la cual será usada nuevamente como molde para obtener el RNA de polaridad positiva que hará parte de la progenie viral (1).

La replicación del genoma viral se ha planteado como una situación que se da en relación con membranas intracelulares, muy posiblemente, en asociación a la membrana del retículo endoplasmático (RE). Donde hay la formación de un complejo de replicación al interior del RE que va a permitir la producción de las proteínas estructurales a partir del RNA subgenómico para futura maduración de las nuevas partículas virales. En este complejo de

replicación, se sugiere que están involucradas varias proteínas no estructurales como la RNA polimerasa viral, las proteasas y la NSP1a/4 como también la participación del RNA viral mediado por interacciones de RNA - proteínas (44,69,125).

Los procesos de síntesis de las proteínas estructurales de la partícula viral inician con la traducción de la poliproteína estructural de 87-90 kDa codificada en el ORF2, el cual puede estar asociado con la presencia y participación de una proteína Vpg que actúa como una señal de inicio para la traducción puntual de esta región del genoma, y así, poder ser reconocida por los ribosomas asociados a RE (44,67,126,127).

Para el proceso de ensamblaje y maduración de las nuevas partículas virales se han abordado diferentes propuestas sobre cuál es el procesamiento proteolítico exacto que sufre la poliproteína estructural de 87-90 kDa. Algunos autores afirman que no hay un procesamiento intracelular de esta proteína (61,74,117); sin embargo, el argumento más aceptado en la actualidad es que la poliproteína de 87-90 kDa sufre un primer procesamiento proteolítico posiblemente mediado por las caspasas 1,4,5, las cuales tienen un rol de maduración de citoquinas en la célula; donde se sugiere que astrovirus aprovecha este mecanismo para clivar la VP87-90 con el fin de liberar viriones inmaduros con proteína VP70 listos para salir al espacio extracelular. Se propone que la salida del virus puede darse por una posible alteración proteolítica en las estructuras celulares, acción dada por el extremo C-Terminal de las caspasas 3, 6 y 7 que permiten la liberación de los viriones al medio extracelular y no por una vía clásica de lisis celular, como podría pasar en virus como rotavirus (1,86,114,128–131). A continuación se observa un digrama representativo del ciclo viral del astrovirus propuesto por Mendez y colaboradores, en el 2013. (ver Fig. 5).

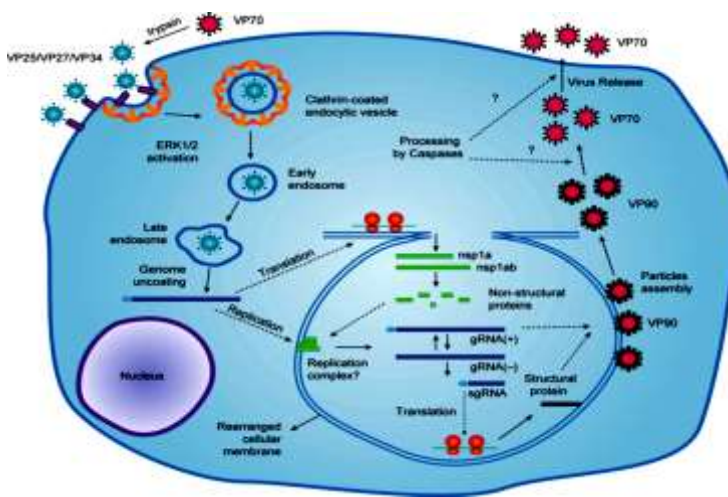


Fig. 5. Esquema del ciclo replicativo de Astrovirus. Tomado de (1)

## 2.3. Gastroenteritis aguda asociada a astrovirus

### 2.3.1. Gastroenteritis

La gastroenteritis aguda (GEA) es una de las enfermedades más comunes en el humano (132), la cual se considera de gran importancia, ya que causa altas tasas de morbilidad sobre todo en niños a nivel mundial. Anualmente se reportan más de 700 millones de casos de diarrea aguda en niños menores de 5 años que se relacionan con GEA (11,80).

La enfermedad puede ser de etiología infecciosa o no infecciosa, dentro de la etiología infecciosa se encuentran microorganismos como las bacterias, los protozoos y en mayor porcentaje los virus llevando a tasas más altas de prevalencia. La vigilancia molecular de la gastroenteritis viral ha revelado que los astrovirus (HAstV) son unos de los agentes virales más importantes que producen la diarrea aguda después de rotavirus y norovirus. (1).

La GEA está catalogada como la quinta causa de mortalidad infantil de niños menores de cinco años, esta enfermedad esta asociada con enfermedades de transmisión alimentaria, y ocasionan la muerte de 125.000 niños cada año según reportes de la organización mundial de la salud (14). La mayoría de casos se presentan en los países en vías de desarrollo (133–135).

El curso de la enfermedad puede darse con náuseas, vómito, diarrea (pérdida de agua y electrolitos y disminución en la consistencia de las heces), malestar, dolor abdominal, cefalea y fiebre. Se transmite fundamentalmente de forma oro-fecal, por contacto directo con personas infectadas con higiene deficiente, aguas o alimentos contaminados, aunque



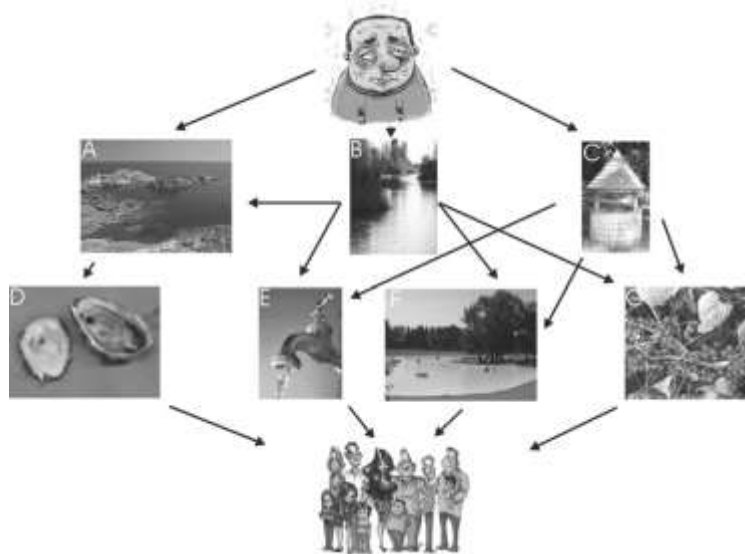
también se pueden transmitir por medio de la formación de aerosoles con las partículas virales como es el caso de adenovirus (4).

### **2.3.2. Transmisión de Astrovirus**

La transmisión de las cepas de astrovirus se presenta principalmente por la vía oro-fecal (Bosch, 2007; Myrmel, 2008). La excreción de virus infecciosos en las heces de individuos portadores puede llegar a contaminar las fuentes hídricas. Las partículas infecciosas de astrovirus humano se detectaron en el agua proveniente de un área que reportó un brote de gastroenteritis concurrente (70,136). También se ha encontrado en los alimentos, pues muchos de los brotes de gastroenteritis por astrovirus reportados en la literatura fueron adquiridos a través de alimentos contaminados (52,63,137), o lugares con grandes concentraciones de personas (centros de cuidado, hospitales, guarderías, escuelas y cuarteles militares) en las que astrovirus fue transmitido por el contacto con superficies contaminadas (70,138,139). Otra vía sugerida es la transmisión por cirugía abdominal (ileostomía y colostomía), o trasplantes entre otros (4).

Adicionalmente, astrovirus es estable en el medio ambiente por largos períodos de tiempo hasta que ingresa al tracto digestivo de otro individuo en el que genera una nueva infección (3,138), soporta pH ácidos, agua de mar, temperaturas extremas como los 60°C, condiciones que no afectan la capacidad de infección del virus (1).

Se han realizado estudios en humanos adultos voluntarios que han permitido caracterizar y concluir que las infecciones por astrovirus humano son de patogenicidad leve en esta población, estos individuos desarrollan una respuesta serológica frente al virus que hace que pocos desarrollen una sintomatología grave (3,40,87), debido a esto puede que muchos individuos infectados sean vectores inconscientes de transmisión del virus hacia los niños, quienes son la población más susceptible, desencadenando brotes epidémicos con sintomatología variable que ocasionalmente son graves. También se conoce que se encuentra ampliamente distribuido en el mundo y pueden llegar a co-infectar con otros virus (44,140) (ver Fig. 6.).



**Fig. 6.** Posibles vías de transmisión ambiental de astrovirus humanos. Tomado de: (1)

### ***2.3.3. Sintomatología producida tras la infección por Astrovirus***

La enfermedad producida por astrovirus puede durar de 1-4 días con un período de incubación de 24-36 horas y se piensa que puede estar involucrado entre un 2.5% a un 10% de los casos esporádicos de diarrea no bacteriana. Los niños menores de 5 años, ancianos y pacientes inmunocomprometidos se consideran las poblaciones más susceptibles de infección las cuales desarrollan una sintomatología particular de la gastroenteritis; por el contrario, la infección en adultos suele ser asintomática (22,141). Normalmente, los síntomas clínicos de la infección están presentes en el segundo y cuarto día, dando origen a una diarrea acuosa y a la visualización de los síntomas previamente mencionados (1,4,5,70,142).

La excreción de heces con astrovirus puede durar hasta 2 semanas, en pacientes inmunodeprimidos pueden aumentarse los síntomas al igual que el periodo de excreción de la cepa viral. Los casos producidos por el astrovirus humano serotipo 3 (HAstV-3) suelen ser más graves con sintomatología asociada a fiebre malestar general y en algunos casos vómito (1,4,5,76).

### ***2.3.4. Epidemiología de Astrovirus***

En el seguimiento de la enfermedad causada por astrovirus, se ha visto sobre todo en los humanos, debido al impacto que tiene este agente viral en la población infantil. En la mayoría de los animales la infección por el virus puede pasar desapercibida, lo que hace difícil un seguimiento epidemiológico para cada una de las especies.

Las infecciones por astrovirus se han determinado mundialmente (143), con mayores tasas de morbilidad en niños, aunque también se han evidenciado en adultos (43,144–147). Pese a que en la mayoría de los casos estas infecciones son leves, en algunos casos la infección requiere de manejo intrahospitalario y otros, se ha encontrado de manera frecuente en infecciones nosocomiales (12,13).

Si bien los cuadros sintomáticos producidos por astrovirus son leves, estos han sido responsables de numerosos brotes de gastroenteritis en colegios (44,46), guarniciones militares (115), hogares geriátricos (144), guarderías (148) e individuos inmunosuprimidos en los que la sintomatología incrementa su severidad (66,149–154); además, se ha verificado la diseminación del virus a otros tejidos diferentes al epitelio intestinal (53,142).

En estudios epidemiológicos se ha demostrado que la incidencia de gastroenteritis causada por astrovirus oscila entre el 2.5% y el 10% a nivel mundial, aunque se han documentado tasas más altas, hasta del 61% en función de la región estudiada. Por otra parte, la media anual está alrededor del 11% con incidencias entre el 23% y el 7% en zonas rurales y urbanas, respectivamente.

También existen diferencias dependiendo del grado de desarrollo de los países donde se ha encontrado el virus. Si bien su incidencia en los países desarrollados se considera importante y con altas tasas de prevalencia en estaciones invernales, al compararlo con países en vía de desarrollo se observa que la media anual es inferior en el primer grupo, donde en los países en vía de desarrollo puede alcanzar una prevalencia de hasta un 26% en temporadas de lluvias, llevando a un mayor número de casos de gastroenteritis aguda (111,132,155–161).

Las coinfecciones de astrovirus con algún otro patógeno, como rotavirus y norovirus o agentes bacterianos como *E. coli*, se han descrito con frecuencia (3,154,156,162).

También, aunque en menor medida, se han presentado casos con coinfección de distintos serotipos en el mismo paciente (51,163–166).

En Colombia, astrovirus se encontró en varios lugares como Bogotá D.C., con una prevalencia del 4.7%, Cartagena 2.9%, Facatativá 2.7% y Quibdó 1.3%, y la población afectada fueron los menores entre 2 y 7 años de edad. El estudio desarrollado por Gutiérrez y colaboradores, en el 2005 concluyó que estos virus poseen comportamientos endémicos y que las cepas colombianas no han sufrido cambios evolutivos que les permitan distanciarse de cepas de otros países (140); de igual forma, en un estudio desarrollado en el 2013 en el hospital San Rafael de Tunja, se detectó que la prevalencia de astrovirus humano en casos de gastroenteritis aguda fue de 3,61% (IC=95%), donde la mayor proporción se encontró en pacientes entre los 1 y 4 años de edad, lo que corroboró que la población afectada es concordante con lo publicado en estudios internacionales (167).

### **2.3.5. Patogénesis de Astrovirus**

A pesar de que los astrovirus constituyen una causa importante en la producción de gastroenteritis infecciosa de origen viral, aún hoy no se conocen a profundidad los mecanismos de su patogénesis. Lo poco que se sabe es gracias a los resultados de estudios *in vivo* de este virus evaluado en ovejas, pavos, terneros, y a partir de una evidencia en humanos proveniente de una biopsia de intestino de un paciente inmunosuprimido con gastroenteritis confirmada para AstV (15,18,93,168).

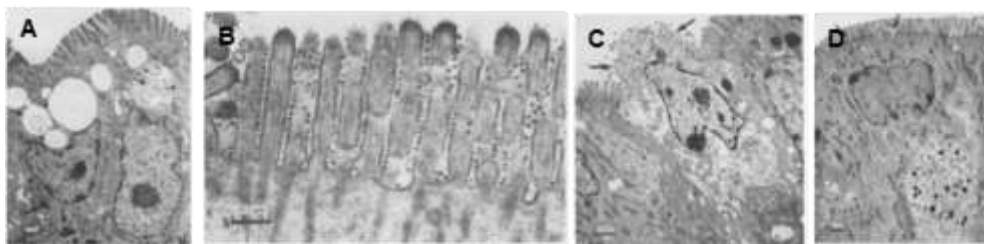
En términos generales, se menciona que tras la infección por astrovirus se ha visto un acortamiento leve de las vellosidades, con una localización de las partículas virales aproximadamente en la parte apical del epitelio del intestino delgado, con mayor tendencia a encontrarse en el yeyuno que en el duodeno intestinal. La aparición de la sintomatología puede presentarse entre las 24 y 48 horas post-infección. Con esto se podría afirmar que la correlación entre la aparición de la diarrea con la excreción de virus en heces y la identificación de partículas virales en células del epitelio intestinal, sugiere que el ciclo replicativo del virus tienen lugar en el tejido intestinal de los hospederos (44,169).

En ovinos, el virus infecta los enterocitos maduros de la zona apical de las microvellosidades conduciendo a una atrofia de estas y a una hipertrofia de las criptas. En este modelo, los individuos infectados experimentalmente desarrollaron la sintomatología

del segundo al cuarto día de la ingestión del virus y excretaron partículas víricas entre los días 2 y 9 post-infección (1,44,91,170).

Durante el periodo de infección, a nivel celular, se observaron inclusiones intracitoplasmáticas, vacuolas de mayor tamaño en el citoplasma y degeneración del núcleo; características típicas de un proceso de apoptosis o muerte celular programada (1,15).

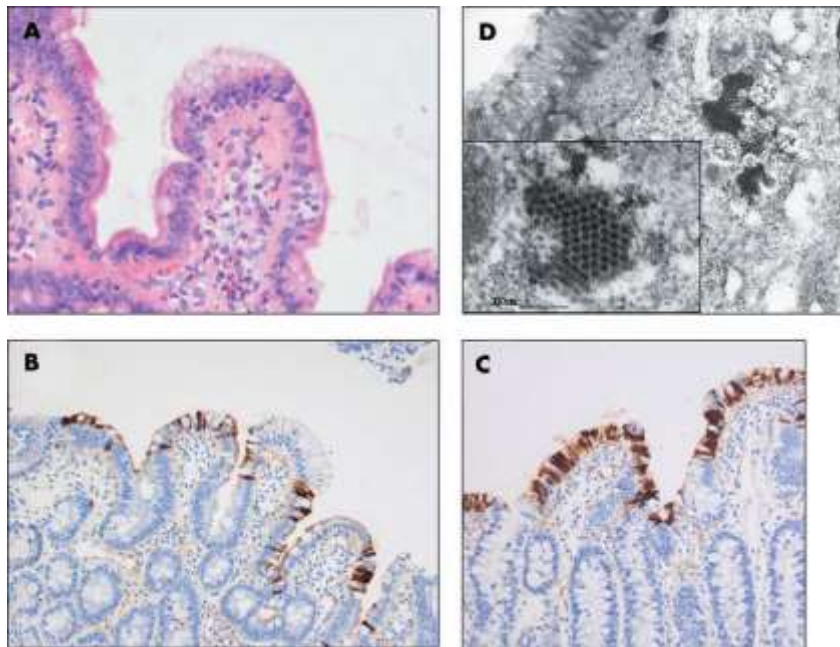
En un estudio de la estructura del intestino delgado realizado en corderos gnotobioticos se observaron algunos cambios tras la infección con astrovirus ovino ya que al realizar los análisis en muestras de tejido de yeyuno e íleon en un periodo comprendido entre 14 y 120 horas post infección (h.p.i.) se observó lo siguiente: a las 14 h.p.i. las células que correspondían a la porción apical de las vellosidades del yeyuno e íleon presentaban la infección con partículas virales; entre las 23 y 38 h.p.i. aumentó la cantidad de virus en las células confinadas a la parte apical de la vellosidad y se evidenció la presencia de partículas virales hacia la parte media de la misma, observándose agregados víricos dentro de vacuolas autofágicas y lisosomas, se observó además, células epiteliales degeneradas y desprendidas de la región apical, las cuales estaban infectadas; los enterocitos pasaron a una morfología cuboide que corroboraba el daño generándose vellosidades cortas; con relación a la morfología presentada por la lamina propia se evidenció que había infiltrados linfocíticos, células plasmáticas y macrófagos con partículas virales en organelos similares a lisosomas. y por último al evidenciar tejidos a las 120 h.p.i. se observó que no había diferencias morfológicas entre los controles y los corderos infectados, sugiriendo así que la infección había cesado (171). (ver Fig. 7.).



**Fig. 7.** Infección por astrovirus en corderos gnotobioticos. (A). microfotografía electrónica de yeyuno infectado 23 h.p.i. (B). 38 h.p.i. (C). 38 h.p.i. (D). Control 120 h.p.i.

Con relación al hallazgo en humanos, se determinó que existen evidencias en que la respuesta inflamatoria y los cambios histológicos en los enterocitos del yeyuno son leves y

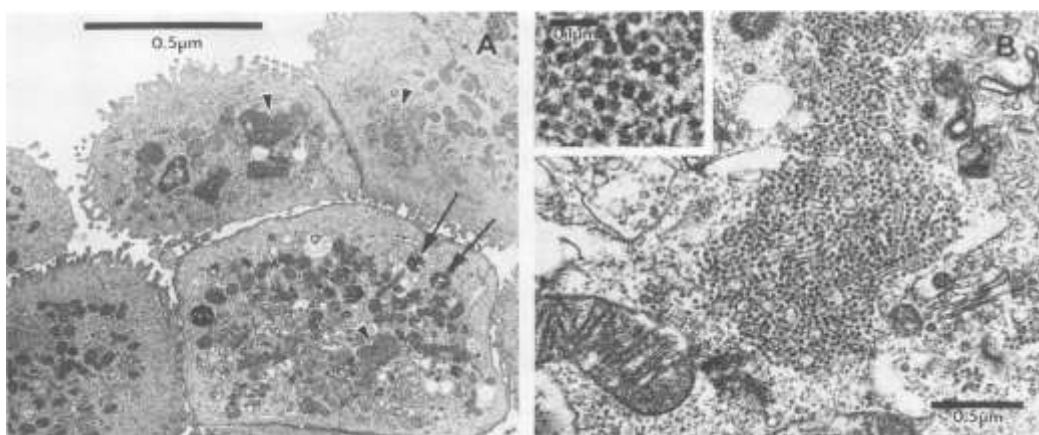
tienen un ligero acortamiento de las microvellosidades, las histopatologías demostraron embotamiento de vellosidades, alteraciones no específicas en las células epiteliales de la superficie, y un infiltrado inflamatorio mixto en la lámina propia, pero sin la presencia de cuerpos de inclusión virales. Con relación a los análisis inmunohistoquímicos las imágenes de las biopsias duodenales de yeyuno se marcaron con el anticuerpo anti-astrovirus demostrando progresivamente la tinción en las células epiteliales de superficie, más comúnmente cerca de las puntas de las vellosidades. (ver Fig. 8.) (44,168).



**Fig. 8.** Microfotografía de una biopsia de yeyuno de un paciente con trasplante de médula ósea que presento infección por astrovirus. (A). histopatología H-E yeyuno, (B y C). inmunohistoquímica para detección antígenos HAstV, (D). microfotografía electrónica de un enterocito yeyunal muestra matrices virales citoplasmáticas. tomado de: (168)

Lo observado en la infección por astrovirus en humanos sugiere que puede presentar un acortamiento de las microvellosidades intestinales debido al daño ejercido en los enterocitos ubicados en la zona apical, generando cambios en la función de la barrera epitelial (172). Así mismo, provoca atrofia de las vellosidades ya que se visualizaron infiltrados inflamatorios en la lámina propia con una diseminación hasta el yeyuno, como también la detección de partículas infecciosas en la superficie del epitelio, vellosidades cortas y macrófagos de la lámina propia (1,4,9,70,169,173).

En un estudio realizado en terneros gnotobioticos, los cuales fueron inoculados con filtrados de heces de terneros que tenían gastroenteritis, se observó depresión y anorexia, y al análisis histopatológico fusión de vellosidades, disminución de las mismas, incremento en la celularidad de la lamina propia, paso de enterocitos planos a cuboides, alteraciones en los parches de Peyer y deterioro en las criptas de las vellosidades del intestino delgado, y al realizar los análisis histopatológicos en células epiteliales del íleon se encontraron agregados de partículas virales que correspondían a astrovirus en coinfección con bredavirus lo que sugiere que en algunas ocasiones astrovirus puede estar coinfectando con otros virus (16,112). (ver Fig. 9).



**Fig. 9.** Células epiteliales del domo de las vellosidades del íleon, 50 cm antes de la unión ileal-cecal, de una vaca. (A). Los agregados de astrovirus se indican con cabezas de flechas e inclusiones de Breda virus se indican mediante flechas completas. (B) agregado de partículas astrovirales y su respectiva magnificación. Tomado de: (112)

En general, debido a la pérdida estructural y funcional del enterocito, se altera la fisiología de absorción de líquidos y del agua contenida en los alimentos, la desregulación de los canales iónicos en la absorción del sodio y cloro y la disminución de las secreciones digestivas como las disacaridasas (lactasa, sacarasa y maltasa), que son secretadas en la membrana del enterocito para la digestión de azúcares, por lo que el hospedero desarrolla un síndrome de malabsorción provocado por la alteración de la permeabilidad intestinal (1,173,174).

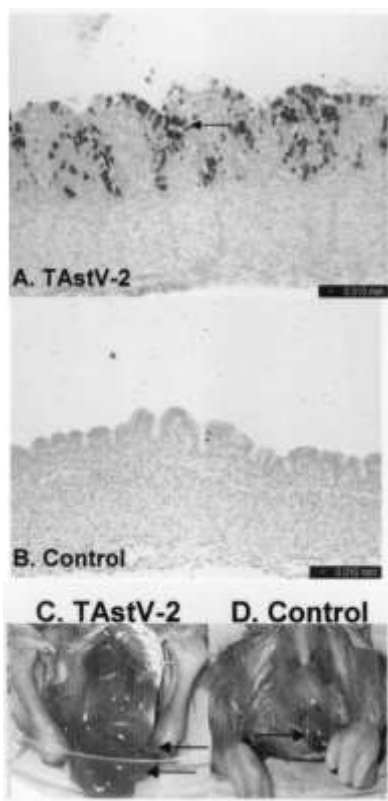
Por lo tanto, se ha querido buscar cuál puede ser el mecanismo por el cual los AstV causan diarrea, donde se plantea que no necesariamente está asociado con la destrucción del epitelio intestinal, ya que los estudios realizados en pavo indican que el posible mecanismo

inductor de la diarrea podría estar en la disfunción de la permeabilidad intestinal y la mala absorción, donde se evalúa por medio de la actividad de la enzima maltasa que se ve disminuida cuando está presente la infección por TAstV1-2, generando un deficiente metabolismo de los disacáridos y, por ello, el desarrollo de la diarrea osmótica (44,175).

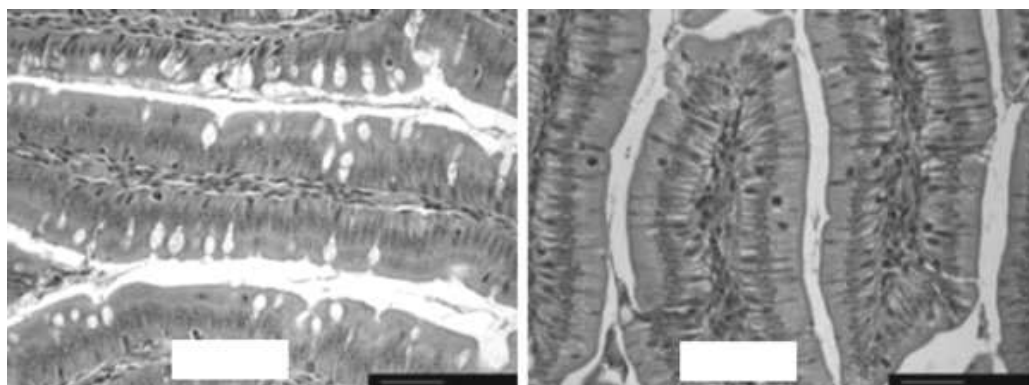
Así mismo, en este modelo se ha descrito que la infección por TAstV-1-2 provoca malabsorción de sodio, por medio de la alteración de intercambiadores sodio-hidrogeno (NHE3), presentes en las células susceptibles de la infección por AstV, siendo estos los enterocitos apicales del epitelio intestinal. (44,176). De igual manera en este estudio se hicieron análisis en los que al infectar embriones de pavo con Astrovirus del pavo tipo-2 de veinte días de edad libres de patógenos con un filtrado del virus e incubarlos durante 5 días a 37° C, se observó que a los 5 días post infección (d.p.i.) los intestinos de los pavos infectados estaban distendidos con paredes delgadas llenas de líquido en comparación con los controles.

Mediante la técnica de hibridación in situ en los tejidos de los pavos se encontró la presencia del genoma viral de (TAstV-2) en las vellosidades intestinales de los pavos que fueron inoculados. Adicionalmente por medio de la técnica de inmunohistoquímica con el anticuerpo contra las proteínas de la cápside de astrovirus se encontró la presencia de antígenos virales en órganos diferentes al intestinal (18) (ver Fig. 10, 11, 12.).

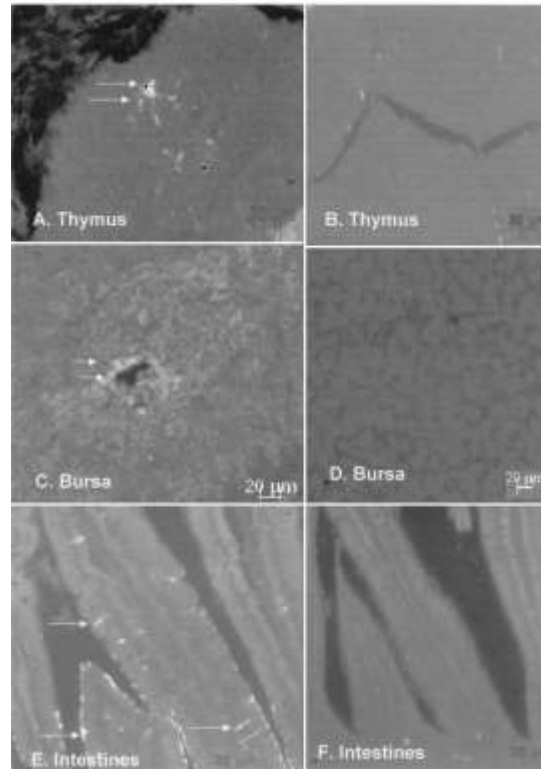




**Fig. 10.** Infección de pavos con TAsTV-2. (A). hibridación in situ para detectar TAsTV-2. (B). pavo infectado con TAsTV-2 (C). Pavo control tomado de: (18).



**Fig. 11.** Infección por TAsTV-2 no está asociada con cambios citopáticos en los intestinos de pavos infectados. Secciones duodenales obtenidas de: control (a) o infectadas por TAsTV-2 (b), tomadas de pavos jóvenes con 3 días post infección y teñidas por hematoxilina y eosina aumento: 40X tomado de: (18)



**Fig. 12.** TAsTV-2 presente en tejidos extraintestinales. microfotografías de tinción inmunofluorescente específica contra el antígeno de proteínas de cápside de AstV . (A). Timo, (B). Bursa, (C). Intestinos. tomado de (18).

**2.**  
**4.**

## Enfermedades atípicas de los astrovirus

Hasta el año 2010 se pensaba que astrovirus únicamente tenía un tropismo en el sistema gastrointestinal, sin embargo, se han realizado estudios en los que se ha confirmado que existen otra clase de astrovirus que poseen un tropismo diferente al sistema entérico, estos astrovirus se denominan divergentes o atípicos, aunque su estructura genómica sea muy similar a los clásicos hay diferencias puntuales como lo evidenciado en los análisis filogenéticos de las secuencias de las región hipervariable del ORF1a de cepas de astrovirus divergentes que los alejan de este grupo o clado, está por ejemplo un astrovirus identificado en un paciente de 15 años que padecía de agamaglobulinemia ligada al X y encefalitis, en el que se encontró HAsTV-PS (Human Astrovirus-Puget sound) en el tejido del sistema nervioso central (53) los síntomas presentados por el paciente fueron dolor de cabeza, ataxia, ideas suicidas dificultad para caminar y comunicarse, que luego de 4 semanas del ingreso al centro médico entro en estado de coma y al día 71 falleció (53). También existe un reporte en el que se pudo evidenciar por análisis de secuenciación de

próxima generación en dos pacientes inmunocomprometidas en las que se presentó meningoencefalitis de origen desconocido en los que se encontró la presencia de Astrovirus MLB2 un astrovirus divergente a las cepas “clásicas” conocidas (HAstV1-8), en tejidos del SNC (56).

Otro caso de astrovirus divergentes fue encontrado en una granja en Dinamarca, Suecia y Finlandia en el que un grupo de visones presentaron un síndrome denominado “shaking mink syndrome” en el que se evidenciaba temblores, convulsiones marcha vacilante, movimientos sin coordinación y ataxia. Los análisis por metagenómica demostraron que la enfermedad que presentaban estos visones se debía a la presencia de una infección en el sistema nervioso central (SNC) producida por un astrovirus atípico o divergente al cual denominaron ASTV-SMS ya que los únicos visones que presentaron este tipo de astrovirus eran los que tenían este síndrome (shaking mink síndrome). La diferencia entre este astrovirus y los clásicos radica en que hay una gran divergencia en la secuencia genómica que codifica para las proteínas de la capsida (ORF2) en comparación con los segmentos que codifican las proteínas no estructurales (ORF1a y ORF1b). (54)

Adicionalmente Li y colaboradores en el año 2013 encontraron un astrovirus en el tejido cerebral en el ganado bovino que vivía en ranchos en California con un trastorno neurológico clínico caracterizado histológicamente como meningoencefalomielitis neurotrópica y ganglioneuritis. Este astrovirus fue denominado (BoAstV-NeuroS1), El virus fue inicialmente identificado por metagenómica vírica, y su presencia fue confirmada posteriormente por PCR e hibridación in situ para ARN viral. Además, estudios ultraestructurales en animales demostraron partículas intracitoplasmáticas en neuronas que son considerados morfológicamente compatibles con un astrovirus (57,58).

BoAstV-NeuroS1 es ahora el tercer astrovirus reportado que está separado filogenéticamente de los AstV clásicos y que se ha detectado en el tejido cerebral asociándose enfermedad neurológica (57).

Otro astrovirus atípico que generó daño en el sistema nervioso central de ganado con encefalitis nosupurativa fue encontrado en Europa y se denominó BoAstV-CH13 (58). Adicionalmente, se han descrito dos investigaciones donde se ha propuesto al astrovirus como agente patógeno potencial en la generación de encefalitis en vacas y se ha logrado

confirmar por técnicas de hibridación in situ, secuenciación de próxima generación (next generation), y RT-qPCR contra BoAstV (59,60)

Estos hallazgos son de gran importancia ya que estas 4 especies de astrovirus asociados con síntomas neurológicos (HAstV-PS, AstV-SMS, BoAstV-NeuroS1 y BoAstV-CH13) están en el mismo clado genético de astrovirus, también estas enfermedades tienen una apariencia idéntica en la distribución anatómica y el tipo de lesiones, y todas se producen con síntomas neurológicos como casos aislados en animales de raza mixta, que todos son mamíferos, además, es importante notar que en ninguno de los casos anteriores se encontró astrovirus en tejido gastrontestinal lo que sugiere que este virus podría tener un tropismo específico por el SNC, sin embargo, para aclarar esto es necesario aumentar la cantidad de estudios que con lleven a dilucidar la asociación de astrovirus con enfermedades generadas en el SNC.

## **2.5. Astrovirus Porcino (PoAstV)**

Los Astrovirus porcinos PoAstV (PoAstV: Porcine astrovirus) han sido poco estudiados y aun hoy se desconocen aspectos básicos de su comportamiento, su impacto epidemiológico y su patogénesis (6,177), estos virus son asociados principalmente a la producción de gastroenteritis en cerdos (72,178) y también se han descrito en cerdos asintomáticos (24).

PoAstV fue descrito por primera vez en 1980 por microscopia electrónica en heces diarreicas de lechones de 3 semanas hasta 2 meses de edad (25), y han sido detectados en varios países como por ejemplo en la República de Sudáfrica (179), República Checa (180), Hungría (181,182) Canadá (24), La República de Corea (183) y Colombia (6). A la fecha y con base en análisis filogenéticos del ORF2, se ha determinado que los Astrovirus porcinos se dividen en 5 linajes o genotipos distintos (PoAstV1-PoAstV5) (95,178), los cuales se han asociados con la producción gastroenteritis en cerdos jóvenes (1). Su prevalencia en Colombia y en el mundo es desconocida, aunque a partir de algunos estudios realizados con lechones colombianos (6) se puede sospechar que su presencia en estos animales es mucho más alta en comparación con la de los Astrovirus humanos (HAstVs) la cual no sobrepasa del 10%. También se ha encontrado cierta prevalencia de PoAstVs en cerdos saludables de todos los grupos de edades (95).

Por otra parte, los estudios filogenéticos han mostrado que los PoAstVs tienen un alto parentesco con HAstVs en comparación con otros AstVs y se ha propuesto además que existe una alta transmisión entre especies en donde se incluyen humanos, cerdos, gatos, ovejas, murciélagos y ratas (Schultz-Cherry 2013).

Ensayos *in silico* han mostrado que el ORF2 de los diferentes PoAstVs tienen un contenido nucleotídico diferente, ya que la región conservada es variable entre sus genotipos (6), y se ha determinado entonces que los estudios para genotipificar Astrovirus deben basarse en las relaciones filogenéticas a partir del ORF2.

### **2.5.1 PoAstV/PUJP5**

En el año 2010, dos cepas de PoAstV (PUJP5 y PUJP47) fueron aisladas en el Laboratorio de Virología de la Pontificia Universidad Javeriana a partir de diarrea de lechones colombianos y adaptadas a cultivo celular en células embrionarias de riñón de cerdo (ESK-4) (6,140,177). Bajo las siguientes condiciones: Medio Advanced Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Invitrogen™), suplementado con 5% (v/v) de suero fetal bovino (SFB) y 2 mM de L-Glutamina con antibióticos y antimicóticos y en condiciones atmosféricas con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C (177). La cepa de PoAstV/PUJP5 produce efecto citopático *in vitro* y puede ser activada con 50µg/mL de tripsina, que es una concentración mayor que para cepas humanas que se activan con 10 µg/mL, pero menor como es el caso del serotipo 8 de astrovirus humano que se activa con 200 µg/mL.

Al realizarse los análisis filogenéticos correspondientes se concluyó que PoAstV/PUJP5 posee una región conservada de aproximadamente 398 pb ubicada al extremo 5' del ORF2 que mostró alta homología con PoAstV cepa cód GenBank: Y15938 (*Jonassen et al 2001*) y PoAstV-1, en un porcentaje que va de 86 al 97% y una *región hipervariable* del ORF2 ubicada al extremo 3' con una longitud de 700 pb aproximadamente que mostró una parcial similitud con astrovirus humano en un porcentaje que va desde el 63 al 66%, sugiriendo que PoAstV/PUJP5 es una posible cepa recombinante natural.(6)

Cabe mencionar que la cepa PUJP5 al mostrar estas características genéticas se convierte en una cepa interesante para generar estudios que lleven a dilucidar su papel en la patogénesis con el ánimo de tener aproximaciones a la infección en humanos.

## 2.6. Cerdo como modelo experimental

Hasta el momento se han descrito en los estudios de patogénesis por astrovirus tres modelos muy puntuales; el del pavo (37,184,185), el de corderos gnotobioticos (15,186), y terneros gnotobioticos (93) pero ninguno de estos modelos animales cumple con las características suficientes para conocer los eventos biológicos que ocurren en la infección y dar una explicación más cercana a los eventos que suceden en el humano.

Es por esta razón que una excelente alternativa como modelo experimental en el estudio de enfermedades infecciosas es el cerdo convencional (*sus Scrofa domesticus*) en especial para el estudio de la patogénesis viral producida por astrovirus ya que el cerdo convencional es un modelo que tiene una estrecha relación con los seres humanos en términos de anatomía, genética y fisiología, por otra parte este animal ha sido excelente modelo en representar la patogénesis causadas por diversas enfermedades infecciosas microbianas como las infecciones bacterianas causadas por *c. difficile*, *c. perfringens*, *i. suis*, *e. coli* y virus como *rotavirus*, *norovirus*, *FMD virus*, *bovine viral diarrhea virus*, *human 1918 pandemic influenza virus*, *classical swine fever*, *Schmallenberg virus infection*, *virus circovirus porcino*, entre otros (33,34,187–191), ya que se pueden reproducir con precisión los distintos aspectos de la enfermedad a evaluar. Se conoce además que los experimentos en cerdos son mucho más predictivos de los tratamientos terapéuticos en seres humanos que los experimentos que se realizan en roedores (31,192).

Se han realizado estudios que confirman que el lechón doméstico convencional es un excelente candidato como modelo de investigación en enfermedades infecciosas (33,34,187–191).

Se han realizado estudios en infecciones bacterianas que incluyen *Bordetella spp.* Por ejemplo, *B. tos ferina*, un patógeno estrictamente humano, puede infectar lechones recién

nacidos en condiciones experimentales e inducir síntomas clínicos y patología similar a la enfermedad en los lactantes (31).

Las poblaciones de cerdos convencionales domésticos tienen a su favor grandes ventajas para postularse como un gran modelo para el estudio de enfermedades infecciosas, en cuanto a:

Tienen la posibilidad que se les realicen diversos procedimientos quirúrgicos y tras ellos obtener grandes cantidades de muestras para análisis histopatológicos e inmunohistoquímicos. Los cerdos son fisiológicamente muy similares a los seres humanos ya que existe una alta homología entre ambos genomas y las secuencias proteicas y con relación a los parámetros inmunológicos entre cerdos y humanos comparten más del 80% de compatibilidad, en comparación con el 10% que comparten humanos y murinos.

Los porcinos poseen una gran vida útil de 10 a 20 años en los que se pueden llevar a cabo experimentos muy largos en el tiempo y con resultados muy reproducibles. Estos animales llegan a la madurez sexual, en un tiempo muy corto (5-8 meses) con respecto a otras especies, tienen un tiempo de gestación muy corto (114 días), y un intervalo generacional de 1 año aproximadamente. Adicionalmente se pueden recuperar camadas libres de gérmenes por procesos de cesárea (cerdos gnotobioticos) y mantenerlos aislados de patógenos durante 6 a 8 semanas.

Las camadas que nacen son abundantes, lo que beneficia la cantidad de individuos que ingresan a los ensayos experimentales, se conoce que al año se pueden tener de 24-36 lechones disponibles para variados tipos de ensayos metodológicos.

Las condiciones de crianza están estandarizadas bajo modelos de seguimiento médico-veterinario, cuadros de vacunación y programas de saneamiento. por otro lado, las herramientas diseñadas para los análisis moleculares y celulares son asequibles, además se ha avanzado en la tecnología de clonación y transgénicos para el modelo porcino.

Por último el modelo del cerdo (lechón) doméstico convencional es un modelo que se aproxima a la realidad, debido a que son lechones que tienen una microbiota intestinal que

corresponde a lo real lo cual asegura que los resultados sean comparables con un escenario real de infección natural, lo que no ocurre con relación al modelo gnotobiótico y modelos SPF, que, aunque son muy utilizados en investigación porque aseguran resultados atribuibles a la variable de estudio, su adquisición y mantenimiento son costosos y de gran envergadura metodológica, además los resultados se enfocan única y exclusivamente a estudiar un único agente patógeno (26–31).

## **3. Objetivos**

### **3.1. Objetivo General**

- Valorar la producción de eventos patogénicos tempranos asociados a la infección experimental de lechones convencionales con astrovirus durante 5 días.

### **3.2. Objetivos Específicos**

1. Confirmar el enterotropismo y patogenicidad de PoAstV (cepa PUJP5) en lechones convencionales infectados experimentalmente.
2. Evaluar la presencia de PoAstV (cepa PUJP5) en tejidos extraintestinales a los 5 días post-infección.
3. Evaluar la producción de un estadio de viremia o RNAemia en lechones convencionales infectados con PoAstV (cepa PUJP5).



## 4. Metodología

El diseño experimental planteado para el presente trabajo se dividió en 3 fases primordiales: 1) Manejo de animales; 2) Estudios histopatológicos; 3) Estudios de detección viral. La metodología asociada a cada una de las fases se presenta en detalle a continuación.

### 4.1. Fase 1: Infección experimental de lechones y toma de muestras.

Esta fase del trabajo se realizó en colaboración con dos médicos veterinarios en donde se contó con su apoyo desde la fase de adaptación de los animales hasta la recolección de los tejidos y muestras de interés, en una granja experimental la cual se describe a continuación:

#### 4.1.1. Animales

Para el modelo experimental seleccionado, se utilizaron 8 lechones convencionales destetos de 25 días de edad de la raza topigs, provenientes de una misma camada. Los animales fueron adquiridos en una granja tecnificada, en la que incluyen dentro de su sistema productivo el uso de Buenas Prácticas Porcícolas (BPP) y un programa sanitario donde no se evidenciaron signos clínicos compatibles con diarreas producidas por agentes bacterianos o virales al momento de la compra y además, fundamentado en un esquema de vacunación de las principales enfermedades que afectan la especie porcina según lo reglamentado por la resolución 2640 (28 de septiembre de 2007) emitida por el Instituto Colombiano Agropecuario - ICA.

Los animales seleccionados fueron transportados a una granja experimental donde se distribuyeron de la siguiente manera: se seleccionaron al azar 2 grupos experimentales, compuestos por 4 lechones cada uno, los cuales se llevaron a 2 habitaciones separadas previamente higienizadas cada una con su respectivo corral. El primer grupo experimental, correspondió a animales infectados, a los cuales se les administró el virus del estudio; y el segundo, fueron animales no inoculados con el virus, considerándolo como control negativo de la infección. Los animales permanecieron en una fase de adaptación durante 5 días,

asegurando que las condiciones de temperatura, alimentación y suministro de agua (potable estéril) *ad libitum*, estuvieran acorde con los lineamientos internacionales para el buen cuidado y mantenimiento de los mismos descrito por la FASS (Federation of Animal Science Society) (193).

#### **4.1.2. Virus y células.**

La cepa viral utilizada para la infección de los lechones fue astrovirus porcino PoAstV/PUJP5; esta cepa fue aislada y adaptada a cultivo celular en el Laboratorio de Virología de la Pontificia Universidad Javeriana a partir de diarreas de lechones colombianos (6). PoAstV/PUJP5 fue cultivado en la línea celular ESK-4, proveniente de células embrionarias de riñón de cerdo (ATCC® CL-184™), las condiciones del cultivo estuvieron establecidas de la siguiente manera: el medio Advanced Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Invitrogen™), suplementado con 5% (v/v) de suero fetal bovino (SFB) y 2 mM de L-Glutamina con antibióticos y antimicóticos y en condiciones atmosféricas con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, cuando se logró una confluencia mayor al 90% las células fueron infectadas con PoAstV/PUJP5 con previa activación con 100 µg/mL de tripsina pancreática (Sigma-Aldrich®/ Cat # T-4799) por una hora y se neutralizó con inhibidor de soya (Life technologies/Cat # R-007-100) por 5 minutos a temperatura ambiente. Pasadas 24 horas las partículas infecciosas se cosecharon mediante 2 ciclos de congelación (-80°C) y descongelación, seguidos de una centrifugación a 16.000 x g x 1,5 horas, el sobrenadante se usó para purificar las partículas virales y se centrifugó a 217.000 x g por 1,5 horas usando un gradiente de cloruro de cesio basado en una densidad de 1.35 g/mL reportado por Shimizu y colaboradores (25).

Posteriormente las partículas virales fueron centrifugadas de nuevo para remover el CsCl y se resuspendieron en PBS y después se pasaron por un poro de 0.22 µm. La suspensión viral se tituló por inmunocitoquímica siguiendo el protocolo de Ulloa y colaboradores (6). Brevemente, se sembraron y cultivaron células ESK-4 en placas de 96 pozos por tres días hasta obtener una confluencia mayor al 95%, y posterior a la activación del virus con tripsina, se neutralizó con inhibidor de soya y se prepararon diluciones de la suspensión viral 1:2 desde (1:4 hasta 1:4.096) y estas fueron inoculadas en las células ESK-4 por triplicado, 10 horas post-infección (hpi) se removió del medio de cultivo y se adicionó acetona al 80% en PBS por 15 minutos a temperatura ambiente, se realizaron tres lavados con PBS y se adicionó el anticuerpo policlonal contra PoAstV/PUJP5 (1:3.000) obtenido en

un estudio anterior siguiendo el protocolo de inmunización de un conejo blanco Nueva Zelanda con la cepa viral PoAstV/PUJP5 purificada con CsCl (6); que se incubó por una hora a 37°C, se realizaron tres lavados sucesivos con PBS y luego se adicionó el anticuerpo conjugado (goat anti-rabbit IgG/*invitrogen*<sup>TM</sup>/ cat # 65-6120) por una hora a 37°C, después de tres lavados con PBS para remover el anticuerpo, la reacción de antígeno - anticuerpo se reveló con AEC (3-Amino-9-Etilcarbazol-sigma Aldrich® cat # A5754) con 0.02% de peróxido de hidrogeno, verificando la tinción color marrón. Inmediatamente se detuvo la reacción con dos lavados sucesivos con agua y las unidades formadoras de foco por mililitro (UFF/mL) se cuantificaron en el microscopio invertido Olympus CKX41 la cantidad de virus a inocular fue basado en la dosis mínima infecciosa de AstV 10-100 partículas virales, ya que para asegurar el proceso infectivo en el que se manifestara la diarrea acuosa se aumento la cantidad de partículas virales basados en el área intestinal de los lechones a inocular tomando como referencia a una concentración de  $2 \times 10^6$  UFF/mL.

#### ***4.1.3. Inoculación de la cepa viral PoAstV/PUJP5.***

Pasados los 5 días de adaptación se inocularon con 2 mL de  $2 \times 10^6$  UFF/mL de la cepa viral PoAstV/PUJP5 a 4 de los 8 lechones del estudio por vía oral. Este grupo fue denominado “Lechones Infectados” (LI). Los 4 lechones restantes fueron inoculados con 2 mL de solución salina estéril y se denominaron “Lechones No Infectados” (LNI). La concentración descrita fue determinada con base en los reportes de estudios similares con modelos animales y teniendo en cuenta que se necesitaba una concentración viral relativamente alta para asegurar la producción de los eventos patogénicos.

#### ***4.1.4. Evaluación de signos clínicos y obtención de muestras.***

Después de la inoculación se tomaron muestras de heces de los dos corrales en donde se encontraban los lechones y se almacenaron a -20 °C hasta su uso. Para la clasificación de la consistencia de las heces diarreicas se usó la escala previamente reportada de Shaw y colaboradores con los siguientes puntajes: puntaje cero (0) no hay tinción fecal y no hay presencia de diarrea (heces normales); puntaje uno (1), consistencia normal, sólida y de color marrón; puntaje dos (2), heces de color marrón y consistencia suave; puntaje tres (3),

heces suaves de color amarillo; puntaje cuatro (4), heces de color amarillo y consistencia líquida (194); También se realizó la recolección de muestras de sangre periférica de la vena yugular externa desde la hora cero (antes de la inoculación) y después de la inoculación cada 24 horas tanto para el grupo de infectados (LI), como para los no infectados (LNI) hasta el sacrificio. Las muestras sanguíneas fueron centrifugadas y el suero y la sangre fueron almacenado a -20 °C hasta su uso. Mientras transcurrían los 5 días del ensayo se tomaron los datos de peso corporales y temperaturas rectales cada 24 horas a todos los lechones tanto infectados como no infectados se evidenció también la ocurrencia de diarrea y estereotipias.

El punto final se realizó el día número 5 del experimento a los dos grupos de animales experimentales siguiendo el protocolo y los lineamientos descritos por la "FASS" (193). Se diseccionaron y recolectaron los siguientes tejidos: duodeno, yeyuno, íleon, colon, hígado, bazo, ganglio linfático, cerebro, pulmón, tonsila y riñón. Los tejidos fueron almacenados en formalina al 10% y posteriormente fueron embebidos en parafina para los estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos.

Los bloques de parafina fueron cortados en láminas longitudinales y se les realizó tinción de contraste Hematoxilina- Eosina, como también la detección del antígeno viral por inmunohistoquímica (IHQ) utilizando anticuerpos policlonales primarios obtenidos en el Laboratorio de Virología de la PUJ (6). Asimismo, estos cortes se usaron para realizar el examen histopatológico con el fin de establecer posibles cambios anatomopatológicos producidos por la infección con PoAstV-PUJP5.

## **4.2. Fase 2 y Fase 3: Estudios histopatológicos y detección viral**

Los estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos fueron realizados en colaboración con el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) en sus instalaciones con la asesoría de la Dra. Maria Antonia Rincón y el Dr. Juan Carlos Ospina, Médicos Veterinarios Patólogos.

La descripción metodológica para ambos casos se encuentra descrita a continuación:

### **4.3. Confirmación del enterotropismo viral de cepa PoAstV/PUJP5.**

#### ***4.3.1. Estudio histopatológico a nivel intestinal***

El estudio de histopatología se realizó por medio de comparaciones entre tejidos obtenidos de animales infectados y no infectados, a partir del área intestinal (duodeno, yeyuno, íleon y colon), a partir de estos, se determinaron cambios morfológicos en las dos condiciones evaluadas. Adicionalmente, con el fin de valorar las lesiones producidas y obtener datos consistentes se utilizó la escala de puntajes propuesta por Gibson-Corley y col. para el análisis de estudios histopatológicos (195).

#### ***4.3.2. Detección del antígeno viral de PoAstV/PUJP5 en tejidos intestinales***

La determinación del antígeno viral se realizó por medio de una inmunohistoquímica (IHQ), desarrollada con el protocolo convencional (196). Las láminas obtenidas a partir de los cortes de los tejidos que correspondían a (duodeno, yeyuno, íleon y colon), fueron tratadas con Xilol con el fin de retirar la parafina y posteriormente rehidratadas con gradientes de etanol. Las peroxidasa endógenas se bloquearon con peróxido de hidrogeno (3%). Luego, se realizó el bloqueo de sitios de unión inespecífica con 0.001% de proteinasa K (PK), este reactivo se usó únicamente para preparar las muestras y alistarlas para el ensayo de inmunohistoquímica. Los tejidos fueron co-incubados con el anticuerpo policlonal anti PoAstV/PUJP5 (177) en una dilución de 1:200 por una hora en cámara húmeda a 37°C. Se realizaron 2 lavados consecutivos con TBST antes de la marcación con el Ac conjugado (anti-conejo IgG) (goat anti-rabbit igG/Dako™/ Cat # P0448) 1:100 con biotina y estreptavidina L-SAB™2Kits, Universal), siguiendo las indicaciones del fabricante (Dako Cat # K0690). La reacción fue revelada con 3-amino-9-etil-carbazol (DAKO AEC/Cat # K3969) en condiciones de oscuridad. Como medio de contraste, se realizó tinción de hematoxilina – eosina (197).

### **4.3.3. Detección de genoma viral a partir de muestras de materia fecal**

#### **4.3.3.1. Extracción de RNA total a partir de muestras de materia fecal.**

Las muestras de materia fecal recolectadas, fueron tratadas inicialmente con cloroformo (200  $\mu$ L) con el fin de retirar la materia orgánica presente en la muestra, las cuales fueron mezcladas por vórtex por un periodo de 30 segundos. Al obtener una mezcla homogénea, fueron centrifugadas a 16.000 x *g* por 10 minutos. A partir de estas fueron recuperados los sobrenadantes y se realizó un segundo tratamiento al pellet inicial (resuspendido en PBS) con las condiciones previamente mencionadas. Los sobrenadantes recolectados fueron filtrados por un poro de 0.22  $\mu$ m (micrómetros) listos para realizar la extracción del RNA.

El RNA total fue extraído por medio de la técnica de TRizol – Cloroformo según las recomendaciones del fabricante (198). Brevemente, a 400  $\mu$ L de sobrenadante, se le adicionó 500  $\mu$ L de TRizol LS Reagent (*Invitrogen*) y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se realizó un lavado con 1 mL de cloroformo, mezclando con Vórtex por 15 segundos y se incubó la solución por 5 minutos a temperatura ambiente; posterior a esto se centrifugaron las muestras a 16.000 x *g* por 5 minutos a 4°C, y se recuperó la fase acuosa. Finalmente, la precipitación del RNA se realizó con isopropanol en una proporción equivalente al volumen inicial, incubados en frío por 30 minutos. Se hizo una centrifugación final a 16.000 x *g* por 25 minutos con posteriores lavados con etanol al 75%, con centrifugaciones intermedias de 10 minutos a 16.000 x *g* hasta su resuspensión en agua tratada DEPC (25  $\mu$ L). Antes de almacenar las muestras para futuras aplicaciones, se incubaron a 55°C durante 10 minutos.

El RNA extraído fue cuantificado por espectrofotometría en el equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

#### **4.3.3.2. Determinación de un fragmento del ORF2 de PoAstV/PUJP5 a partir del RNA extraído de muestras de materia fecal.**

Para hacer el diagnóstico molecular del virus, se utilizó un fragmento de 417 pb del ORF 2 con los primers AST248F y AST665R reportados por Indik y colaboradores en el 2006 (180), ver Tabla. 3.

Lista de Primers		
<b>AST248F</b>	5'-GTGTCACAGGTCCAAAACCAGCAAT-3'	Nucleótidos 249-273 ORF-2
<b>AST665R</b>	5'-TGGTGTTTCGTCAACCACCAGCC-3'	Nucleótidos 644-665 ORF-2

**Tabla 3.** Lista de primers o cebadores específicos usados en la amplificación del segmento de 417 pb del ORF-2 por PCR convencional.

La síntesis del DNA complementario (cDNA) se realizó por medio de la técnica de retrotranscripción, usando el estuche comercial Superscript III de *Invitrogen*, siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, se tomaron 5 µL de RNA y se adicionaron 2 µL del primer reverso AST665R, se denaturó por 7 minutos a 95°C en el termociclador C1000 Thermal Cycler (BIO-RAD), después de esto se enfrió en baño de hielo durante 5 minutos. Para la síntesis de la cadena complementaria, se completó a volumen final de 20 µL con la solución de reacción (Buffer 5x-RT, DTT, dNTPs, y agua-tratada DEPC) y la enzima Super Script III Reverse Transcriptase (RT) (*Invitrogen*). La retrotranscripción se realizó durante 60 minutos a 50°C, 15 minutos a 72°C. El cDNA obtenido fue cuantificado por espectrofotometría en el equipo Nanodrop 2000 (Thermo). Estos cDNAs fueron almacenados a -20°C hasta su uso.

Luego de obtener los cDNAs de las muestras de materia fecal, se realizó una PCR tradicional con volumen final de 25 µL tomando una cantidad inicial de 2 µL de cDNA, con una concentración aproximada de 50 ng/µL. Para la reacción de PCR se utilizó la enzima Platinum Taq DNA Polymerase (*Invitrogen*™), y las condiciones de reacción fueron las siguientes:

Denaturación inicial; 5 minutos a 95°C; 40 ciclos en la PCR de: denaturación, 30 segundos, 95°C; anillamiento, 30 segundos, 55°C; elongación, 30 segundos, 72°C y una extensión final por 7 minutos a 72°C. La visualización de los fragmentos obtenidos se hizo por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, teñidas con bromuro de etidio. Las electroforesis se realizaron durante 60 minutos, a 100 voltios y 80 mAmp como condiciones de corrido. Para comparar las secuencias amplificadas, se utilizó un marcador de longitud molecular de 100 pb de *Invitrogen*.

Por cada grupo de muestras procesadas bajo la técnica de PCR, como control positivo se utilizó RNA extraído a partir de células ESK-4 infectadas con PoASTV-PUJP5; y como control negativo se utilizó la mezcla de reacción de PCR utilizando agua ultra pura tratada DEPC en vez de cDNA.

#### **4.3.3.3. Secuenciación y análisis bioinformáticos**

Para los análisis bioinformáticos, se realizó una elusión de las bandas positivas a partir de un gel de agarosa de bajo punto de fusión. Con el fin de purificar y secuenciar los fragmentos de interés, se realizó una digestión de la agarosa con la enzima  $\beta$ -agarasa I (New England's Bio Labs® Inc. Cat # M0392S), según las condiciones del fabricante. Una vez removida la agarosa, se prosiguió al aislamiento del DNA por medio de una precipitación con isopropanol y sales (0.5 M NaCl, 0.3 M NaOAc, 2.5 M NH<sub>4</sub>OAc) y posteriores lavados con gradientes de isopropanol. El DNA aislado fue resuspendido en agua tratada DEPC y enviado a secuenciar a Macrogen Inc (Seúl, Korea). La secuenciación se realizó en ambos sentidos con los primers AST665R y AST248F (180).

Al obtener los cromatogramas, fueron revisados en el programa Finch TV program (Geospiza, Inc. / (<http://www.geospiza.com/ftvdinfo.html>)). Las secuencias fueron editadas con el programa CLC Free Sequence Viewer 7 (<http://www.clcbio.com/products/clc-sequence-viewer/>), donde se analizaron las secuencias obtenidas con cada primer para obtener la secuencia consenso correspondiente a cada una de las muestras positivas enviadas a Macrogen.



Al obtener las secuencias consenso, se realizó un alineamiento pareado utilizando la herramienta BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) con el fin de confirmar los resultados obtenidos por PCR.

Como una segunda verificación, las secuencias obtenidas se compararon en esta ocasión con el programa Mega 6.0 (<http://www.megasoftware.net/>) con alineamientos dirigidos a la secuencia reportada de PoAstV/PUJP5 con número de referencia en el GenBank FJ160483 reportada por Ulloa y colaboradores en el 2010 (6).

#### **4.4. Determinación de PoAstV/PUJP5 en órganos extra intestinales**

Teniendo en cuenta los estudios realizados por Quan y colaboradores en 2010, Li y colaboradores en 2013 entre otros (23,53,54,57,58), donde se determinó al astrovirus en tejidos distintos a los intestinales, en este trabajo se quiso determinar si la cepa de PoAstV/PUJP5 tenía la capacidad de estar presente en otros órganos distintos al sistema entérico, por tanto, se realizó la detección del virus en órganos distintos al área intestinal, provenientes de animales infectados y no infectados bajo condiciones experimentales previamente mencionadas en la metodología. De esta manera, se realizaron análisis histopatológicos e inmunohistoquímicos a los tejidos de riñón, tonsila, corazón, hígado, ganglio mesentérico, pulmón y cerebro como fue descrito con anterioridad.

##### ***4.4.1. Estudio histopatológico a nivel extra-intestinal***

El estudio de histopatología para determinar anomalías en tejidos extra-intestinales se realizó en colaboración con los Dr. María Antonia Rincón y Juan Carlos Ospina del Instituto de ciencias agropecuarias (ICA), donde se siguió el protocolo presentado en el numeral (4.2.1.) del presente documento.

##### ***4.4.2. Detección del antígeno viral de PoAstV/PUJP5 en tejidos extra-intestinales***

Al igual que en los tejidos intestinales, la determinación del antígeno viral en tejidos provenientes de riñón, cerebro, pulmón, tonsila, ganglio mesentérico y corazón, se realizó por medio de una IHQ, desarrollada con el protocolo convencional (196) con el anticuerpo policlonal anti-PUJP5 como se describió en numerales previos.

## **4.5. Determinación de la viremia o RNAemia generada por PoAstV/PUJP5 en los lechones infectados**

### ***4.5.1. Detección del antígeno viral de PoAstV/PUJP5 en suero***

Para la determinación de la viremia, se realizó la detección del antígeno viral de PoAstV/PUJP5 a partir del suero de los lechones infectados y no infectados por medio de una ELISA directa, la cual se describe a continuación:

En primer lugar, en una caja de 96 pozos de ELISA se fijaron 50  $\mu$ L de los sueros de los lechones a una dilución en PBS 1:50 a 37°C durante 3 h en cámara húmeda, luego se llevó a 4°C por 16 horas. Seguido a esto, se hicieron tres lavados con PBS 1X -Tween 20 al 0.05%/ (100  $\mu$ L por pozo). Para el bloqueo de los sitios inespecíficos se adicionaron 100  $\mu$ L de PBS – Leche descremada al 5% por un periodo de una hora a temperatura ambiente, después de tres lavados en las mismas condiciones anteriores, se adicionó el anticuerpo primario anti-PoAstV/PUJP5 1:3.000 diluido en PBS 1X y se dejó por 90 minutos a temperatura ambiente. Seguido a esto, se realizaron tres lavados para retirar el anticuerpo restante y se prosiguió con la adición del anticuerpo IgG conjugado HRP anti-conejo de *Invitrogen*<sup>™</sup> (cat # 65-6120) 1:2500 con un tiempo de incubación de 60 minutos a temperatura ambiente. Para el revelado de la reacción se usó el reactivo quimioluminiscente OPD (o-Phenylenediamine dihydrochloride SIGMA FAST<sup>™</sup>) siguiendo las indicaciones del fabricante, adicionándolo a la solución por 30 minutos y leyendo la placa en un lector de ELISA o espectrofotómetro a una  $\lambda$  de 450 nm.

Los controles a tener en cuenta para este ensayo fueron: como control negativo, se utilizaron lisados celulares de ESK-4 sin infección viral, mientras que, como control positivo,

si utilizaron lisados de células ESK-4 infectadas con PoAstVPUJP5, finalmente, como blanco de reacción, se utilizó PBS 1x.

#### ***4.5.2. Determinación de un fragmento del ORF2 de PoAstV/PUJP5 a partir del RNA extraído del suero de lechones***

La determinación de las partículas virales de PoAstV/PUJP5, se realizó por medio de la detección del fragmento de 417 pb del ORF2 del genoma de PoAstV/PUJP5. Para este fin, la extracción del RNA se llevó a cabo por medio del método de TRIzol LS® – cloroformo de la manera anteriormente explicada en la sección (4.2.3.1.), una vez obtenido el RNA total se procedió a realizar la detección del fragmento del gen de interés al igual que se realizó para las muestras de materia fecal. Metodología explicada en la sección (4.2.3.2.).

#### ***4.5.3. Secuenciación y análisis bioinformáticos***

Los análisis bioinformáticos de las secuencias obtenidas a partir de suero de los lechones se llevaron a cabo siguiendo el protocolo mostrado anteriormente en la sección (4.2.3.3.) de este documento.

### **4.6. Consideraciones bioéticas**

En cuanto al impacto ambiental, el proyecto se desarrolló siguiendo la normatividad nacional e internacional vigente tanto para el manejo y cuidado de los animales, como para la disposición de residuos químicos y biológicos.

Asimismo, los equipos requeridos para el estudio no generaron emisiones de gases como CO<sub>2</sub> o radiación alguna peligrosa para quien los maneja.

Los animales utilizados en el estudio, fueron manejados bajo las recomendaciones de la FASS garantizando la integridad de los mismos y el manejo de una muerte digna sin sufrimiento y dolor.

El proyecto contó con el aval del comité de ética de la Pontificia Universidad Javeriana y la Universidad Nacional de Colombia.

## **5. Resultados**

### **5.1. Confirmación del enterotropismo de PoAstV/PUJP5 en lechones infectados experimentalmente**

#### ***5.1.1. Hallazgos obtenidos a nivel intestinal: confirmación del enterotropismo de PUJP5.***

Para confirmar el enterotropismo de la cepa PoAstV/PUJP5 en los tejidos intestinales (duodeno, yeyuno, íleon y colon) obtenidos de los dos grupos experimentales y para evidenciar los posibles daños asociados a los eventos infectivos, se realizaron análisis histopatológicos y la inmunodetección del antígeno viral intracitoplasmático.

Los hallazgos histológicos observados en los tejidos de los animales infectados revelaron yeyunitis necrotizante con deterioro de los enterocitos y una inmuno-tinción del antígeno de cápside de PoAstV/PUJP5 en el citoplasma de los enterocitos. Por otro lado, en tres de cuatro animales infectados, se evidenció la presencia del antígeno viral de PoAstV/PUJP5 en el yeyuno, íleon y colon. En la fig N° 13 se pueden observar los resultados obtenidos por histopatología e inmunohistoquímica a partir de yeyuno de lechones infectados y no infectados. (ver Fig. 13.).

En la Tabla. 4 se presenta un resumen de los resultados obtenidos en los ensayos de histopatología en la que se evidencia que los lechones infectados 1, 2 y 4 presentaron atrofia en las vellosidades intestinales en grados leve, moderada y severa respectivamente; fusión de vellosidades intestinales en grado moderado para los lechones infectados 2 y 4 y

leve para el lechón número 1, también presentaron fusión de las vellosidades intestinales los lechones infectados 2 y 4 con hiperplasia epitelial en grado severo y moderado, además de exocitosis en grado moderado para los lechones 1 y 2 y para el 4 en grado leve, exudado catarral en grado moderado y leve para los lechones LI1 y 2 respectivamente, atenuación del epitelio en grado leve para los lechones infectados 1 y 4 en grado leve y moderado respectivamente, infiltración mononuclear en la lámina propia con infiltrados linfocíticos y plasmáticos para los tres lechones y congestión leve con relación a los cambios circulatorios.

Con relación a los cambios que se evidenciaron en la submucosa los lechones infectados con astrovirus AstV/PUJP5 presentaron infiltrados inflamatorios con infiltrados linfocíticos en grado leve para el lechón infectado número 4 y edema en grado severo y moderado cuando se revisaron los cambios circulatorios.

Los hallazgos relacionados a fusión de las vellosidades intestinales, atrofia de las vellosidades intestinales y atenuación del epitelio afirman que el deterioro del tejido es debido a la infección viral.

Para el caso de los animales no infectados, de manera particular se evidenciaron daños histológicos en 2 de los lechones incluidos en este grupo. Para el LNI1 a nivel de la mucosa del intestino delgado presento atrofia de las vellosidades intestinales, exudado catarral e infiltración eosinofílica en la lámina propia de manera leve al igual que edema como cambio circulatorio y con un puntaje moderado fusión de las vellosidades intestinales, hiperplasia epitelial y exocitosis En el caso del LNI4, al igual que en el LNI1, se observó que presentaba atrofia de las vellosidades intestinales en el mismo grado pero no se encontró hiperplasia epitelial exocitosis y exudado catarral en las mismas condiciones que el lechón codificado con LNI1 y en menor grado de severidad la fusión de vellosidades intestinales.

Con relación a los cambios circulatorios se observó que este lechón presento congestión y hemorragia en un leve grado. Adicionalmente el tejido correspondiente a la submucosa del intestino delgado en los lechones no infectados 1 y 4 presentaron edema en escalas severa y moderado respectivamente y el lechón no infectado número 4 presentó además infiltrados inflamatorios con infiltrados linfocíticos y plasmáticos. Los resultados se pueden ver

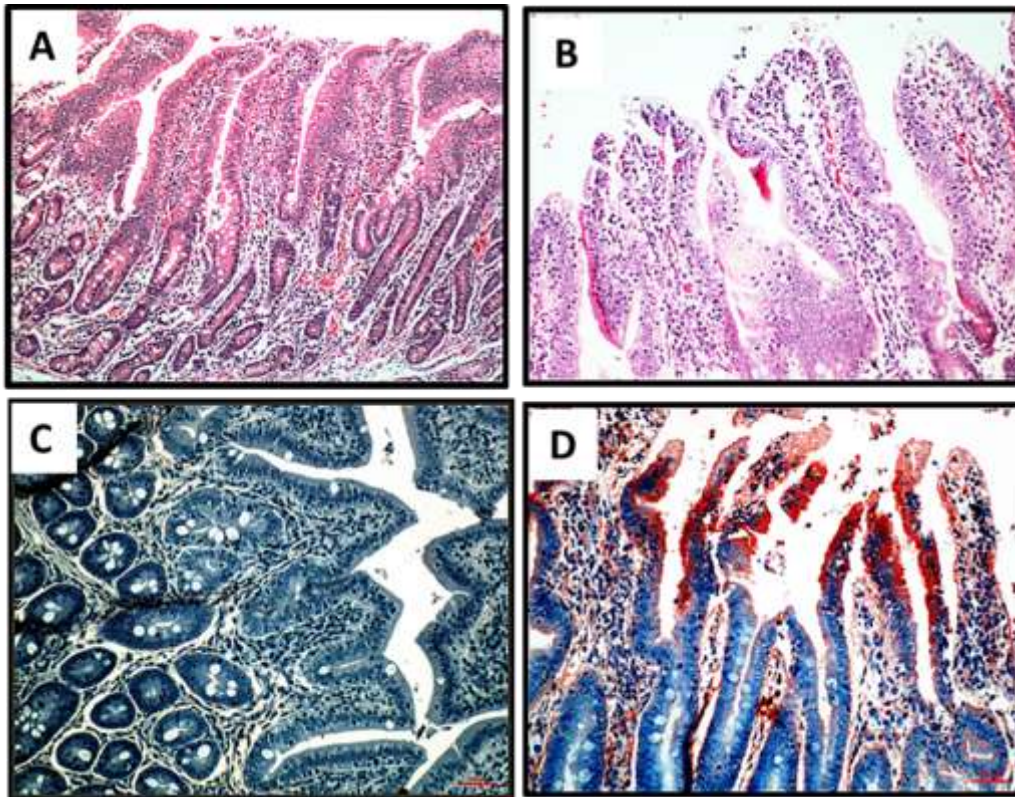
resumidos en la Tabla. 4, donde todos los criterios de hallazgos identificados fueron basados en la clasificación de Corey-Gibson et al., 2013.

Con relación a los análisis inmunohistoquímicos de los tejidos intestinales de todos los lechones se pudo observar que fue positivo en tres de cuatro lechones inoculados con PoAstV/PUJP5 excepto el lechón número 2. Para los lechones no inoculados no se encontró la presencia del antígeno de la cápside de PoAstV/PUJP5. estos resultado se resumen en la Tabla N° 5.

MUCOSA											
Código	Atrofia de las vellosidades intestinales	Fusión de vellosidades intestinales	Atenuación del epitelio	hiperplasia epitelial	Exocitosis (Inflamación intraepitelial)	Exudado catarral	Exudado hemorrágico (Lumen)	Infiltrados supurativos en la lámina propia	Infiltración mononuclear en la lámina Propia	Infiltración eosinofílica en la lámina propia	Cambios circulatorios
LI1	(+)	(-)	(+)	(++)	(++)	(++)	(+)	(-)	(++) L.P.	(+)	Congestión (+)
LI2	(++)	(++)	(-)	(+++)	(++)	(+)	(-)	(-)	(+) L.P.	(-)	Congestión (+)
LI3	No Incluido										
LI4	(++)	(++)	(++)	(++)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+) L.P.	(-)	Congestión (+)
LNI1	(+)	(++)	(-)	(++)	(++)	(+)	(-)	(-)	(+) L.P.	(-)	Edema (+)
LNI2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
LNI3	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
LNI4	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+) L.P.	(-)	Congestión y hemorragia (+)

SUBMUCOSA				
Código	Infiltrados inflamatorios	Depleción linfóide (GALT)	Necrosis linfóide (GALT)	Cambios circulatorios
LI1	(-)	(-)	(-)	Edema (+++)
LI2	(-)	(-)	(-)	Edema (+++)
LI3	No incluido			
LI4	(+) L	(-)	(-)	Edema (++)
LNI1	(-)	(-)	(-)	Edema (+++)
LNI2	(-)	(-)	(-)	(-)
LNI3	(-)	(-)	(-)	(-)
LNI4	(+) L, P	(-)	(-)	Edema (++)

**Tabla 4.** Hallazgos histopatológicos en el intestino delgado de lechones experimentalmente infectados (LI) y no infectado (LNI). Fueron evaluados los tejidos intestinales de todos los lechones no infectados y tres muestras al azar de los lechones infectados. se utilizó la escala de puntaje histopatológico propuesta por Gibson-Corley 2013 para dar valores a los resultados obtenidos.



**Fig. 13.** Histopatología e inmunohistoquímica donde se detecta el antígeno de cápsida de PoAstV/PUJP5 en el intestino de lechones experimentalmente infectados. (A). Tinción Hematoxilina-Eosina aumento 40X y (C) inmunohistoquímica con un aumento 200X representan los controles (LNI). Las fotografías (B) yeyuno con tinción de hematoxilina-Eosina en un aumento de 200X y (D) inmunohistoquímica de yeyuno con un aumento de 200X representan tejidos de lechones infectados (LI), B muestra yeyunitis necrotizante con deterioro en los enterocitos de la cúpula de la vellosidad y una ligera inflamación y D muestra una inmunotinción positiva en contra de PoAstV/PUJP5 en los citoplasmas de enterocitos.

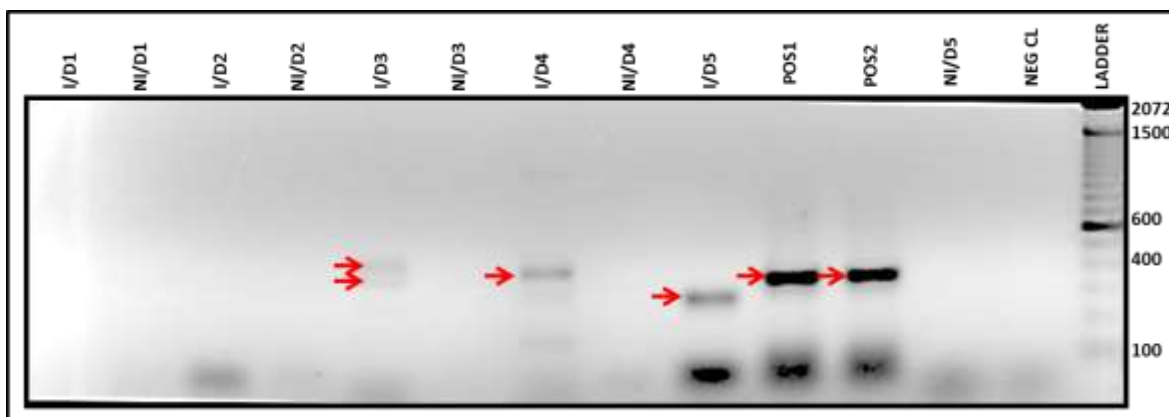
	Cod.	RESULTADO	TEJIDO	LUGAR
<b>LECHONES INFECTADOS (LI)</b>	LI1	Positivo	Colon, yeyuno	Citoplasma de enterocitos
	LI2	Negativo	----	Negativo
	LI3	Positivo	lleón y yeyuno	Citoplasma de enterocitos
	LI4	Positivo	lleón y colon	Citoplasma de enterocitos
<b>Lechones NO INFECTADOS (LNI)</b>	LNI 1	Negativo	----	----
	LNI 2	Negativo	----	----
	LNI 3	Negativo	----	----
	LNI 4	Negativo	----	----

**Tabla 5.** Presencia del antígeno viral a partir de tejidos intestinales de lechones infectados (LI) y no infectados (LNI).



### 5.1.2. Detección de genoma viral a partir de muestras de materia fecal

Con el fin de confirmar la presencia del virus en la materia fecal de los lechones, se realizó la extracción de RNA total a partir de las heces recolectadas y se cuantificó tanto el RNA obtenido como el cDNA luego de la retro-transcripción. Para la detección del virus, se esperaba encontrar un segmento de 417 pb del ORF2 que codifica para proteínas estructurales de cápside, en los resultados obtenidos a partir de la materia fecal, se evidenciaron amplificaciones desde el día 3 hasta el día 5 post-inoculación en los animales infectados. Sin embargo, las amplificaciones no siempre fueron las esperadas, exceptuando el día 4 donde se obtuvo un fragmento de 417 pb. Los análisis por RT-PCR realizados a partir de las muestras recogidas en los corrales de los lechones no inoculados (LNI) no mostraron ninguna amplificación. (Ver Fig. 14.).



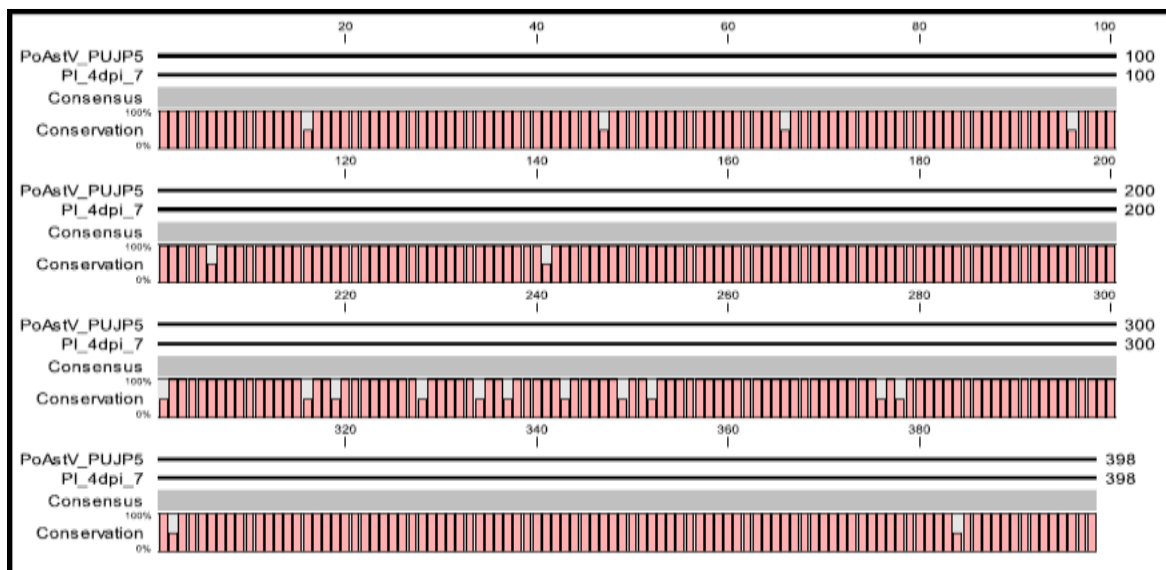
**Fig. 14.** Amplificación de la RT-PCR de 417 pb del ORF2 de PoAstV/PUJP5 de las muestras de heces recolectadas diariamente en los corrales de los lechones (LI) y (LNI), las flechas rojas indican el control positivo amplificado por duplicado (PoAstV/PUJP5 purificado con CsCl – POS 1 – 2) y las muestras de heces recolectadas en el corral de los lechones infectados los días 3, 4 y 5 post infección, con un fragmento a la misma altura del control en el día 4. No se observaron amplificaciones en las muestras de los lechones no infectados.

### 5.1.3. Análisis bioinformáticos.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la RT-PCR tradicional, donde en el día 4 se obtuvo la amplificación del fragmento esperado, se realizó la elución de la banda correspondiente al fragmento de interés y se prosiguió a validar la presencia de PoAstV/PUJP5 por secuenciación. Al recibir la secuencia de Macrogen, se analizó con las herramientas bioinformáticas mediante la comparación del segmento de 398 pb

previamente reportado para PoAstV/PUJP5 en el Genbank con código de acceso (Acc. Num FJ160483). La secuencia obtenida no fue de 417 pb debido a que en los procesos de edición de la misma se perdió la resolución de los nucleótidos en los cromatogramas.

Al obtener los cromatogramas correspondientes a la secuenciación con los primers Ast248F y Ast665R, fueron revisados y editados en el programa Finch TV, donde se obtuvo la secuencia consenso para la muestra del día 4, y se realizaron alineamientos binarios contra la secuencia previamente reportada para PUJP5 con el el programa CLC Free Sequence Viewer 7 (<http://www.clcbio.com/products/clc-sequence-viewer/>). (ver Fig. 15.).



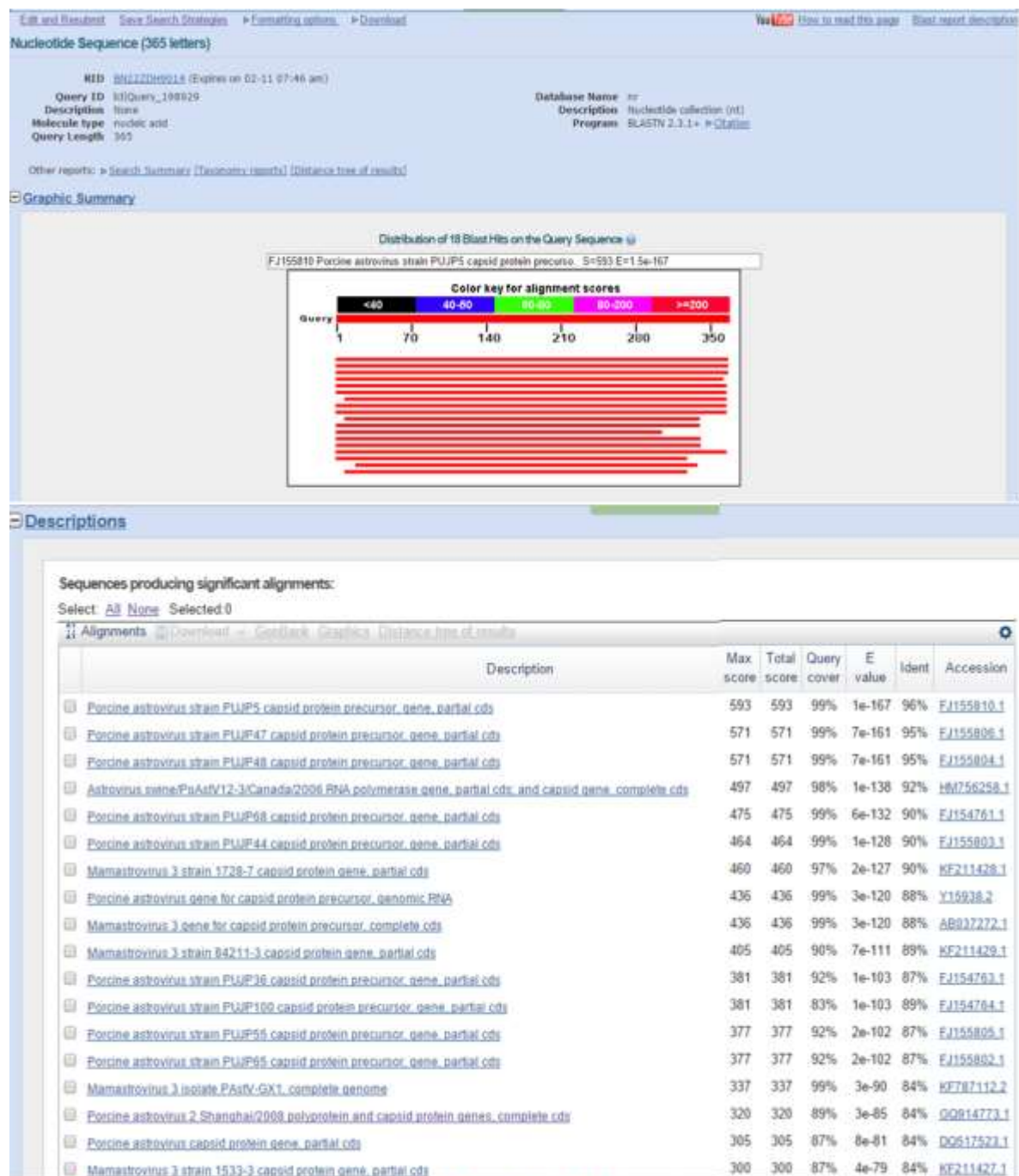
**Fig. 15.** Alineamiento binario (CLC Sequence Viewer 7) entre la secuencia reportada de PoAstV/PUJP5 (Ulloa et al., 2010) (Acc. Num. FJ160483) y la secuencia obtenida a partir de las heces de lechones infectados en el día 4 (PI/4dpi/7). Se obtuvo un porcentaje de identidad del 95%.

Como una segunda verificación, las secuencias obtenidas se compararon en esta ocasión con alineamientos dirigidos a la secuencia reportada de PoastV/PUJP5 con referencia número FJ160483 obtenida en el 2010 en el programa Mega 6.0 program (<http://www.megasoftware.net/>), obtenida PI/4dpi/7 y la secuencia reportada en el Gene Bank de PoAstV/PUJP5. (ver Fig. 16.).



**Fig. 16.** Alineamiento binario realizado con el programa MEGA 6.0 Software, entre la secuencia reportada en el gene Bank de PoAstV/PUJP5 y PI/4dpi/7.

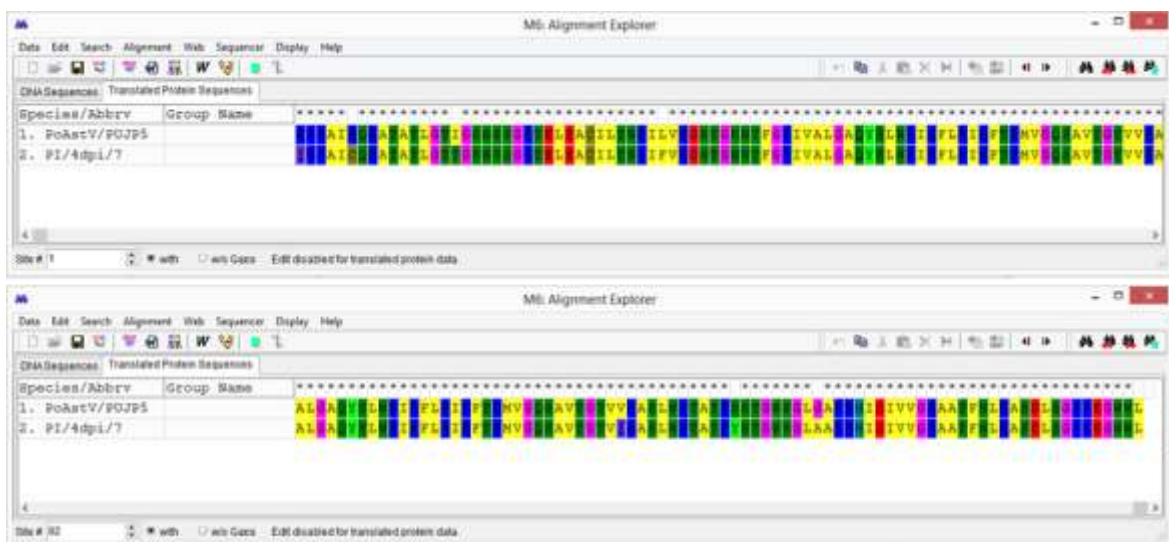
Para finalizar, se realizó un análisis con BLAST por medio de un alineamiento pareado utilizando puntualmente BLASTn disponible en línea en la siguiente página web: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). De este modo, se quiso evaluar los porcentajes de identidad no solo con PUJP5 sino con otras secuencias previamente reportadas, donde se obtuvo un 96% de identidad bajo este algoritmo con PoAstV/PUJP5. (ver Fig. 17.).



**Fig. 17.** A) Blastn realizado para la secuencia correspondiente al día 4 (PI/4dpi/7). B) alineamientos significativos de la secuencia que corresponde al 4 día post inoculación.

A partir del alineamiento binario, se evidenciaron 19 nucleótidos diferentes a los de la secuencia reportada, para los cuales se hicieron análisis de transiciones y transversiones para verificar que los cambios nucleotídicos no afectaran la estructura aminoacídica del péptido que pudieran repercutir en la funcionalidad del mismo. Al hacer los análisis de las

traducciones *in silico* (ver Fig. 18.), se quiso corroborar si podían ocurrir cambios interesantes en las modificaciones pos-traduccionales de este pequeño péptido generado de 132 aminoácidos (a.a.), observándose que aunque hubo un mayor número de cambios en los nucleótidos, solo se evidenciaron 5 aminoácidos diferentes en el péptido obtenido (Ver fig.17.). En las tablas 10 y 11 se pueden observar las 19 sustituciones detectadas en las muestras recuperadas en el día 4 (PI/4dpi/7) de los cerdos infectados, como los porcentajes de transversión y transición (ver Tabla 6 y 7.).



**Fig. 18.** Traducción *in silico* de secuencias analizadas con el programa Mega 6.0. Franja superior región del a.a.1 al 81. Franja inferior Region a.a. 82-132. Se observa comparación de la secuencia de referencia (PoAstV/PUJP5) con secuencia obtenida a partir de heces de lechones infectados en el día 4 (PI/4dpi/7) post inoculación.

# Sitio en la secuencia	Nucleótido cambiado	Tipo de cambio	Cambio de A.A
16	C - T	TRANSICION	6R/C
47	T - C	TRANSICION	16I/T
66	G - C	TRANSVERSION	No
96	G - A	TRANSICION	No
106	C - T	TRANSICION	36L/F
141	C - T	TRANSICION	No
201	A - G	TRANSICION	No
216	A - G	TRANSICION	No

<b>219</b>	A - G	TRANSICION	No
<b>228</b>	C - T	TRANSICION	No
<b>234</b>	T - C	TRANSICION	No
<b>237</b>	A - C	TRANSVERSION	No
<b>243</b>	T - C	TRANSICION	No
<b>249</b>	A - T	TRANSVERSION	No
<b>252</b>	G - A	TRANSICION	No
<b>276</b>	G - C	TRANSVERSION	No
<b>278</b>	C - A	TRANSVERSION	93S/Y
<b>302</b>	G - C	TRANSVERSION	101G/A
<b>384</b>	A - G	TRANSICION	No

**Tabla 6.** Transiciones y transversiones encontradas en la secuencia obtenida (PI/4dpi/7) correspondiente a las heces de los lechones infectados en el cuarto día post infección con relación a la secuencia reportada de PoAstV/PUJP5.

<b>CAMBIOS</b>	<b>Porcentaje %</b>
<b>13 TRANSICIONES</b>	3,26%
<b>6 TRANSVERSIONES</b>	1,50%
<b>19 EVENTOS</b>	4,76%

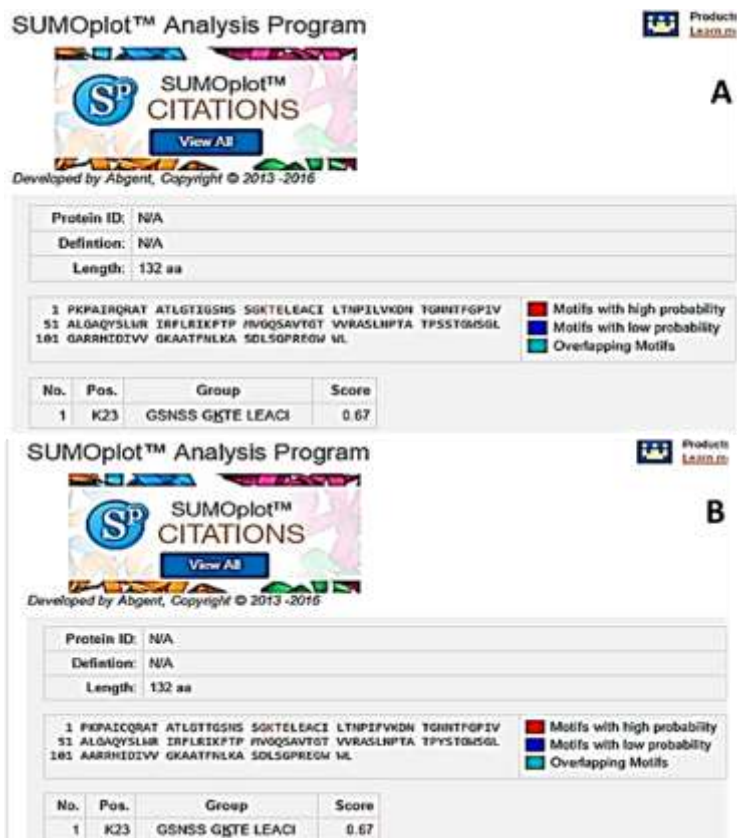
**Tabla 7.** Resumen de las transiciones y transversiones encontradas en la secuencia (PI/4dpi/7) cuarto día post infección.

Los análisis de modificación postraduccional se realizaron con el fin de verificar que los eventos relacionados con modificaciones postraduccionales afectaran de igual manera tanto, a la secuencia péptidica obtenida en el día 4 (PI/4dpi/7) como el péptido obtenido con la secuencia reportada por Ulloa y colaboradores en el 2010 (6) evitando la alteración en la funcionalidad del péptido, para esto se verificó también con modelos *in silico* si estos cambios de aminoácidos generaban alguna alteración a la naturaleza del péptido al evaluar modificaciones postraduccionales como: SUMOilación, glicosilaciones (C-manosilaciones, O-glicosilación, N-glicosilación).

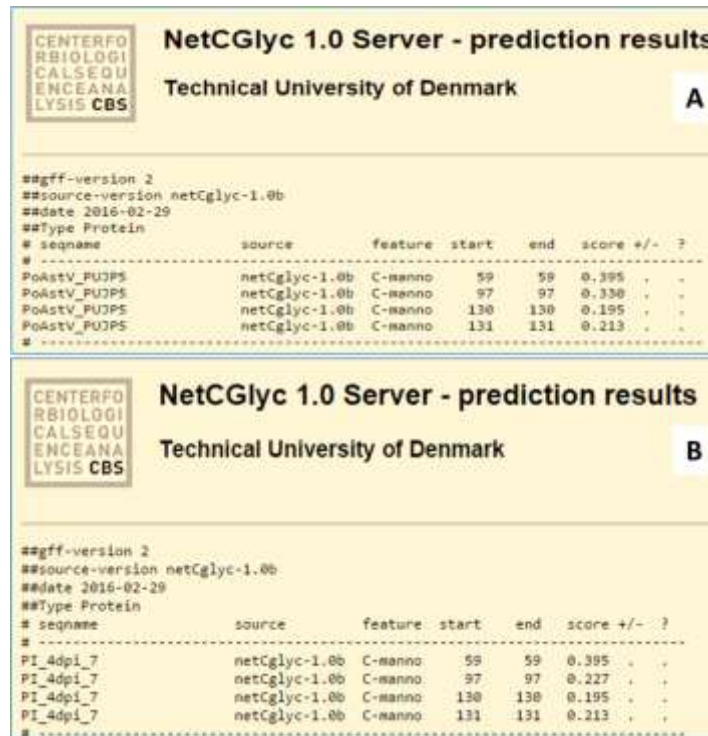
A continuación, se observan las aproximaciones *in silico* de las modificaciones postraduccionales tanto de PoAstV/PUJP5 y de la secuencia obtenida en el día 4 de lechones infectados (PI/4dpi/7) (ver Fig. 19, 20, 21 y 22). En las figuras 19 se observa que para eventos de SUMOilación tanto el péptido de PoAstV/PUJP5 como PI/4dpi/7 se comportan de igual manera y ninguno de estos genera una unión a proteínas SUMO. en la



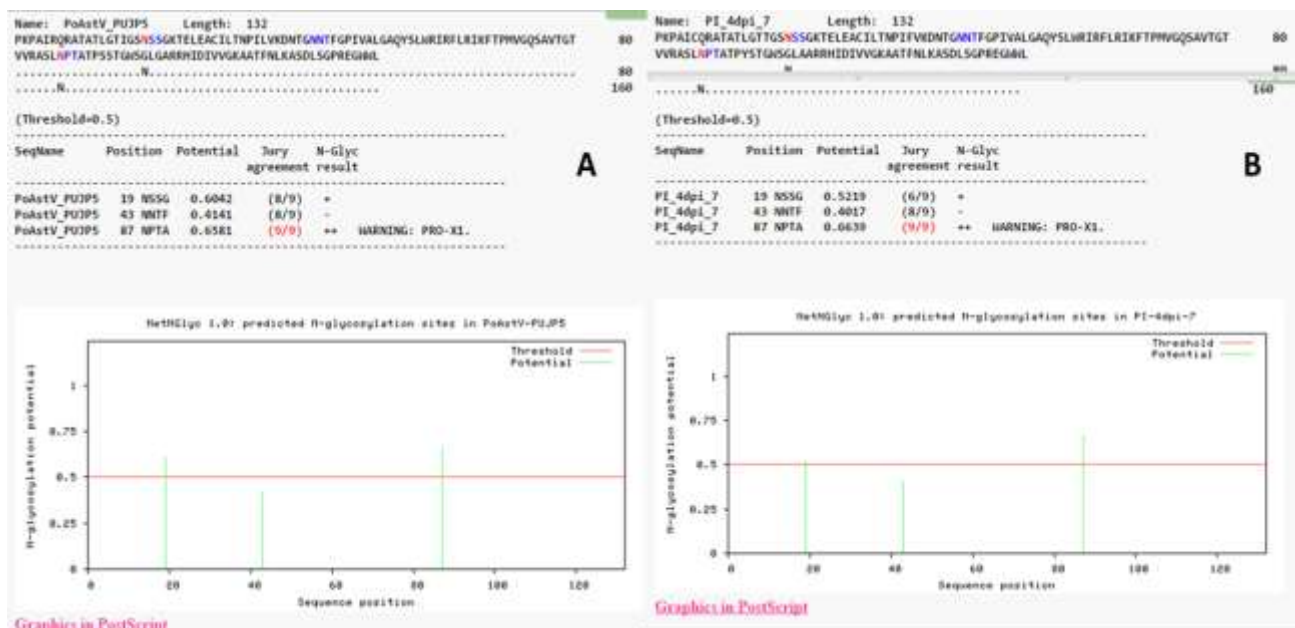
figura 20 se observa que tanto el péptido de PoAstV/PUJP5 y el de la secuencia obtenida obtienen los mismos sitios de posibles manosilaciones, al igual que los sitios de N-glicosilación (fig. 21) y O-glicosilación (Fig 22).



**Fig. 19.** Análisis *in silico* de modificaciones postraduccionales (SUMOilacion). (A). Secuencia reportada de PoAstV/PUJP5. Y (B). Secuencia obtenida de las heces de los lechones correspondientes al día 4 post inoculación (PI/4dpi7).



**Fig. 20.** Análisis *in silico* de modificaciones postraduccionales de posibles sitios de C-manosilaciones. (A). Secuencia reportada de PoAstV/PUJP5. Y (B). Secuencia obtenida de las heces de los lechones correspondientes al día 4 post inoculación (PI/4dpi/7).



**Fig. 21.** Análisis *in silico* de modificaciones postraduccionales de posibles sitios de N-Glicosilaciones. (A). Secuencia reportada de PoAstV/PUJP5. Y (B). Secuencia obtenida de las heces de los lechones correspondientes al día 4 post inoculación (PI/4dpi/7).



NetOGlyc 4.0 Server - prediction results										NetOGlyc 4.0 Server - prediction results									
Technical University of Denmark										Technical University of Denmark									
A										B									
<pre> #seqff-version 3 #source-version NetOGlyc 4.0.0.13 #date 18-2-20 #type Protein #seqname      source feature start end score strand frame comment PI_40PI_7    netOglyc-4.0.0.13 CARBOHYD 39 10 0.017985 . . . . . PI_40PI_7    netOglyc-4.0.0.13 CARBOHYD 32 11 0.030962 . . . . . PI_40PI_7    netOglyc-4.0.0.13 CARBOHYD 35 15 0.767876 . . . . . PI_40PI_7    netOglyc-4.0.0.13 CARBOHYD 26 16 0.05402 . . . . . PI_40PI_7    netOglyc-4.0.0.13 CARBOHYD 33 18 0.077462 . . . . . PI_40PI_7    netOglyc-4.0.0.13 CARBOHYD 29 20 0.728044 . . . . . PI_40PI_7    netOglyc-4.0.0.13 CARBOHYD 21 21 0.543313 . . . . . PI_40PI_7    netOglyc-4.0.0.13 CARBOHYD 24 24 0.22801 . . . . . PI_40PI_7    netOglyc-4.0.0.13 CARBOHYD 32 32 0.129375 . . . . . PI_40PI_7    netOglyc-4.0.0.13 CARBOHYD 41 41 0.125968 . . . . . PI_40PI_7    netOglyc-4.0.0.13 CARBOHYD 43 45 0.11262 . . . . . PI_40PI_7    netOglyc-4.0.0.13 CARBOHYD 57 57 0.041989 . . . . . PI_40PI_7    netOglyc-4.0.0.13 CARBOHYD 69 69 0.199686 . . . . . PI_40PI_7    netOglyc-4.0.0.13 CARBOHYD 75 75 0.37363 . . . . . PI_40PI_7    netOglyc-4.0.0.13 CARBOHYD 78 78 0.854281 . . . . . PI_40PI_7    netOglyc-4.0.0.13 CARBOHYD 80 80 0.294589 . . . . . PI_40PI_7    netOglyc-4.0.0.13 CARBOHYD 85 85 0.944349 . . . . . PI_40PI_7    netOglyc-4.0.0.13 CARBOHYD 89 89 0.76704 . . . . . PI_40PI_7    netOglyc-4.0.0.13 CARBOHYD 91 91 0.678453 . . . . . PI_40PI_7    netOglyc-4.0.0.13 CARBOHYD 94 94 0.387571 . . . . . PI_40PI_7    netOglyc-4.0.0.13 CARBOHYD 95 95 0.55844 . . . . . PI_40PI_7    netOglyc-4.0.0.13 CARBOHYD 98 98 0.5 . . . . . PI_40PI_7    netOglyc-4.0.0.13 CARBOHYD 115 115 0.335695 . . . . . PI_40PI_7    netOglyc-4.0.0.13 CARBOHYD 121 121 0.198899 . . . . . PI_40PI_7    netOglyc-4.0.0.13 CARBOHYD 124 124 0.069029 . . . . . </pre>										<pre> #seqff-version 1 #source-version NetOGlyc 4.0.0.13 #date 18-2-20 #type Protein #seqname      source feature start end score strand frame comment PoASTV_PUJP5 netOglyc-4.0.0.13 CARBOHYD 11 11 0.793905 . . . . . POSITIVE PoASTV_PUJP5 netOglyc-4.0.0.13 CARBOHYD 15 15 0.626354 . . . . . POSITIVE PoASTV_PUJP5 netOglyc-4.0.0.13 CARBOHYD 18 18 0.78771 . . . . . POSITIVE PoASTV_PUJP5 netOglyc-4.0.0.13 CARBOHYD 20 20 0.63858 . . . . . POSITIVE PoASTV_PUJP5 netOglyc-4.0.0.13 CARBOHYD 21 21 0.458257 . . . . . POSITIVE PoASTV_PUJP5 netOglyc-4.0.0.13 CARBOHYD 34 34 0.176404 . . . . . PoASTV_PUJP5 netOglyc-4.0.0.13 CARBOHYD 41 41 0.164954 . . . . . PoASTV_PUJP5 netOglyc-4.0.0.13 CARBOHYD 41 41 0.188859 . . . . . PoASTV_PUJP5 netOglyc-4.0.0.13 CARBOHYD 41 45 0.124207 . . . . . PoASTV_PUJP5 netOglyc-4.0.0.13 CARBOHYD 57 57 0.0431644 . . . . . PoASTV_PUJP5 netOglyc-4.0.0.13 CARBOHYD 69 69 0.20556 . . . . . PoASTV_PUJP5 netOglyc-4.0.0.13 CARBOHYD 75 75 0.394893 . . . . . PoASTV_PUJP5 netOglyc-4.0.0.13 CARBOHYD 78 78 0.62374 . . . . . POSITIVE PoASTV_PUJP5 netOglyc-4.0.0.13 CARBOHYD 80 80 0.437345 . . . . . PoASTV_PUJP5 netOglyc-4.0.0.13 CARBOHYD 85 85 0.548096 . . . . . POSITIVE PoASTV_PUJP5 netOglyc-4.0.0.13 CARBOHYD 89 89 0.818014 . . . . . POSITIVE PoASTV_PUJP5 netOglyc-4.0.0.13 CARBOHYD 91 91 0.768558 . . . . . POSITIVE PoASTV_PUJP5 netOglyc-4.0.0.13 CARBOHYD 93 93 0.563395 . . . . . POSITIVE PoASTV_PUJP5 netOglyc-4.0.0.13 CARBOHYD 94 94 0.765218 . . . . . POSITIVE PoASTV_PUJP5 netOglyc-4.0.0.13 CARBOHYD 95 95 0.494706 . . . . . PoASTV_PUJP5 netOglyc-4.0.0.13 CARBOHYD 98 98 0.528496 . . . . . POSITIVE PoASTV_PUJP5 netOglyc-4.0.0.13 CARBOHYD 115 115 0.239744 . . . . . PoASTV_PUJP5 netOglyc-4.0.0.13 CARBOHYD 121 121 0.203393 . . . . . PoASTV_PUJP5 netOglyc-4.0.0.13 CARBOHYD 124 124 0.0758877 . . . . . </pre>									

**Fig. 22.** Análisis *in silico* de modificaciones postraduccionales de posibles sitios de O-Glicosilaciones. (A). Secuencia reportada de PoAstV/PUJP5. Y (B). Secuencia obtenida de las heces de los lechones correspondientes al día 4 post inoculación (PI/4dpi/7).

## 5.2. Determinación de PoAstV/PUJP5 en órganos extra intestinales

Para la detección del virus en órganos distintos al área intestinal, se realizaron análisis histopatológicos e inmuno-histoquímicos a los tejidos de riñón, tonsila, corazón, hígado, ganglio mesentérico, pulmón y cerebro. A continuación, se observan los resultados obtenidos en la tabla 12, donde se observa que se encontró el antígeno de la cápsida de PoAstV/PUJP5 en el ganglio mesentérico de dos lechones inoculados. Esta presencia es incipiente indicando que la cantidad de antígeno viral es baja casi nula comparado con la infección presente en yeyuno, para los estudios inmunohistoquímicos que se desarrollaron en los demás tejidos extraintestinales los resultados fueron negativos, tanto en lechones inoculados (LI), como para los no inoculados (LNI) (ver Tabla 8.).

	Cod.	RESULTADO	TEJIDO	LUGAR
<b>LECHONES INFECTADOS (LI)</b>	IP1	Negativo	----	----
	IP2	Negativo	----	----
	IP3	Positivo	Ganglio mesentérico	Citoplasma de células inflamatorias.
	IP4	Positivo	Ganglio mesentérico	Presencia incipiente en células inmunológicas
<b>LECHONES NO INFECTADOS (LNI)</b>	NIP1	Negativo	----	----
	NIP2	Negativo	----	----
	NIP3	Negativo	----	----
	NIP4	Negativo	----	----

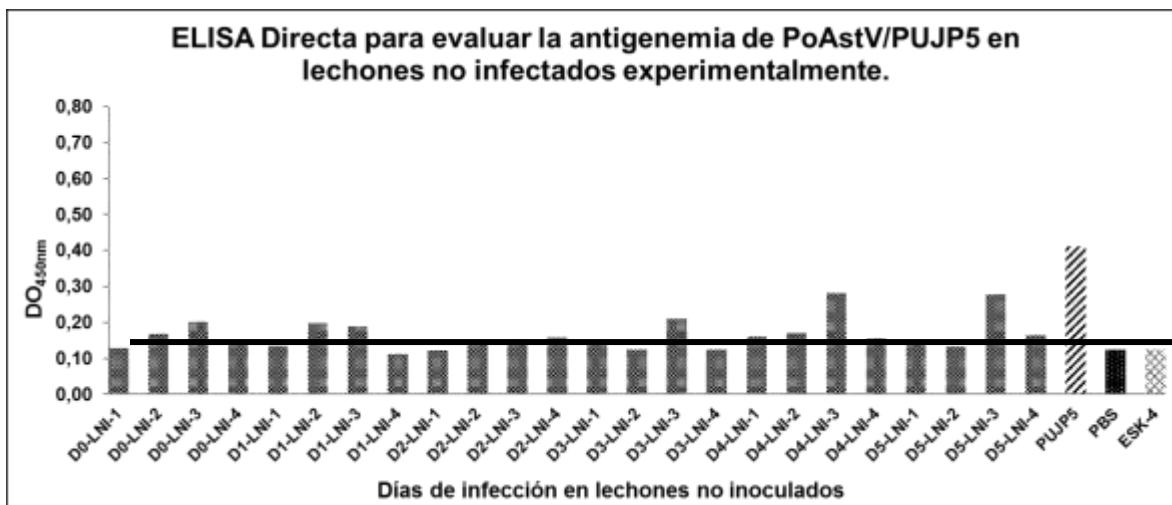
**Tabla 8.** Resultados resumidos de la inmunohistoquímica llevada a cabo para detectar el antígeno de la cápside de PoAstV/PUJP5 en tejidos extraintestinales (riñón, bazo, tonsila, hígado, cerebro, corazón, pulmón y ganglio mesentérico) de lechones infectados (LI) (IP1-IP4) y no infectados (LNI) (NIP1-NIP4). El antígeno citoplasmático viral fue observado en dos de los animales infectados en ganglio mesentérico. No se encontró el antígeno de PoAstV/PUJP5 en ninguno de los animales no infectados.

### 5.3. Determinación de la viremia o RNAemia generada por PoAstV/PUJP5 en los lechones infectados.

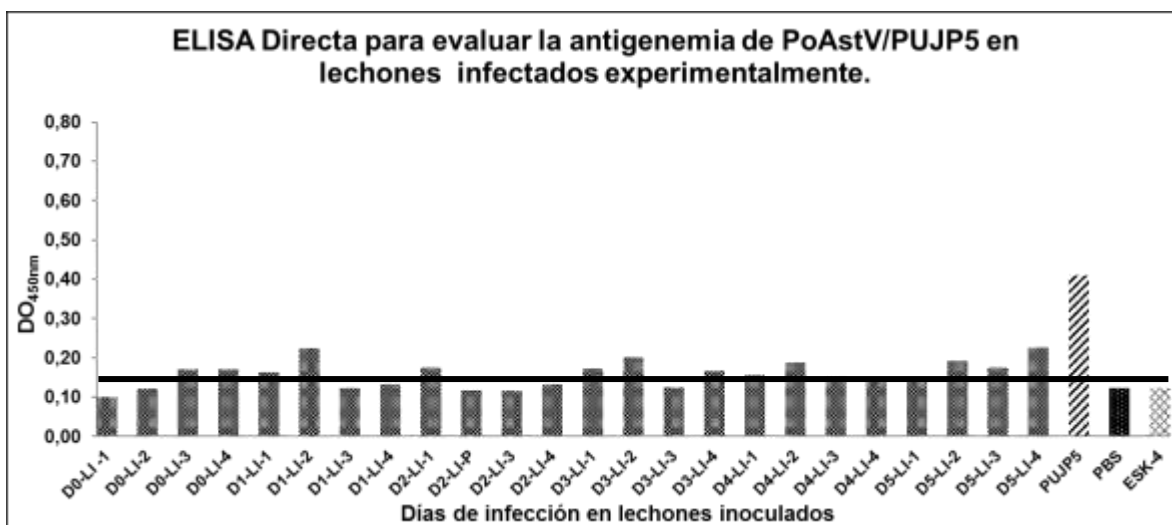
#### 5.3.1. Detección del antígeno viral de PoAstV/PUJP5 en suero

Al evaluar la presencia del antígeno viral por medio de la ELISA Directa en los sueros de los lechones no se observaron resultados concluyentes. Este fenómeno se presentó en los valores obtenidos tanto para los sueros de los lechones inoculados (grupo experimental LI) como los no inoculados (grupo control LNI), las lecturas de absorbancias fueron bajas, incluyendo el control positivo. Lo que sugiere que no había presencia del antígeno viral en los lechones ya que ni siquiera igualaron el valor propuesto en el control positivo, se evidencia además que los valores obtenidos en ambas gráficas son similares.

Los controles que se tuvieron en cuenta para este ensayo fueron; control positivo, lisado de células ESK-4 infectadas con PoAstV/PUJP5; control negativo, lisado de células ESK-4 sin infectar y, PBS estéril. (ver Fig. 23 y 24.).



**Fig. 23.** Ensayo ELISA directo para evaluar la antigenemia de PoAstV/PUJP5 en sueros de lechones No infectados (LNI) con Ac Policlonal contra PoAstV/PUJP5.

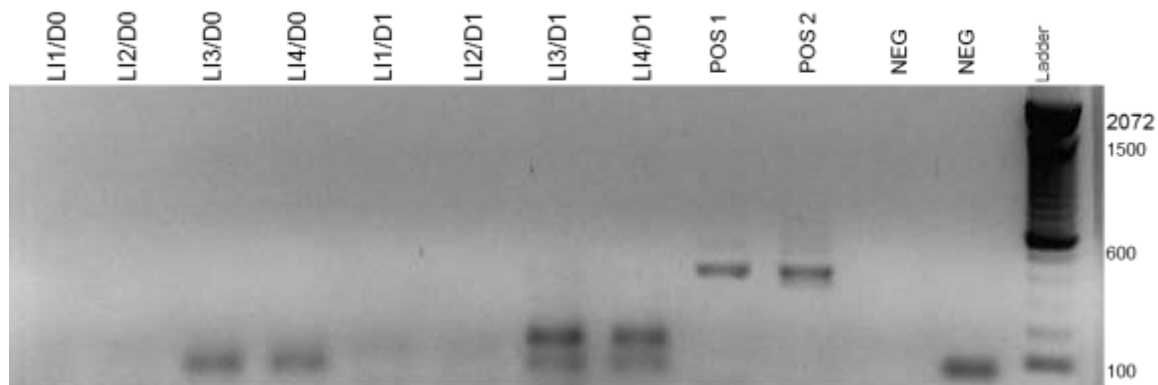


**Fig. 24.** Ensayo ELISA directa para evaluar la antigenemia de PoAstV/PUJP5 en sueros de lechones infectados experimentalmente (LI) con Ac Policlonal contra PoAstV/PUJP5.

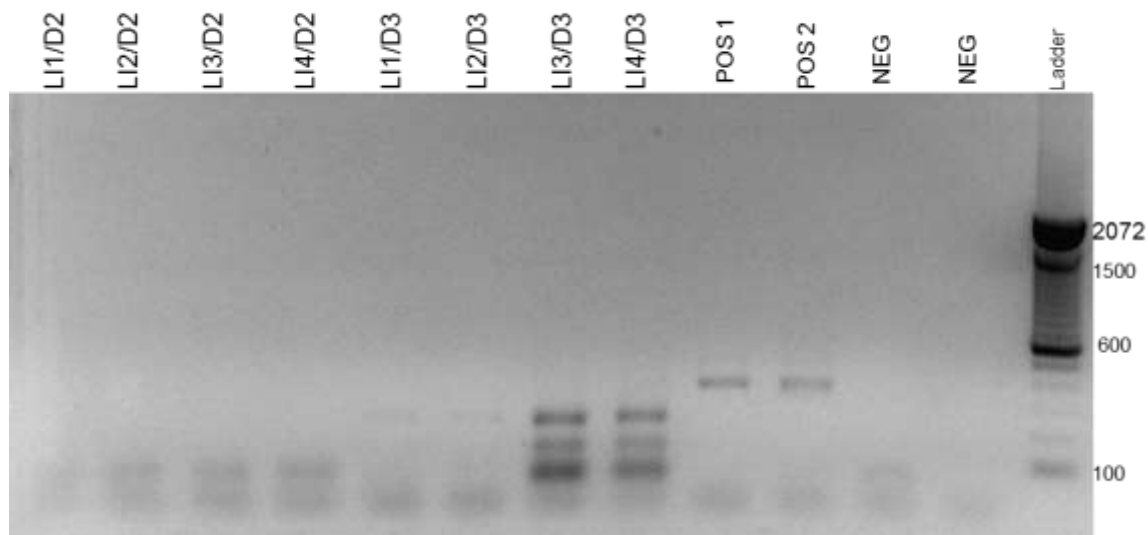
### **5.3.2. Determinación de un fragmento del ORF2 de PoAstV/PUJP5 a partir del RNA extraído del suero de lechones**

La determinación del fragmento de 417 pb del ORF2 del genoma de PoAstV/PUJP5 a partir del suero de los lechones, no evidenció la amplificación esperada correspondiente al RNA viral, lo que sugiere que no hay presencia del genoma de astrovirus en los sueros de los lechones infectados y (LI) y no infectados (LNI), ya que no aparece en ninguna de las muestras la banda a la altura de los 417pb. De manera particular, se observa que en

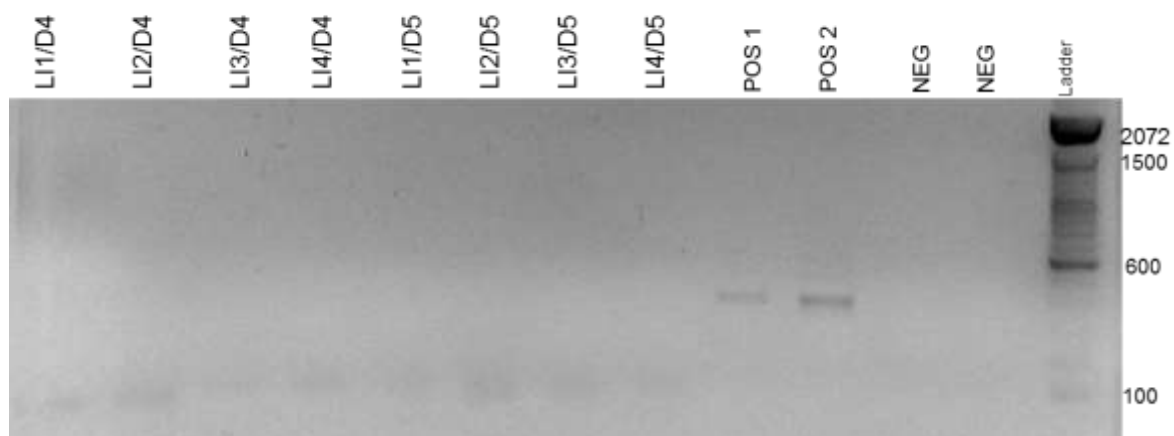
algunos casos hubo amplificaciones inespecíficas con fragmentos de menor tamaño. (ver Fig. 23-28.).



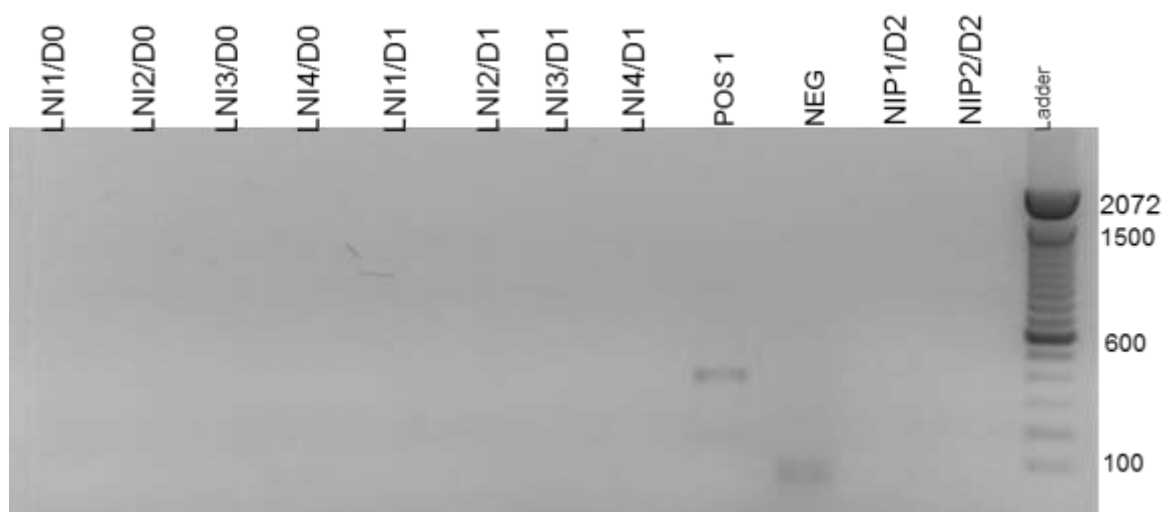
**Fig. 23.** Resultados de la RT-PCR para verificar la presencia del genoma de PoAstV/PUJP5 en sueros de lechones inoculados (LI) en el día de la inoculación y 24 hpi



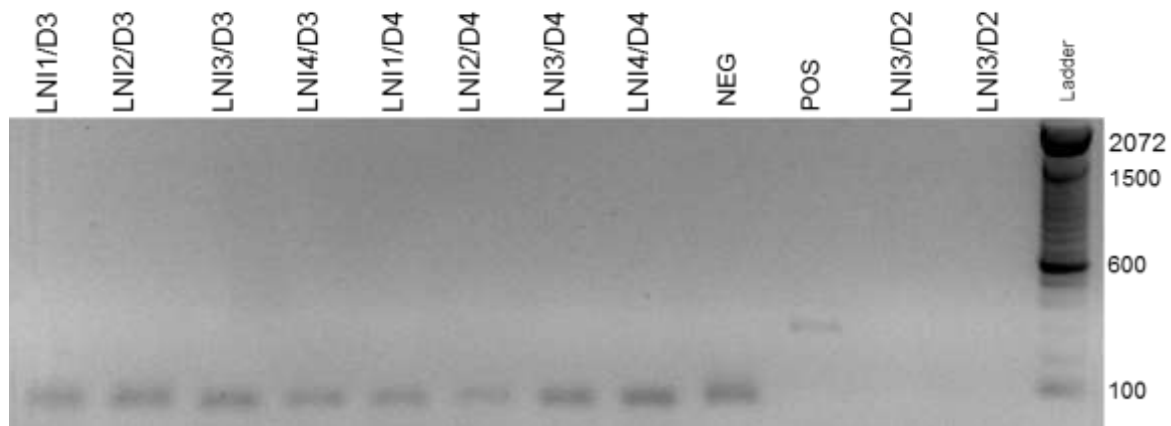
**Fig. 24.** Resultados de la RT-PCR para verificar la presencia del genoma de PoAstV/PUJP5 en sueros de lechones inoculados (LI) en el segundo y tercer día del ensayo.



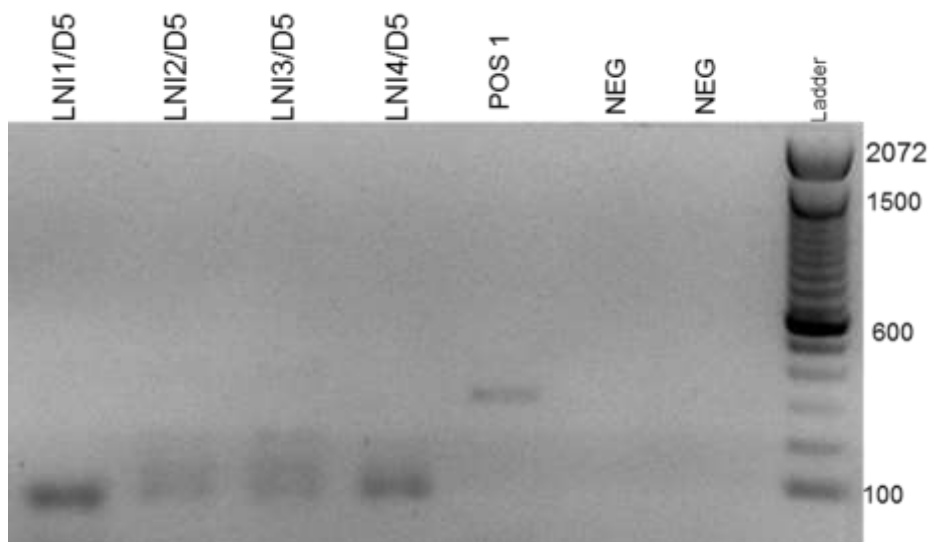
**Fig. 25.** Resultados de la RT-PCR para verificar la presencia del genoma de PoAstV/PUJP5 en sueros de lechones inoculados (LI) en el cuarto y quinto día del ensayo post-infección.



**Fig. 26.** Resultados de la RT-PCR para verificar la presencia del genoma de PoAstV/PUJP5 en sueros de lechones no inoculados (LNI) en el día de la inoculación, 24 hpi y 48 hpi.



**Fig. 27.** Resultados de la RT-PCR para verificar la presencia del genoma de PoAstV/PUJP5 en sueros de lechones no inoculados (LNI) en el segundo, tercero y cuarto después de la inoculación.



**Fig. 28.** Resultados de la RT-PCR para verificar la presencia del genoma de PoAstV/PUJP5 en sueros de lechones no inoculados (NIPLNI) en el quinto día después de la inoculación.

## 5.4. Resultados adicionales

### 5.4.1. Análisis de comportamientos asociados a la infección por astrovirus y de pesos y temperaturas corporales de los lechones.

En la Tabla 9 se observan los pesos obtenidos durante los 5 días totales del experimento de infección dirigida donde se observa que ambos grupos tuvieron ganancias de peso, para el caso de los infectados se observó una ganancia que oscila entre el 17,6 % y 26 %, y para los no infectados la ganancia fue del 6.4 %, la ganancia de peso promedio diario reportada para los lechones destetados es de 400g/día (Ver Tabla 9. y Fig. 29.) (199).

Tiempo (días)/h.p.i		Peso corporal Infectados (kg)				Peso corporal No Infectados (kg)			
		1	2	3	4	1	2	3	4
<b>0</b>	0 hpi	4,9	6,0	8,9	6,3	4,0	5,3	7,3	7,0
<b>1</b>	24 hpi	5,9	6,4	9,0	6,4	4,5	5,8	6,0	6,9
<b>2</b>	48 hpi	6,0	6,8	9,2	7,5	5,0	8,0	6,5	7,8
<b>3</b>	72 hpi	5,8	6,0	9,8	7,0	5,0	9,0	7,0	8,2
<b>4</b>	96 hpi	6,5	8,0	10,5	8,2	5,8	9,4	6,8	8,0
<b>5</b>	120 hpi	6,5	8,0	10,8	8,2	5,8	9,6	7,8	8,4
<b>Promedio</b>		<b>5,0</b>	<b>7,9</b>	<b>6,9</b>	<b>7,7</b>	<b>5,9</b>	<b>6,9</b>	<b>9,7</b>	<b>7,3</b>

**Tabla 9.** Pesos obtenidos para lechones infectados y no infectados durante 5 días de observación.

Los datos obtenidos relacionados con la toma de las temperaturas se pueden observar en la tabla 10, donde se evidenció que los promedios oscilan entre 38.7 y 39.2°C para los lechones infectados mientras que los promedios de temperaturas para los lechones no infectados oscilaron entre 38.5 y 39.2°C. El rango de temperatura corporal de los lechones destetados reportado es entre 38,7 y 39,8°C con un promedio de 39,2°C. (199). (ver Tabla 10. y Fig. 29.).

(días)/h.p.i.		Temperatura corporal Infectados (°C)				Temperatura corporal No Infectados (°C)			
		1	2	3	4	1	2	3	4
0	0 hpi	38,5	38,7	39,2	39,2	38,6	39,6	39,4	38,6
1	24 hpi	38,7	39,2	39,4	39,4	38,3	38,0	38,7	38,4
2	48 hpi	38,6	39,1	38,9	39,4	37,7	39,1	38,8	39,0
3	72 hpi	38,7	38,8	39,3	38,9	39,1	38,6	38,6	38,8
4	96 hpi	38,0	39,1	38,9	39,1	38,3	40,2	39,5	39,2
5	120 hpi	39,4	39,6	39,2	39,5	39,2	39,6	39,8	39,4
<b>Promedio</b>		<b>38,7</b>	<b>39,1</b>	<b>39,1</b>	<b>39,2</b>	<b>38,5</b>	<b>39,2</b>	<b>39,1</b>	<b>38,9</b>

Tabla 10. Temperaturas obtenidas de los lechones infectados y no infectados durante 5 días de observación.

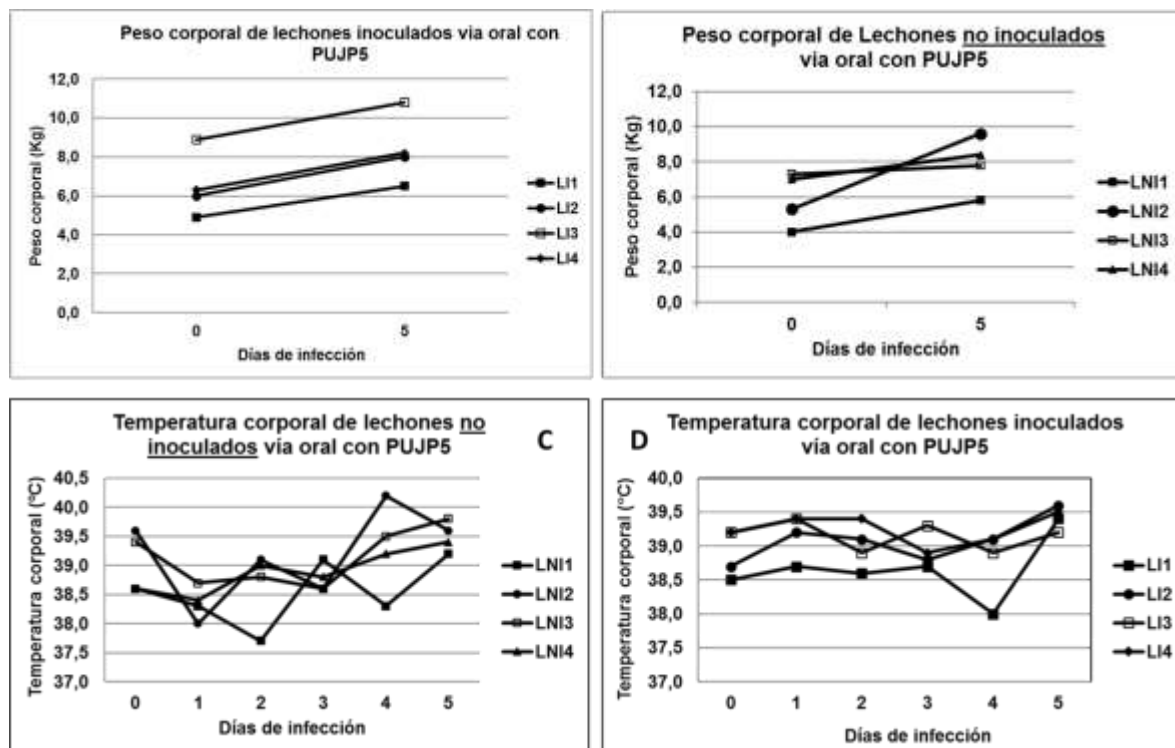


Fig. 29. Graficas correspondientes a los pesos corporales de lechones no inoculados e inoculados durante los 5 días del experimento (A-B), y temperaturas corporales de los mismos durante los días de duración del estudio (C-D).

En cuanto a las consistencia de las deposiciones de los lechones, se realizó un seguimiento a los 2 grupos experimentales cada 24 horas, donde se recolectaron las heces de cada corral y se implementó para los análisis de estas, según la escala reportada por Shaw y colaboradores en el 2005 (194), donde para las heces recolectadas del grupo LNI, se les



asignó un puntaje de cero (0) durante los 5 días (120 hpi) del estudio. En este caso, la consistencia presentada por las heces de los lechones fue normal, textura sólida, sin cambio aparente. Por otro lado, para el grupo de lechones infectados, se determinó un puntaje de dos (2), definido por Shaw y colaboradores como presencia de heces blandas y de color marrón desde el día 3 hasta la finalización del estudio (72 hpi a 120 hpi), corroborándose así la evidencia de una diarrea leve, también se evidenció la tinción de heces en la piel de los lechones infectados en la región perianal resultado no evidenciado en el grupo control. Este resultado evidencia el porqué los lechones no perdieron peso es normal que la generación de heces blandas que corresponden a este número en la escala de Shaw no presenten pérdida de peso;

## 6. Discusión

Desde la perspectiva clásica, los astrovirus han sido caracterizados por producir gastroenteritis limitada en mamíferos y aves (1). También han sido reportados en la inducción de patologías extra intestinales (nefritis y hepatitis aviar) en aves como pollos, pavos y patos (85). Además de éstas patologías, los astrovirus divergentes se han asociado a desórdenes neurológicos en diferentes especies como humanos, visones, ganado bovino y cerdos (53,54,57,58) Actualmente la patogénesis astroviral no ha sido aclarada debido a que no existe un modelo reproducible, confiable y disponible donde pueda ser estudiada.

A partir de lo anterior, el presente estudio representa una aproximación al conocimiento de algunos aspectos básicos de los efectos patogénicos que puede producir astrovirus como los signos tempranos y lesiones presentadas en tejidos intestinales y extra-intestinales. Asimismo, estos eventos fueron analizados usando como modelo de experimentación el cerdo convencional doméstico (*Sus scrofa domestica*), en condiciones similares a las utilizadas en granjas porcícolas. Los resultados y evidencias que se obtuvieron permiten determinar algunos principios del desarrollo de la enfermedad gracias a los ensayos histopatológicos y moleculares.

Es importante resaltar que el uso del cerdo como modelo experimental ha sido reconocido como un paradigma de estudio en enfermedades infecciosas en los últimos años. Esto es debido a su cercanía filogenética con los humanos en comparación con otros modelos como el murino o incluso algunas aves, donde se ha estudiado la patogénesis producida por el astrovirus (31,185).

La utilidad de los cerdos se ha demostrado por medio de varios estudios de enfermedades infecciosas sistémicas y enfermedades infecciosas de los tractos respiratorio y gastrointestinal. El cerdo ha sido utilizado ampliamente para el estudio de enfermedades infecciosas del tracto digestivo como las producidas por bacterias como *Cryptosporidium parvum*, *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli*, también en estudios con rotavirus y norovirus (31).

El cerdo convencional doméstico criado en óptimas condiciones sanitarias se ha utilizado frecuentemente como modelo experimental frente a los lechones gnotobióticos en muchos

estudios. Esto es debido a que el seguimiento médico-veterinario del *Sus scrofa domesticus* se hace de manera rigurosa previos a los trabajos experimentales, así entonces se puede considerar como un modelo adecuado para el estudio de enfermedades infecciosas, incluidas las virales. Esta es una de las ventajas del cerdo convencional doméstico frente al gnotobiótico.

Otra ventaja que tiene el cerdo común como es que puede ser considerado reproducible y de un bajo costo en comparación con otros como los modelos gnotobioticos o spf (32,34). Además, el uso de este modelo en condiciones naturales de reproducción y con una microbiota típica la cual ofrece variedad de bacterias tales como lactobacillus, eubacterium y fusobacterium entre otras que ayudan a mejorar los procesos de absorción de nutrientes, representa ventajas relevantes para observar respuestas similares a lo esperado en infecciones naturales (31) teniendo en cuenta todos los antecedentes mencionados es importante aclarar que el cerdo domestico convencional (*sus scrofa domesticus*) podría llegar a ser un modelo de investigación en enfermedades infecciosas que genera gran valor en sus resultados y estos podrían fácilmente extrapolarse a lo que sucede en humanos, obviamente guardando las distancias.

La patogénesis producida por astrovirus ha sido poco estudiada. En los hallazgos se ha demostrado que el principal órgano blanco es el intestino delgado en humanos, corderos, terneros y pavos. Además, que las células más susceptibles a la infección son los enterocitos maduros de la región apical de la vellosidad (1,200). Sin embargo, la poca cantidad de estudios debido a la falta de un modelo establecido in vivo no permite generalizar estos hallazgos.

Entre las principales manifestaciones de la patogénesis asociada a astrovirus se encontraron alteraciones histológicas producidas después de la infección viral en las que se incluyen cambios menores y no específicos del intestino delgado en humanos (168); enterocitos vacuolados, leve atrofia en las vellosidades transcurridas 38 horas post inoculación (hpi), desprendimiento de los enterocitos degenerados y su recuperación 120 hpi en los corderos (186). Por otro lado, se ha reportado en terneros la evidencia de lesiones leves en enterocitos que se transformaron de cuboides a planos, ligera atrofia de la vellosidad y engrosamiento de la misma en algunos casos (112). Por último, en pavos se ha visto la degeneración individual de enterocitos desde el segundo hasta el cuarto día post

infección y acortamiento de las vellosidades y formación de grupos esporádicos de enterocitos necróticos en el quinto día (18,22).

Todas las observaciones descritas anteriormente coinciden con los hallazgos histológicos obtenidos en este estudio. Asimismo, las células más susceptibles a la infección por PoAstV/PUJP5 fueron los enterocitos ubicados en la región apical de las vellosidades yeyunales de los lechones infectados que se desprendieron a las 120 hpi. Adicionalmente se evidenció una yeyunitis necrotizante, (Ver Fig. 13) y la infección (presencia de antígeno viral) en el íleon, colon y ganglio mesentérico. El estudio se planteó con una duración de 5 días o 120 hpi, debido a que en los antecedentes propuestos para verificar la patogénesis de astrovirus en el modelo del pavo y corderos Gnotobioticos se proponía que este tiempo era el adecuado para observar cambios en la morfología intestinal, pero además también verificar si PoAstV/PUJP5 manifestaba la viremia en estos lechones; objetivo que no se logró debido a que no fue confirmatoria la presencia de antígenos virales en los sueros de los lechones inoculados.

Por otro lado, se ha reportado que el rotavirus (importante en las gastroenteritis agudas) tiene la capacidad de migrar hacia otros lugares distintos a los enterocitos maduros como las placas de Peyer, ganglios mesentéricos y tejidos periféricos (191). Aunque la patogénesis de astrovirus no está dilucidada por completo y debido a las similitudes con rotavirus ya que ambos son virus entéricos es posible plantear que la presencia de PoAstV/PUJP5 en los ganglios mesentéricos de los lechones 2 y 4 podría haberse presentado por una migración hacia este órgano.

También se descubrió que ciertos agentes virales (como astrovirus y rotavirus) han sido encontrados en sangre periférica, lo que sugiere que pueden tener la capacidad de migrar de sus células blanco a otros lugares en el hospedero (89,201,202). Un ejemplo de esto fue reportado por Holtz y colaboradores (2011), quienes evidenciaron la presencia de astrovirus MLB2 en el plasma de niños con estados febriles; otro, fue el primer reporte en cerdos asociado a la presencia del virus en suero (202), donde se evidencia mayor divergencia en cuanto al linaje 5 del astrovirus porcino.

Entre los humanos, además, se ha presentado una condición atípica como inmunosupresiones de los pacientes o particularidades de las cepas virales (89,201–205). En donde los hospederos que generalmente presentaban una condición de inmunosupresión eran más susceptibles a la infección por astrovirus, como el caso de un paciente con agamaglobulinemia ligada al cromosoma X en el que se se encontraron partículas astrovirales en su cerebro (53) y un reporte en el que se evidencio que astrovirus estaba presente en el tejido del SNC de dos mujeres con meningitis (56).

Estos antecedentes nos llevaron a pensar si con la cepa PUJP5, aislada a partir de otro porcino en Colombia, era posible encontrar signos de RNAemia y antigenemia en el modelo evaluado para vincularlo como parte del proceso fisiopatológico asociado a este agente viral (6). Sin embargo, no fue posible detectar con claridad la presencia del genoma de astrovirus en el suero de los cerdos, ya que no se observaron las bandas esperadas de 417 pb a partir del ORF2 para ninguna de las muestras.

Es posible que estas bandas no se hayan podido detectar debido a que la cantidad de genoma viral circulante en sangre podría encontrarse en muy baja concentración, ausencia de migración a sangre periférica en el modelo evaluado o simplemente carencia de sangre infectada en la muestra. Otra de las razones se puede basar en que la cepa PUJP5 no presenta evidencias de ser un astrovirus divergente como lo fue el caso del astrovirus MLB2 encontrado en niños (89). Sin embargo, estas conclusiones quedan sometidas a estudios *ad hoc* posteriores.

Asimismo, la relación filogenética de PoAstV/PUJP5 con la cepa no divergente PoAstV, encontrada por Ulloa & Gutiérrez (2010) podría ayudar a catalogarlo como un astrovirus no divergente. Además, este estudio concluyó que el segmento codificante para las espículas virales tiene una alta similitud con los segmentos reportados por astrovirus de humanos. De hecho, este fue el primer estudio donde se propuso indagar si PoAstV/PUJP5 podría encontrarse en órganos extra-intestinales como parte de su proceso de patogénesis.

Retomando la ausencia de las bandas de 417 pb en las muestras de suero, el tiempo de evaluación (día 5) pudo ser un factor determinante. No hay claridad sobre la dinámica de migración de astrovirus a sistema circulatorio, por tanto no es conocido si al día 5 postinfección el virus puede llegar a sangre. En el caso de los rotavirus, son capaces de llegar a generar la viremia entre las 24 y 96 h.p.i. (206), lo anterior contrasta con lo obtenido en el estudio ya que durante este tiempo no se observaron bandas que determinaran la presencia del genoma viral, sugiriendo así que PoAstV/PUJP5 no migra a la vía sanguínea.

Además de las pruebas que se realizaron por PCR, también se realizaron ELISAs para determinar la presencia del virus en sangre. Los resultados de estas pruebas muestran que no hubo diferencias entre el grupo infectado y el grupo control. Por lo tanto, tampoco fue posible detectar el antígeno viral circulante en el suero de los lechones. Reforzando la idea que PoAstV/PUJP5 no genera viremia, esta hipótesis se ve reforzada debido a que los anticuerpos con los que se realizaron los análisis son Ac. Policlonales, los cuales podrían estar reconociendo otro tipo de epitopes que no correspondan a PoAstV/PUJP5 sino a proteínas celulares y esto podría generar un falso positivo, como lo que se observa en los resultados para el ensayo ELISA indirecto, es interesante recalcar que esta técnica no ofrece la especificidad que requieren estos tipos de ensayos como si lo proporciona un ELISA de captura, el inconveniente aquí radica en la obtención de un anticuerpo de captura específico, el cual no está diseñado aún para este ensayo.

Astrovirus no se detectó en sitios extra-intestinales distintos a yeyuno, colon e íleon, excepto el antígeno en ganglio mesentérico. La presencia del antígeno de la cápside de PoAstV/PUJP5 fue incipiente en este último, la detección específica fue determinada específicamente en el citoplasma de células en los lechones infectados (LI) N° 3 y N° 4. Esto podría deberse a la presentación de antígenos en el hospedero, ya que este ganglio es muy cercano al intestino delgado y es la primera glándula donde se efectúan las rutas de presentación antigénica por vía de vasos linfáticos. Sin embargo, son requeridos más estudios para corroborar si PoAstV/PUJP5 tiene un tropismo o simplemente un tránsito en este órgano, para determinar si realmente este órgano podría ser un tropismo alternativo de astrovirus. Se deben buscar proteínas estructurales como no estructurales e indicios de replicación viral asociada al citoplasma de las células que conforman el ganglio.

Es importante resaltar que es la primera vez que se reporta la presencia del virus en el ganglio mesentérico. La incipiente presencia del antígeno de la cápside de PoAstV/PUJP5 en este órgano en los dos lechones (LI3 y LI4) podría sugerir una ruta de migración hacia la vía sanguínea y de ahí a otros órganos, como en el caso de los astrovirus divergentes (23,53,54,57,58). Sin embargo, aún no hay datos concluyentes de la replicación viral a pesar de que estudios han demostrado que virus entéricos, como rotavirus y astrovirus, han estado presentes en otros órganos como el corazón (207), hígado, pulmones, bazo, riñones, timo, vejiga (206) o incluso en el cerebro (53,56).

No se conoce todavía el mecanismo por el cual astrovirus produce diarrea. El cambio más característico se da en la morfología epitelial del intestino, pero esta no es la causa principal (1). En este estudio se concluyó que hay desprendimiento de enterocitos apicales (Fig. 13) y aparición de diarrea leve con una consistencia blanda y color marrón en los lechones infectados desde el día tres hasta el día cinco. Este hallazgo correlaciona con lo reportado en terneros gnotobióticos y pollos (22).

En el procedimiento realizado por RT-PCR se demostró la presencia del genoma viral de la cepa de PoAstV/PUJP5 en las muestras de materia fecal de los lechones inoculados con el virus, ya que se reportaron varias bandas específicas de 417 pb (Fig. 14). Esta cantidad de nucleótidos disminuyó a 398 pb después de la purificación y secuenciación de las bandas. La purificación y posterior secuenciación de la banda recolectada de la muestra de materia fecal recuperada en el día 4 permitió confirmar la presencia de la cepa de PoAstV/PUJP5. Se eligió esta muestra a partir de análisis bioinformáticos que evidenciaron una identidad del 95%. La proporción de esta identidad sugiere que este segmento extraído de las heces de lechones infectados se conserva casi igual que la cepa obtenida originalmente, por lo que se demuestra que esta cepa corresponde a PoAstV/PUJP5 la misma que fue aislada por Ulloa y colaboradores en el 2010 (6), aunque el porcentaje obtenido podría generar dudas entre lo reportado en el año 2010 y lo que se aisló en el 2015 es importante resaltar que los virus RNA poseen una alta tasa de mutación lo cual es parte de su naturaleza para adaptarse a varias situaciones, como la adaptación a cultivo celular, entre otras, tal vez esta

adaptación fue la que generó esta clase de mutaciones, sin embargo dados los análisis bioinformáticos se puede decir que ambas secuencias corresponden a la misma cepa.

La alta identidad se obtuvo a partir de que solo se presentaron 19 eventos de cambios de bases purínicas y pirimídicas interpretándose estos como mutaciones no sinónimas, con relación a los análisis de transiciones y tranversiones entre la secuencia reportada en el *Gene bank* (6) y la obtenida en este estudio denominada (PI/4dpi/7). A partir de la traducción de los nucleótidos de cada secuencia se obtuvieron dos péptidos de 132 a.a cada uno, los cuales solo presentaron 5 aminoácidos diferentes entre ellos; a estos péptidos se les realizaron algunos análisis de modificaciones postraduccionales *in silico* incluidos en la página [www.Expasy.org](http://www.Expasy.org) (Fig. 19-225-26.). En los análisis de SUMOilación, manosilación, N-glicosilación y O-glicosilación se descubrió que los péptidos eran similares, pues se presentaron pocas alteraciones que dejaran ver que alguna de las secuencias fuera susceptible a estos cambios postraduccionales en la secuencia amino-acídica sugiriendo que el cambio de los nucleótidos no afecta el producto final. Interpretándose que la funcionalidad de ambos péptidos es similar, corroborándose lo esperado, que la secuencia obtenida se comportase igual a la secuencia reportada.

Debido a los cambios encontrados se podría inferir que el marco abierto de lectura no se ve afectado por el cambio del nucleótido donde se evidenció la sustitución. (121,124). Además, se conoce que la eficiencia de las RNA polimerasas de los virus no es tan alta debido a que no tiene capacidad correctora, a diferencia de las DNA polimerasas de las células en algunos casos, lo que lleva a mayores tasas de mutación al replicar el genoma viral. Por lo tanto, una de las causas de las mutaciones de los virus RNA para adaptarse al entorno es asegurar su existencia (208).

Se presentaron bandas cercanas a los 417 pb en las muestras correspondientes a los días tres y cinco. De igual manera fueron secuenciadas obteniéndose como resultado una similitud con PoAstV/PUJP5, aunque en menor porcentaje de identidad. Esto pudo deberse a la presencia de RNAsas que hubieran tenido contacto con el RNA y lo llevaran a su degradación parcial, de lo que se generaría un fragmento menor al esperado. Aún más si la



secuencia estaba deteriorada se pudo haber afectado en el proceso de amplificación, aún cuando los primers estuvieran anillados a los sitios correctos; análisis bioinformáticos con la herramienta [www.clustal-WOmega.com](http://www.clustal-WOmega.com) asegura que los primers descritos por Indik y colaboradores en el 2006 diseñados para amplificar el segmento de 417 pb que está en la región conservada ubicada al extremo 5' del ORF2 de los astrovirus porcinos se anillan a la secuencia publicada por Ulloa y colaboradores en el 2010 asegurando así que las bandas vistas en el gel pertenecen al genoma de PoAstV/PUJP5

En los días uno y dos post infección no hubo detección del genoma viral esto se puede correlacionar con reportes previos en humanos, gatos y corderos gnotobióticos, en los que se indica que la eliminación viral en las heces inicia entre el segundo y tercer día después de la exposición al virus; lo cual concuerda con los resultados obtenidos.

Con respecto a los parámetros físicos de los resultados, se observó que la consistencia de las heces de los cerdos infectados según la escala propuesta por Shaw y colaboradores en 1995 fue similar a la de pollos (18) y corderos gnotobióticos (15,22): textura blanda, color marrón, por lo que se deduce una asociación a diarrea leve.

Así mismo, se evidenció un desprendimiento de los enterocitos a partir de los tejidos evaluados el día cinco, lo que podría ser comparado con efectos sistémicos o celulares involucrados cuando la diarrea aguda se produce en humanos (1). De manera importante, no se observó ninguna sintomatología relacionada con enfermedad gastrointestinal como náuseas, vómito, fiebre, pérdida de peso o depresión, lo que podría sugerir que la infección del PoAstV/PUJP5 no tiene una manifestación severa de la enfermedad, al menos en el modelo evaluado. A diferencia de lo que se evidencia cuando la infección es por rotavirus.

En cuanto a la alteración de la permeabilidad intestinal, estudios *in vitro* con células epiteliales intestinales diferenciadas (CaCo-2) mostraron que la infección por HAsV provoca una alteración de la función de barrera. Posiblemente esto se debe a la reorganización de los filamentos de actina y la redistribución de la ocludina, pues ambos

elementos son importantes para la formación de las uniones intercelulares (21). Estas observaciones realizadas *in vitro* se ven reforzadas por estudios realizados en pavos, en los que la infección por TAstV-1-2 también provoca una reorganización de los filamentos de actina (176). Además, se evidencia que la replicación vírica no es necesaria para la alteración de la permeabilidad puesto que las proteínas de la cápside por sí solas son capaces de inducir tal alteración. Esto sugiere que la cápside de AstV podría actuar como una enterotoxina (21).

Teniendo en cuenta los puntos anteriores, en este estudio se pudo determinar que los eventos patogénicos tempranos asociados a la infección por astrovirus porcino en el modelo experimental evaluado mostraron un comportamiento esperado a lo descrito en la literatura con respecto a la patogénesis de las enfermedades gastrointestinales virales. Así mismo, estos hallazgos sugieren que PoAstV/PUJP5 no corresponde a una cepa atípica, por otro lado no se evidenciaron diferencias ni mutaciones relevantes en comparación con la cepa originalmente aislada a partir de cerdos en Colombia. También se deduce de la ausencia del virus en tejidos distintos a los intestinales al igual que la ausencia del RNA y el antígeno viral en suero de los lechones. En términos generales, se evidenció una infección dirigida al intestino delgado con una manifestación leve de la enfermedad.

Este trabajo resalta la importancia del uso del cerdo convencional como modelo de estudio y aporta un gran avance al conocimiento de la ciencia para entender el mecanismo utilizado por este virus para inducir la enfermedad en este organismo. La validez de este modelo se fundamenta en su cercanía filogenética con el humano y la dificultad de estudiar este mecanismo en él por implicaciones bioéticas. De este modo, es posible acercarse al conocimiento de la infección de astrovirus humanos como también en cepas no atípicas.

## **7. Conclusiones y perspectivas**

De acuerdo con los resultados obtenidos es posible catalogar al cerdo convencional doméstico como modelo potencial para estudiar la patogénesis producida por astrovirus.

La cepa PoAstV/PUJP5 tiene un tropismo intestinal y es capaz de producir daños manifestados por el desarreglo de las vellosidades y destrucción de los enterocitos.

Si bien la infección experimental con PoAstV/PUJP5 produjo un daño en el epitelio intestinal, este solo ocasionó al día 5to una diarrea leve lo que apoya la idea previamente reportada por Moser et al., 2007, que la infección no es suficiente para que se produzca la diarrea acuosa.

La presencia incipiente de antígenos virales de PoAstV/PUJP5 en el ganglio linfático sugiere la ruta de migración desde el tejido intestinal hacia otros sitios corporales, como ha sido reportado en otros estudios para los rotavirus, norovirus, poliovirus, etc.

Se sugiere un estudio adicional con un término mayor de tiempo para evaluar la migración del virus a otros tejidos.

Con base en la detección realizada de la cepa PoAstV/PUJP5 en el tejido intestinal del 75% de los cerdos domésticos valorados en el estudio, se establece la posibilidad de realizar otros estudios sobre el comportamiento patogénico de los astrovirus y con ellos confirmar si el cerdo doméstico es un modelo útil para estos propósitos.

Se sugiere confirmar si la presencia del antígeno viral en ganglio mesentérico se debe simplemente a eventos inmunológicos (presentación de antígenos) o por el contrario si ejerce una ruta alternativa de migración.

## 8. Bibliografía

1. Méndez E, Murillo A, Velázquez R, Burnham A, Arias CF. Astrovirus Research [Internet]. Schultz-Cherry S, editor. New York: Springer; 2013. 19-46 p. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-4735-1>
2. Holtz LR, Bauer IK, Rajendran P, Kang G, Wang D. Astrovirus MLB1 is not associated with diarrhea in a cohort of Indian children. *PLoS One*. 2011;6(12):1–3.
3. Guix S. La proteína asP1a/4 y el ciclo biológico de astrovirus: aplicación en epidemiología molecular. 2003;1–233. Available from: <http://diposit.ub.edu/dspace/handle/2445/42381>
4. Blasco JBB. Epidemiología de las gastroenteritis Agudas Víricas. 2007. 99-114 p.
5. Jeong HS, Jeong A, Cheon D-S. Epidemiology of astrovirus infection in children. *Korean J Pediatr* [Internet]. 2012;55(3):77–82. Available from: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=22474461&retmode=ref&cmd=prlinks\papers3://publication/doi/10.3345/kjp.2012.55.3.77>
6. Ulloa JC, Gutiérrez MF. Genomic analysis of two ORF2 segments of new porcine astrovirus isolates and their close relationship with human astroviruses. *Can J Microbiol*. 2010;56(7):569–77.
7. Madeley CR, Cosgrove BP. Letter: 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. *Lancet* (London, England) [Internet]. 1975 Sep 6 [cited 2015 Sep 18];2(7932):451–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/51251>
8. Appleton H, Higgins PG. Letter: Viruses and gastroenteritis in infants. *Lancet* (London, England) [Internet]. 1975 Jun 7 [cited 2015 Sep 21];1(7919):1297. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/48925>
9. Nazer H, Rice S, Walker-Smith JA. Clinical associations of stool astrovirus in childhood. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* [Internet]. 1982 Jan [cited 2016 Feb 12];1(4):555–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6821117>
10. Ashley CR, Caul EO, Paver WK. Astrovirus-associated gastroenteritis in children. *J Clin Pathol*. 1978;31(10):939–43.
11. Snyder JD, Merson MH. The magnitude of the global problem of acute diarrhoeal disease: a review of active surveillance data. *Bull World Health Organ* [Internet]. 1982 Jan [cited 2015 Dec 17];60(4):605–13. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2536091&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
12. Traoré O, Belliot G, Mollat C, Piloquet H, Chamoux C, Laveran H, et al. RT-PCR identification and typing of astroviruses and Norwalk-like viruses in hospitalized patients with gastroenteritis: evidence of nosocomial infections. *J Clin Virol* [Internet]. 2000 Sep [cited 2016 Jan 27];17(3):151–8. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386653200000883>
13. Unicomb LE, Banu NN, Azim T, Islam A, Bardhan PK, Faruque AS, et al. Astrovirus

- infection in association with acute, persistent and nosocomial diarrhea in Bangladesh. *Pediatr Infect Dis J* [Internet]. 1998 Jul [cited 2016 Jan 27];17(7):611–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9686727>
14. OMS | Informe de la OMS señala que los niños menores de 5 años representan casi un tercio de las muertes por enfermedades de transmisión alimentaria. World Health Organization; 2013 [cited 2016 Mar 14]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/foodborne-disease-estimates/es/>
  15. Snodgrass DR, Angus KW, Gray EW, Menzies JD, Paul G. Pathogenesis of diarrhoea caused by astrovirus infections in lambs. *Arch Virol* [Internet]. 1979 Sep [cited 2016 Jan 26];60(3-4):217–26. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF01317493>
  16. Woode GN, Bridger JC. Isolation of small viruses resembling astroviruses and caliciviruses from acute enteritis of calves. *J Med Microbiol* [Internet]. Microbiology Society; 1978 Nov 1 [cited 2016 Apr 1];11(4):441–52. Available from: <https://bases.javeriana.edu.co/f5-w-687474703a2f2f6a6d6d2e6d6963726f62696f6c6f677972657365617263682e6f726767/content/journal/jmm/10.1099/00222615-11-4-441#tab2>
  17. Woode GN, Reed DE, Runnels PL, Herrig MA, Hill HT. Studies with an unclassified virus isolated from diarrheic calves. *Vet Microbiol* [Internet]. 1982 Jul [cited 2016 Jan 26];7(3):221–40. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378113582900360>
  18. Koci MD, Moser L a, Kelley L a, Larsen D, Brown CC, Schultz-Cherry S. Astrovirus induces diarrhea in the absence of inflammation and cell death. *J Virol*. 2003;77(21):11798–808.
  19. Phillips AD, Rice SJ W-SJ. Astrovirus within small intestinal mucosa. *Gut*. 1982;23:A923–4.
  20. Clayburgh DR, Shen L, Turner JR. A porous defense: the leaky epithelial barrier in intestinal disease. *Lab Invest* [Internet]. 2004 Mar 19 [cited 2016 Feb 16];84(3):282–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/labinvest.3700050>
  21. Moser L a, Carter M, Schultz-Cherry S. Astrovirus increases epithelial barrier permeability independently of viral replication. *J Virol*. 2007;81(21):11937–45.
  22. Moser L a, Schultz-Cherry S. Pathogenesis of astrovirus infection. *Viral Immunol*. 2005;18(1):4–10.
  23. Blomström A-L, Ley C, Jacobson M. Astrovirus as a possible cause of congenital tremor type All in piglets? *Acta Vet Scand* [Internet]. 2014;56(1):1–6. Available from: <http://www.actavetscand.com/content/56/1/82>
  24. Luo Z, Roi S, Dastor M, Gallice E, Laurin MA, L'Homme Y. Multiple novel and prevalent astroviruses in pigs. *Vet Microbiol*. 2011;149(3-4):316–23.
  25. Shimizu M, Shirai J, Narita M, Yamane T. Cytopathic astrovirus isolated from porcine acute gastroenteritis in an established cell line derived from porcine embryonic kidney. *J Clin Microbiol*. 1990;28(2):201–6.
  26. Yang X, Yuan L. Neonatal Gnotobiotic Pig Models for Studying Viral Pathogenesis, Immune Responses, and for Vaccine Evaluation. *Br J Virol*. 2014;1(3):87–91.

27. Jung K, Wang Q, Kim Y, Scheuer K, Zhang Z, Shen Q, et al. The Effects of Simvastatin or Interferon- $\alpha$  on Infectivity of Human Norovirus Using a Gnotobiotic Pig Model for the Study of Antivirals. Guan Y, editor. PLoS One [Internet]. 2012 Jul 23 [cited 2016 Jun 18];7(7):e41619. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0041619>
28. Jung K, Hu H, Eyerly B, Lu Z, Chepngeno J, Saif LJ. Pathogenicity of 2 Porcine Deltacoronavirus Strains in Gnotobiotic Pigs. Emerg Infect Dis [Internet]. 2015 Apr [cited 2016 Jun 18];21(4):650–4. Available from: [http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/21/4/14-1859\\_article.htm](http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/21/4/14-1859_article.htm)
29. Laycock G, Sait L, Inman C, Lewis M, Smidt H, van Diemen P, et al. A defined intestinal colonization microbiota for gnotobiotic pigs. Vet Immunol Immunopathol [Internet]. 2012 Oct 15 [cited 2016 Jun 18];149(3-4):216–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22868203>
30. Zhang Q, Widmer G, Tzipori S. A pig model of the human gastrointestinal tract. Gut Microbes [Internet]. 2013 [cited 2016 Jun 18];4(3):193–200. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23549377>
31. Meurens F, Summerfield A, Nauwynck H, Saif L, Gerds V. The pig: A model for human infectious diseases. Trends Microbiol. 2012;20(1):50–7.
32. Rovira A, Balasch M, Segalés J, García L, Plana-Durán J, Rosell C, et al. Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. J Virol [Internet]. 2002 Apr [cited 2016 Mar 7];76(7):3232–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=136035&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
33. Weingartl HM, Albrecht RA, Lager KM, Babiuk S, Marszal P, Neufeld J, et al. Experimental infection of pigs with the human 1918 pandemic influenza virus. J Virol [Internet]. 2009 May [cited 2016 Mar 1];83(9):4287–96. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2668479&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
34. Everett H, Salguero FJ, Graham SP, Haines F, Johns H, Clifford D, et al. Characterisation of experimental infections of domestic pigs with genotype 2.1 and 3.3 isolates of classical swine fever virus. Vet Microbiol [Internet]. 2010 Apr 21 [cited 2016 Mar 7];142(1-2):26–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19875252>
35. Kurtz JB, Lee TW. Human astrovirus serotypes. Lancet (London, England) [Internet]. 1984 Dec 15 [cited 2015 Sep 21];2(8416):1405. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6150404>
36. Mendez-Toss M, Griffin DD, Calva J, Contreras JF, Puerto FI, Mota F, et al. Prevalence and Genetic Diversity of Human Astroviruses in Mexican Children with Symptomatic and Asymptomatic Infections. J Clin Microbiol [Internet]. 2004 Jan 8 [cited 2016 Mar 3];42(1):151–7. Available from: <http://jcm.asm.org/content/42/1/151.long>
37. Koci MD, Seal BS, Schultz-Cherry S. Molecular characterization of an avian astrovirus. J Virol [Internet]. 2000 Jul [cited 2016 Jan 27];74(13):6173–7. Available from:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=112117&tool=pmcentrez&endertype=abstract>
38. Guix S, Bosch a, Pintó RM. Human astrovirus diagnosis and typing: current and future prospects. *Lett Appl Microbiol* [Internet]. 2005;41(2):103–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16033504>
  39. Lee TW, Kurtz JB. Serial propagation of astrovirus in tissue culture with the aid of trypsin. *J Gen Virol*. 1981;57(2):421–4.
  40. Lee TW, Kurtz JB. Prevalence of human astrovirus serotypes in the Oxford region 1976-92, with evidence for two new serotypes. *Epidemiol Infect*. 1994;112(1):187–93.
  41. Herrmann JE, Hudson RW, Perron-Henry DM, Kurtz JB, Blacklow NR. Antigenic characterization of cell-cultivated astrovirus serotypes and development of astrovirus-specific monoclonal antibodies. *J Infect Dis* [Internet]. 1988 Jul [cited 2015 Sep 21];158(1):182–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3134491>
  42. Herrmann JE, Nowak NA, Perron-Henry DM, Hudson RW, Cubitt WD, Blacklow NR. Diagnosis of astrovirus gastroenteritis by antigen detection with monoclonal antibodies. *J Infect Dis* [Internet]. 1990 Feb [cited 2015 Sep 21];161(2):226–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2105359>
  43. Belliot G, Laveran H, Monroe SS. Outbreak of gastroenteritis in military recruits associated with serotype 3 astrovirus infection. *J Med Virol* [Internet]. 1997 Feb [cited 2015 Sep 21];51(2):101–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9021539>
  44. Fuentes C. Caracterización Genética y Funcional de la Proteína nsP1a / 4 de Astrovirus Humano. Universidad de Barcelona; 2013.
  45. Herrmann JE, Taylor DN, Echeverria P, Blacklow NR. Astroviruses as a cause of gastroenteritis in children. *N Engl J Med* [Internet]. 1991 Jun 20 [cited 2015 Sep 21];324(25):1757–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1645459>
  46. Utagawa ET, Nishizawa S, Sekine S, Hayashi Y, Ishihara Y, Oishi I, et al. Astrovirus as a cause of gastroenteritis in Japan. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1994 Aug [cited 2015 Sep 21];32(8):1841–5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=263888&tool=pmcentrez&endertype=abstract>
  47. Jiang B, Monroe SS, Koonin E V, Stine SE, Glass RI. RNA sequence of astrovirus: distinctive genomic organization and a putative retrovirus-like ribosomal frameshifting signal that directs the viral replicase synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(22):10539–43.
  48. Geigenmüller U, Ginzton NH, Matsui SM. Construction of a genome-length cDNA clone for human astrovirus serotype 1 and synthesis of infectious RNA transcripts. *J Virol*. 1997;71(2):1713–7.
  49. Noel JS, Lee TW, Kurtz JB, Glass RI, Monroe SS. Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. *J Clin Microbiol*. 1995;33(4):797–801.
  50. Jonassen TØ, Monceyron C, Lee TW, Kurtz JB, Grinde B. Detection of all serotypes of human astrovirus by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* [Internet]. 1995 Apr [cited 2016 Jan 26];52(3):327–34. Available from:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016609349400168G>

51. Matsui M, Ushijima H, Hachiya M, Kakizawa J, Wen LY, Oseto M, et al. Determination of serotypes of astroviruses by reverse transcription-polymerase chain reaction and homologies of the types by the sequencing of Japanese isolates. *Microbiol Immunol.* 1998;42(8):539–47.
52. Mitchell DK, Monroe SS, Jiang X, Matson DO, Glass RI, Pickering LK. Virologic Features of an Astrovirus Diarrhea Outbreak in a Day Care Center Revealed by Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *J Infect Dis* [Internet]. 1995 Dec 1 [cited 2016 Jan 26];172(6):1437–44. Available from: <http://jid.oxfordjournals.org/content/172/6/1437.short>
53. Quan PL, Wagner T a., Briese T, Torgerson TR, Hornig M, Tashmukhamedova A, et al. Astrovirus encephalitis in boy with X-linked agammaglobulinemia. *Emerg Infect Dis.* 2010;16(6):918–25.
54. Blomström AL, Widén F, Hammer AS, Belák S, Berg M. Detection of a novel astrovirus in brain tissue of mink suffering from shaking mink syndrome by use of viral metagenomics. *J Clin Microbiol.* 2010;48(12):4392–6.
55. Brnić D, Jemeršić L, Keros T, Prpić J. High prevalence and genetic heterogeneity of porcine astroviruses in domestic pigs. *Vet J* [Internet]. 2014;202(2):390–2. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1090023314003360>
56. Cordey S, Vu DL, Schibler M, L??Huillier AG, Brito F, Docquier M, et al. Astrovirus MLB2, a new gastroenteric virus associated with meningitis and disseminated infection. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(5):846–53.
57. Li L, Diab S, McGraw S, Barr B, Traslavina R, Higgins R, et al. Divergent astrovirus associated with neurologic disease in cattle. *Emerg Infect Dis.* 2013;19(9):1385–92.
58. Bouzalas IG, Wuthrich D, Walland J, Drogemuller C, Zurbriggen a., Vandeveld M, et al. Neurotropic Astrovirus in Cattle with Nonsuppurative Encephalitis in Europe. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2014;52(9):3318–24. Available from: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.01195-14>
59. Seuberlich T, Wüthrich D, Selimovic-Hamza S, Drögemüller C, Oevermann A, Bruggmann R, et al. Identification of a second encephalitis-associated astrovirus in cattle. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 2016;5(1):e5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4735058&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
60. Schlottau K, Schulze C, Bilk S, Hanke D, Höper D, Beer M, et al. Detection of a Novel Bovine Astrovirus in a Cow with Encephalitis. *Transbound Emerg Dis* [Internet]. 2016 Jun [cited 2016 Jun 16];63(3):253–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/tbed.12493>
61. Monroe SS, Stine SE, Gorelkin L, Herrmann JE, Blacklow NR, Glass RI. Temporal synthesis of proteins and RNAs during human astrovirus infection of cultured cells. *J Virol* [Internet]. 1991 Feb [cited 2016 Jan 27];65(2):641–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=239802&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
62. Monroe SS, Jiang B, Stine SE, Koopmans M, Glass RI. Subgenomic RNA sequence of human astrovirus supports classification of Astroviridae as a new family of RNA



- viruses. *J Virol* [Internet]. 1993 Jun [cited 2016 Jan 27];67(6):3611–4. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=237710&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
63. Lewis TL, Greenberg HB, Herrmann JE, Smith LS, Matsui SM. Analysis of astrovirus serotype 1 RNA, identification of the viral RNA-dependent RNA polymerase motif, and expression of a viral structural protein. *J Virol* [Internet]. 1994;68(1):77–83. Available from: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=8254779&retmode=ref&cmd=prlinks\papers3://publication/uuid/5CA2B8D8-EA13-4DAF-976C-533E38327E>
  64. Willcocks MM, Brown TD, Madeley CR, Carter MJ. The complete sequence of a human astrovirus. *J Gen Virol* [Internet]. 1994;75 ( Pt 7)(1994):1785–8. Available from: <http://www.hubmed.org/display.cgi?uids=8021608>
  65. Kriston S, Willcocks MM, Carter MJ, Cubitt WD. Seroprevalence of astrovirus types 1 and 6 in London, determined using recombinant virus antigen. *Epidemiol Infect* [Internet]. 1996;117(1):159–64. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2271669&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  66. Cubitt WD, Mitchell DK, Carter MJ, Willcocks MM, Holzel H. Application of electronmicroscopy, enzyme immunoassay, and RT-PCR to monitor an outbreak of astrovirus type 1 in a paediatric bone marrow transplant unit. *J Med Virol* [Internet]. 1999 Mar [cited 2016 Jan 27];57(3):313–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10022805>
  67. Al-Mutairy B, Walter JE, Pothen A, Mitchell DK. Genome prediction of putative genome-linked viral protein (VPg) of astroviruses. *Virus Genes* [Internet]. 2005 Aug [cited 2016 Mar 14];31(1):21–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15965605>
  68. Firth AE, Atkins JF. Candidates in Astroviruses, Seadornaviruses, Cytorhabdoviruses and Coronaviruses for +1 frame overlapping genes accessed by leaky scanning. *Virology* [Internet]. 2010;7:17. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2832772&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  69. Méndez E, Aguirre-Crespo G, Zavala G, Arias CF. Association of the astrovirus structural protein VP90 with membranes plays a role in virus morphogenesis. *J Virol* [Internet]. 2007 Oct [cited 2016 Jan 27];81(19):10649–58. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2045458&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  70. López J. Evaluación del efecto inhibitorio ejercido por bacterias probióticas sobre la infección in vitro por astrovirus humano Evaluación del efecto inhibitorio ejercido por bacterias probióticas sobre la infección in vitro por astrovirus humano. Pontificia universidad javeriana; 2013.
  71. Marczinke B, Bloys AJ, Brown TD, Willcocks MM, Carter MJ, Brierley I. The human astrovirus RNA-dependent RNA polymerase coding region is expressed by ribosomal frameshifting. *J Virol* [Internet]. 1994 Sep [cited 2016 Jan 27];68(9):5588–95. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=236959&tool=pmcentrez&>

endertype=abstract

72. Wang QH, Kakizawa J, Wen LY, Shimizu M, Nishio O, Fang ZY, et al. Genetic analysis of the Capsid region of astroviruses. *J Med Virol*. 2001;64(3):245–55.
73. Méndez-Toss M, Romero-Guido P, Munguía ME, Méndez E, Arias CF. Molecular analysis of a serotype 8 human astrovirus genome. *J Gen Virol* [Internet]. 2000;81(Pt 12):2891–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11086120>
74. Geigenmüller U, Ginzton NH, Matsui SM. Studies on intracellular processing of the capsid protein of human astrovirus serotype 1 in infected cells. *J Gen Virol* [Internet]. 2002 Jul [cited 2016 Jan 27];83(Pt 7):1691–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12075088>
75. Krishna NK. Identification of structural domains involved in astrovirus capsid biology. *Viral Immunol* [Internet]. 2005 Jan [cited 2016 Jan 26];18(1):17–26. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1393289&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
76. Caballero S. Replicación y morfogénesis de astrovirus. 2004;202.
77. Risco C, Carrascosa JL, Pedregosa AM, Humphrey CD, Sánchez-Fauquier A. Ultrastructure of human astrovirus serotype 2. *J Gen Virol* [Internet]. 1995 Aug [cited 2016 Jan 27];76 ( Pt 8):2075–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7636490>
78. Matsui SM, Kiang D, Ginzton N, Chew T G-GU. Molecular biology of astrovirus selected highlights. In: gastroenteritis viruses. wiley chichester: novartis found symp; 2001. p. p 219–36.
79. Dryden KA, Tihova M, Nowotny N, Matsui SM, Mendez E, Yeager M. Immature and mature human astrovirus: structure, conformational changes, and similarities to hepatitis E virus. *J Mol Biol* [Internet]. 2012 Oct 5 [cited 2015 Dec 15];422(5):650–8. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283612005025>
80. Wilhelmi de Cal I. Gastroenteritis Aguda En Niños Del Área Sanitaria Ix De Madrid: Análisis Microbiológico, Clínico Y Epidemiológico De La Patología Asociada Al Virus. 2001. 144 p.
81. Salim O, Clarke IN, Lambden PR. Functional analysis of the 5'??? genomic sequence of a bovine norovirus. *PLoS One*. 2008;3(5):3–10.
82. Bass DM, Upadhyayula U. Characterization of human serotype 1 astrovirus-neutralizing epitopes. *J Virol* [Internet]. 1997 Nov [cited 2016 Jan 29];71(11):8666–71. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=192330&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
83. Bosch A, Pintó RM, Guix S. Human astroviruses. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2014 Oct [cited 2015 Nov 18];27(4):1048–74. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4187635&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
84. Atkins A, Wellehan JFX, Childress AL, Archer LL, Fraser WA, Citino SB. Characterization of an outbreak of astroviral diarrhea in a group of cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *Vet Microbiol* [Internet]. 2009 Apr 14 [cited 2016 Jan 26];136(1-2):160–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19171442>

85. Imada T, Yamaguchi S, Mase M, Tsukamoto K, Kubo M, Morooka A. Avian nephritis virus (ANV) as a new member of the family Astroviridae and construction of infectious ANV cDNA. *J Virol* [Internet]. 2000 Sep [cited 2016 Jan 27];74(18):8487–93. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=116360&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
86. Mendez E, Fernandez-Luna T, Lopez S, Mendez-Toss M, Arias CF. Proteolytic Processing of a Serotype 8 Human Astrovirus ORF2 Polyprotein. *J Virol* [Internet]. 2002 Aug 15 [cited 2016 Mar 14];76(16):7996–8002. Available from: <http://jvi.asm.org/content/76/16/7996>
87. Midthun K, Greenberg HB, Kurtz JB, Gary GW, Lin FY, Kapikian AZ. Characterization and seroepidemiology of a type 5 astrovirus associated with an outbreak of gastroenteritis in Marin County, California. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1993 Apr [cited 2016 Feb 14];31(4):955–62. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=263593&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
88. Holtz LR, Bauer IK, Jiang H, Belshe R, Freiden P, Schultz-Cherry SL, et al. Seroepidemiology of Astrovirus MLB1. *Clin Vaccine Immunol* [Internet]. 2014;21(6):908–11. Available from: <http://cdli.asm.org/cgi/doi/10.1128/CVI.00100-14>
89. Holtz LR, Wylie KM, Sodergren E, Jiang Y, Franz CJ, Weinstock GM, et al. Astrovirus MLB2 viremia in febrile child. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2011 Nov [cited 2016 Jan 27];17(11):2050–2. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3310569&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
90. Brown JR, Morfopoulou S, Hubb J, Emmett W a., Ip W, Shah D, et al. Astrovirus VA1/HMO-C: An Increasingly Recognized Neurotropic Pathogen in Immunocompromised Patients. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2015;60:881–8. Available from: <http://cid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/cid/ciu940>
91. Snodgrass DR, Gray EW. Detection and transmission of 30 nm virus particles (astroviruses) in faeces of lambs with diarrhoea. *Arch Virol* [Internet]. 1977 Dec [cited 2016 Jan 26];55(4):287–91. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF01315050>
92. Reuter G, Pankovics P, Delwart E, Boros Á. Identification of a novel astrovirus in domestic sheep in Hungary. *Arch Virol* [Internet]. 2012 Feb [cited 2016 Jan 27];157(2):323–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3518301&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
93. Woode GN, Bridger JC. Isolation of small viruses resembling astroviruses and caliciviruses from acute enteritis of calves. *J Med Microbiol* [Internet]. Microbiology Society; 1978 Nov 1 [cited 2016 Jan 26];11(4):441–52. Available from: <http://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/00222615-11-4-441>
94. Bridger JC. Detection by electron microscopy of caliciviruses, astroviruses and rotavirus-like particles in the faeces of piglets with diarrhoea. *Vet Rec* [Internet]. 1980 Dec 6 [cited 2016 Jan 26];107(23):532–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6258286>

95. Mor SK, Chander Y, Marthaler D, Patnayak DP, Goyal SM. Detection and molecular characterization of Porcine astrovirus strains associated with swine diarrhea. *J Vet Diagnostic Investig.* 2012;24(6):1064–7.
96. Williams FP. Astrovirus-like, coronavirus-like, and parvovirus-like particles detected in the diarrheal stools of beagle pups. *Arch Virol* [Internet]. 1980 Sep [cited 2016 Jan 26];66(3):215–26. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF01314735>
97. Hoshino Y, Zimmer JF, Moise NS, Scott FW. Detection of astroviruses in feces of a cat with diarrhea. *Arch Virol* [Internet]. 1981 Dec [cited 2016 Jan 26];70(4):373–6. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF01320252>
98. Tzipori S, Angus KW, Campbell I, Sherwood D. Diarrhea in young red deer associated with infection with *Cryptosporidium*. *J Infect Dis* [Internet]. 1981;144(2):170–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7276628>
99. Kjeldsberg E, Hem A. Detection of astroviruses in gut contents of nude and normal mice. Brief report. *Arch Virol* [Internet]. 1985 Jan [cited 2016 Jan 26];84(1-2):135–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3921007>
100. Zhu HC, Chu DKW, Liu W, Dong BQ, Zhang SY, Zhang JX, et al. Detection of diverse astroviruses from bats in China. *J Gen Virol.* 2009;90(4):883–7.
101. Chu DKW, Peiris JSM, Chen H, Guan Y, Poon LLM. Genomic characterizations of bat coronaviruses (1A, 1B and HKU8) and evidence for co-infections in *Miniopterus* bats. *J Gen Virol.* 2008;89(5):1282–7.
102. Rivera R, Nollens HH, Venn-Watson S, Gulland FMD, Wellehan JFX. Characterization of phylogenetically diverse astroviruses of marine mammals. *J Gen Virol* [Internet]. 2010;91(Pt 1):166–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19759240>
103. Chu DKW, Chin AWH, Smith GJ, Chan K-H, Guan Y, Peiris JSM, et al. Detection of novel astroviruses in urban brown rats and previously known astroviruses in humans. *J Gen Virol* [Internet]. 2010 Oct [cited 2016 Jan 26];91(Pt 10):2457–62. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3052596&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
104. Smits SL, van Leeuwen M, Kuiken T, Hammer AS, Simon JH, Osterhaus ADME. Identification and characterization of deer astroviruses. *J Gen Virol* [Internet]. 2010;91(Pt 11):2719–22. Available from: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=20668117&retmode=ref&cmd=prlinks\papers3://publication/doi/10.1099/vir.0.024067-0>
105. Martella V, Bányai K, Matthijnssens J, Buonavoglia C, Ciarlet M. Zoonotic aspects of rotaviruses. *Vet Microbiol* [Internet]. 2010 Jan 27 [cited 2016 Jan 27];140(3-4):246–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19781872>
106. McNulty MS, Curran WL, McFerran JB. Detection of astroviruses in turkey faeces by direct electron microscopy. *Vet Rec* [Internet]. 1980 Jun 28 [cited 2016 Jan 27];106(26):561. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6776680>
107. Pantin-Jackwood MJ, Strother KO, Mundt E, Zsak L, Day JM, Spackman E. Molecular characterization of avian astroviruses. *Arch Virol* [Internet]. 2011 Feb [cited 2016 Jan 27];156(2):235–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21069394>

108. Gough RE, Collins MS, Borland E, Keymer LF. Astrovirus-like particles associated with hepatitis in ducklings. *Vet Rec* [Internet]. 1984 Mar 17 [cited 2016 Jan 27];114(11):279. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6424324>
109. Cattoli G, Toffan A, De Battisti C, Salviato A, Terregino C, Capua I. Astroviruses found in the intestinal contents of guinea fowl suffering from enteritis. *Vet Rec* [Internet]. 2005 Feb 12 [cited 2016 Jan 27];156(7):220. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15747669>
110. Zhao W, Zhu AL, Yuan CL, Yu Y, Zhu CX, Lan DL, et al. Detection of astrovirus infection in pigeons (*Columbia livia*) during an outbreak of diarrhoea. *Avian Pathol* [Internet]. Taylor & Francis Group; 2011 Aug 4 [cited 2016 Jan 27];40(4):361–5. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03079457.2011.587792>
111. Fuentes C, Bosch a., Pinto RM, Guix S. Identification of Human Astrovirus Genome-Linked Protein (VPg) Essential for Virus Infectivity. *J Virol*. 2012;86(18):10070–8.
112. Woode GN, Pohlenz JF, Kelso Gourley NE, Fagerland JA. Astrovirus and breda virus infections of dome cell epithelium of bovine ileum. *J Clin Microbiol*. 1984;19(5):623–30.
113. Willcocks MM, Ashton N, Kurtz JB, Cubitt WD, Carter MJ. Cell culture adaptation of astrovirus involves a deletion. *J Virol*. 1994;68(9):6057–8.
114. Bass DM, Qiu S. Proteolytic Processing of the Astrovirus Capsid. *J Virol* [Internet]. 2000;74(4):1810–4. Available from: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.74.4.1810-1814.2000>
115. Belliot G, Laveran H, Monroe SS. Capsid protein composition of reference strains and wild isolates of human astroviruses. *Virus Res* [Internet]. 1997 May [cited 2015 Sep 21];49(1):49–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9178496>
116. Dalton RM, Pastrana EP, Sánchez-Fauquier A. Vaccinia virus recombinant expressing an 87-kilodalton polyprotein that is sufficient to form astrovirus-like particles. *J Virol* [Internet]. 2003 Aug [cited 2016 Mar 3];77(16):9094–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=167206&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
117. Sanchez-Fauquier A, Carrascosa AL, Carrascosa JL, Otero A, Glass RI, Lopez JA, et al. Characterization of a human astrovirus serotype 2 structural protein (VP26) that contains an epitope involved in virus neutralization. *Virology* [Internet]. 1994 Jun [cited 2016 Mar 3];201(2):312–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7514320>
118. Willcocks MM, Carter MJ, Laidler FR, Madeley CR. Growth and characterisation of human faecal astrovirus in a continuous cell line. *Arch Virol* [Internet]. 1990 Mar [cited 2016 Feb 15];113(1-2):73–81. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF01318354>
119. Donelli G, Superti F, Tinari A, Marziano ML. Mechanism of astrovirus entry into Graham 293 cells. *J Med Virol* [Internet]. 1992 Dec [cited 2016 Mar 14];38(4):271–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1474377>
120. Tange S, Zhou Y, Nagakui-Noguchi Y, Imai T, Nakanishi A. Initiation of human astrovirus type 1 infection was blocked by inhibitors of phosphoinositide 3-kinase.

- Viol J [Internet]. 2013;10(1):153. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3750554&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
121. C. A. Gibson, J. Chen, S. A. Monroe MRD. Expression and Processing of Nonstructural Proteins of the Human Astroviruses. *The Effects of Noise on Aquatic Life*. 1998. pp 387-391.
  122. Kiang D, Matsui SM. Proteolytic processing of a human astrovirus nonstructural protein. *J Gen Virol*. 2002;83(Pt 1):25–34.
  123. Mendez E, Salas-Ocampo MPE, Munguia ME, Arias CF. Protein Products of the Open Reading Frames Encoding Nonstructural Proteins of Human Astrovirus Serotype 8. *J Virol* [Internet]. 2003 Oct 13 [cited 2016 Mar 14];77(21):11378–84. Available from: <http://jvi.asm.org/content/77/21/11378>
  124. Denison MR. Seeking membranes: Positive-strand RNA virus replication complexes. *PLoS Biol*. 2008;6(10):2098–100.
  125. Guix S, Bosch A, Ribes E, Dora Martínez L, Pintó RM. Apoptosis in astrovirus-infected CaCo-2 cells. *Virology* [Internet]. 2004;319(2):249–61. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682203008298>
  126. Herbert TP, Brierley I, Brown TD. Identification of a protein linked to the genomic and subgenomic mRNAs of feline calicivirus and its role in translation. *J Gen Virol* [Internet]. 1997 May [cited 2016 Mar 14];78 ( Pt 5):1033–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9152420>
  127. Velázquez-Moctezuma R, Baños-Lara M del R, Acevedo Y, Méndez E. Alternative cell lines to improve the rescue of infectious human astrovirus from a cDNA clone. *J Virol Methods* [Internet]. 2012 Feb [cited 2016 Mar 14];179(2):295–302. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22115787>
  128. Elinos-Báez CM, Maldonado V, Meléndez-Zajgla J. Caspasas: Moléculas Inductoras de Apoptosis. *Gac Med Mex*. 2003;139(5):493–9.
  129. Méndez E, Salas-Ocampo E, Arias CF. Caspases mediate processing of the capsid precursor and cell release of human astroviruses. *J Virol* [Internet]. 2004;78(16):8601–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=479052&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  130. *Inmunología. Una ciencia activa 2.a edición* [Internet]. Universidad de Antioquia; 2009 [cited 2016 Jan 27]. 710 p. Available from: <https://books.google.com/books?id=2yIZdSTdjKcC&pgis=1>
  131. Banos-Lara M del R, Méndez E. Role of individual caspases induced by astrovirus on the processing of its structural protein and its release from the cell through a non-lytic mechanism. *Virology* [Internet]. 2010 Jun 5 [cited 2016 Jun 18];401(2):322–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20347468>
  132. Gaggero A, O’Ryan M, Noel JS, Glass RI, Monroe SS, Mamani N, et al. Prevalence of astrovirus infection among Chilean children with acute gastroenteritis. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1998 Dec [cited 2016 Jan 27];36(12):3691–3. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=105266&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

133. Guerrant RL, Hughes JM, Lima NL, Crane J. Diarrhea in developed and developing countries: magnitude, special settings, and etiologies. *Rev Infect Dis* [Internet]. 1990 Jan [cited 2016 Jan 26];12 Suppl 1:S41–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2406855>
134. Warren KS. Tropical medicine or tropical health: the Heath Clark lectures, 1988. *Rev Infect Dis* [Internet]. 1988 Jan [cited 2016 Jan 26];12(1):142–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2405466>
135. Bern C GR. Impact of diarrheal disease worldwide. In: Dekker M, editor. *Viral infections of the gastrointestinal tract*. 2 ed. New York; 1994. p. pp. 1–26.
136. Pinto RM, Abad FX, Gajardo R, Bosch A. Detection of infectious astroviruses in water. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 1996 May [cited 2016 Feb 14];62(5):1811–3. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1388862&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
137. Oishi I, Yamazaki K, Kimoto T, Minekawa Y, Utagawa E, Yamazaki S, et al. A large outbreak of acute gastroenteritis associated with astrovirus among students and teachers in Osaka, Japan. *J Infect Dis* [Internet]. 1994 Aug [cited 2016 Feb 14];170(2):439–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8035033>
138. Abad FX, Villena C, Guix S, Caballero S, Pintó RM, Bosch A. Potential role of fomites in the vehicular transmission of human astroviruses. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2001 Sep [cited 2016 Feb 14];67(9):3904–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=93108&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
139. Gallimore CI, Taylor C, Gennery AR, Cant AJ, Galloway A, Lewis D, et al. Use of a heminested reverse transcriptase PCR assay for detection of astrovirus in environmental swabs from an outbreak of gastroenteritis in a pediatric primary immunodeficiency unit. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2005 Aug [cited 2016 Feb 14];43(8):3890–4. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1234003&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
140. Gutiérrez MF, Matiz A, Carlos J, Mónica U, Mi A. Astrovirus ( HAsTV ) como agente causal de diarrea en niños Colombianos : Siete años de estudio. 2005;3(3):18–24.
141. Kirkwood CD, Clark R, Bogdanovic-Sakran N, Bishop RF. A 5-year study of the prevalence and genetic diversity of human caliciviruses associated with sporadic cases of acute gastroenteritis in young children admitted to hospital in Melbourne, Australia (1998-2002). *J Med Virol* [Internet]. 2005 Sep [cited 2016 Feb 12];77(1):96–101. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16032716>
142. Wunderli W, Meerbach A, Guengoer T, Berger C, Greiner O, Caduff R, et al. Astrovirus infection in hospitalized infants with severe combined immunodeficiency after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *PLoS One*. 2011;6(11).
143. Glass RI, Noel J, Mitchell D, Herrmann JE, Blacklow NR, Pickering LK, et al. The changing epidemiology of astrovirus-associated gastroenteritis: a review. *Arch Virol Suppl* [Internet]. 1996 Jan [cited 2016 Jan 28];12:287–300. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9015126>
144. Lewis DC, Lightfoot NF, Cubitt WD, Wilson SA. Outbreaks of astrovirus type 1 and

- rotavirus gastroenteritis in a geriatric in-patient population. *J Hosp Infect* [Internet]. 1989 Jul [cited 2016 Jan 28];14(1):9–14. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/019567018990128X>
145. Utagawa ET, Nishizawa S, Sekine S, Hayashi Y, Ishihara Y, Oishi I, et al. Astrovirus as a cause of gastroenteritis in Japan. *J Clin Microbiol*. 1994;32(8):1841–5.
  146. Gray JJ, Wreghitt TG, Cubitt WD, Elliot PR. An outbreak of gastroenteritis in a home for the elderly associated with astrovirus type 1 and human calicivirus. *J Med Virol* [Internet]. 1987 Dec [cited 2016 Jan 28];23(4):377–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2826678>
  147. Pager CT, Steele AD. Astrovirus-associated diarrhea in South African adults. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2002 Dec 1 [cited 2016 Jan 28];35(11):1452–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12439820>
  148. Mitchell DK, Matson DO, Jiang X, Berke T, Monroe SS, Carter MJ, et al. Molecular epidemiology of childhood astrovirus infection in child care centers. *J Infect Dis* [Internet]. 1999 Aug [cited 2016 Jan 28];180(2):514–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10395872>
  149. Wood DJ, David TJ, Chrystie IL, Totterdell B. Chronic enteric virus infection in two T-cell immunodeficient children. *J Med Virol* [Internet]. 1988 Apr [cited 2015 Dec 3];24(4):435–44. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jmv.1890240410>
  150. Björkholm M, Celsing F, Runarsson G, Waldenström J. Successful intravenous immunoglobulin therapy for severe and persistent astrovirus gastroenteritis after fludarabine treatment in a patient with Waldenström’s macroglobulinemia. *Int J Hematol* [Internet]. 1995 Aug [cited 2016 Jan 28];62(2):117–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8590772>
  151. Coppo P, Scieux C, Ferchal F, Clauvel J-P, Lassoued K. Astrovirus enteritis in a chronic lymphocytic leukemia patient treated with fludarabine monophosphate. *Ann Hematol* [Internet]. 2000 Jan 18 [cited 2016 Jan 28];79(1):43–5. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s002770050008>
  152. Cunliffe NA, Dove W, Gondwe JS, Thindwa BDM, Greensill J, Holmes JL, et al. Detection and characterisation of human astroviruses in children with acute gastroenteritis in Blantyre, Malawi. *J Med Virol* [Internet]. 2002 Aug [cited 2016 Jan 28];67(4):563–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12116005>
  153. Liste MB, Natera I, Suarez JA, Pujol FH, Liprandi F, Ludert JE. Enteric virus infections and diarrhea in healthy and human immunodeficiency virus-infected children. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2000 Aug [cited 2016 Jan 28];38(8):2873–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=87134&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  154. Shastri S, Doane AM, Gonzales J, Upadhyayula U, Bass DM. Prevalence of astroviruses in a children’s hospital. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1998 Sep [cited 2016 Jan 27];36(9):2571–4. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=105164&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  155. Bon F, Fascia P, Dauvergne M, Tenenbaum D, Planson H, Petion AM, et al. Prevalence of group A rotavirus, human calicivirus, astrovirus, and adenovirus type 40 and 41 infections among children with acute gastroenteritis in Dijon, France. *J Clin*



- Microbiol [Internet]. 1999 Sep [cited 2016 Jan 27];37(9):3055–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=85457&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
156. Guix S, Caballero S, Villena C, Bartolomé R, Latorre C, Rabella N, et al. Molecular epidemiology of astrovirus infection in Barcelona, Spain. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2002 Jan [cited 2016 Jan 27];40(1):133–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=120088&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  157. Foley B, O'Mahony J, Morgan SM, Hill C, Morgan JG. Detection of sporadic cases of Norwalk-like virus (NLV) and astrovirus infection in a single Irish hospital from 1996 to 1998. *J Clin Virol* [Internet]. 2000 Aug [cited 2016 Jan 28];17(2):109–17. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386653200000834>
  158. Mustafa H, Palombo EA, Bishop RF. Improved sensitivity of astrovirus-specific RT-PCR following culture of stool samples in CaCo-2 cells. *J Clin Virol* [Internet]. 1998 Aug 20 [cited 2016 Jan 28];11(2):103–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9785211>
  159. Svenungsson B, Lagergren a, Ekwall E, Evengård B, Hedlund KO, Kärnell a, et al. Enteropathogens in adult patients with diarrhea and healthy control subjects: a 1-year prospective study in a Swedish clinic for infectious diseases. *Clin Infect Dis*. 2000;30(5):770–8.
  160. Walter JE, Mitchell DK. Role of astroviruses in childhood diarrhea. *Curr Opin Pediatr* [Internet]. 2000 Jun [cited 2016 Jan 28];12(3):275–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10836166>
  161. Maldonado Y, Cantwell M, Old M, Hill D, Sanchez ML, Logan L, et al. Population-based prevalence of symptomatic and asymptomatic astrovirus infection in rural Mayan infants. *J Infect Dis* [Internet]. 1998;178(2):334–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9697712>
  162. Wilhelmi I, Roman E, Sánchez-Fauquier a. Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect*. 2003;9(4):247–62.
  163. Pang XL, Vesikari T. Human astrovirus-associated gastroenteritis in children under 2 years of age followed prospectively during a rotavirus vaccine trial. *Acta Paediatr* [Internet]. 1999 May [cited 2016 Jan 27];88(5):532–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10426176>
  164. De Grazia S, Medici MC, Pinto P, Moschidou P, Tummolo F, Calderaro A, et al. Genetic heterogeneity and recombination in human type 2 astroviruses. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2012 Nov [cited 2016 Jan 27];50(11):3760–4. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3486218&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  165. Walter JE, Briggs J, Guerrero ML, Matson DO, Pickering LK, Ruiz-Palacios G, et al. Molecular characterization of a novel recombinant strain of human astrovirus associated with gastroenteritis in children. *Arch Virol* [Internet]. 2001 Dec 1 [cited 2016 Jan 27];146(12):2357–67. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s007050170008>
  166. Wolfaardt M, Kiulia NM, Mwenda JM, Taylor MB. Evidence of a recombinant wild-type human astrovirus strain from a Kenyan child with gastroenteritis. *J Clin Microbiol*

- [Internet]. 2011 Feb [cited 2016 Jan 27];49(2):728–31. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3043485&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
167. Ram RY. Prevalencia de astrovirus en pacientes con enfermedad diarreica aguda del Hospital San Rafael de Tunja ( Colombia ). 2016;(January).
  168. Sebire NJ, Malone M, Shah N, Anderson G, Gaspar HB, Cubitt WD. Pathology of astrovirus associated diarrhoea in a paediatric bone marrow transplant recipient. *J Clin Pathol* [Internet]. 2004 Sep [cited 2016 Feb 12];57(9):1001–3. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1770412&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  169. Storr J, Rice S, Phillips AD, Price E, Walker-Smith JA. Clinical associations of Norwalk-like virus in the stools of children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* [Internet]. 1986 Jan [cited 2016 Feb 12];5(4):576–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3016227>
  170. Snodgrass DR, Ferguson A, Allan F, Angus KW, Mitchell B. Small intestinal morphology and epithelial cell kinetics in lamb rotavirus infections. *Gastroenterology* [Internet]. 1979 Mar [cited 2016 Jan 26];76(3):477–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/218864>
  171. Gray EW, Angus KW, Snodgrass DR. Ultrastructure of the small intestine in astrovirus-infected lambs. *J Gen Virol*. 1980;49(1):71–82.
  172. Hodges K, Gill R. Infectious diarrhea: Cellular and molecular mechanisms. *Gut Microbes* [Internet]. 2010 Jan [cited 2016 Feb 12];1(1):4–21. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3035144&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  173. Riverón Corteguera RL. Fisiopatología de la diarrea aguda. *Rev Cubana Pediatr* [Internet]. 1999, Editorial Ciencias Médicas; 1999 [cited 2016 Jan 27];71(2):86–115. Available from: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75311999000200005&lng=es&nrm=iso&tIng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75311999000200005&lng=es&nrm=iso&tIng=es)
  174. Bustos W. M, Weisstaub N. G, Araya Q. M. Deficiencia de disacaridasas en niños bolivianos con diarrea persistente. *Rev Chil pediatría* [Internet]. Sociedad Chilena de Pediatría; 2003 Jul [cited 2016 Jan 27];74(4):398–404. Available from: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0370-41062003000400007&lng=es&nrm=iso&tIng=es](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0370-41062003000400007&lng=es&nrm=iso&tIng=es)
  175. Thouvenelle, Haynes, Reynolds. Astrovirus Infection in Hatchling Turkeys: Histologic, Morphometric, and Ultrastructural Findings on JSTOR [Internet]. 1995 [cited 2016 Feb 12]. p. 328–36. Available from: [http://www.jstor.org/stable/1591875?seq=1#page\\_scan\\_tab\\_contents](http://www.jstor.org/stable/1591875?seq=1#page_scan_tab_contents)
  176. Nighot PK, Moeser A, Ali R a., Bliklager AT, Koci MD. Astrovirus infection induces sodium malabsorption and redistributes sodium hydrogen exchanger expression. *Virology* [Internet]. Elsevier Inc.; 2010;401(2):146–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2010.02.004>
  177. Ulloa JC, Guzmán F, Guerrero C a., Gutiérrez MF. Identification of two immunoreactive peptides useful for the detection of porcine astrovirus. *Intervirology*. 2012;55(4):311–7.

178. Jonassen CM, Jonassen T, Saif YM, Snodgrass DR, Ushijima H, Shimizu M, et al. Comparison of capsid sequences from human and animal astroviruses. *J Gen Virol.* 2001;82(5):1061–7.
179. Geyer A, Steele AD, Peenze I, Lecatsas G. Astrovirus-like particles, adenoviruses and rotaviruses associated with diarrhoea in piglets. *J S Afr Vet Assoc* [Internet]. 1994 Dec [cited 2016 May 6];65(4):164–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7602569>
180. Indik S, Valíček L, Šmíd B, Dvořáková H, Rodák L. Isolation and partial characterization of a novel porcine astrovirus. *Vet Microbiol.* 2006;117(2-4):276–83.
181. Reuter G, Pankovics P, Boros Á. Identification of a novel astrovirus in a domestic pig in Hungary. *Arch Virol.* 2011;156(1):125–8.
182. Reuter G, Nemes C, Boros A, Kapusinszky B, Delwart E, Pankovics P. Astrovirus in wild boars (*Sus scrofa*) in Hungary. *Arch Virol* [Internet]. 2012 Jun [cited 2016 Jan 27];157(6):1143–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3506007&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
183. Lee MH, Jeoung HY, Park HR, Lim JA, Song JY, An DJ. Phylogenetic analysis of porcine astrovirus in domestic pigs and wild boars in South Korea. *Virus Genes.* 2013;46(1):175–81.
184. Strain E, Kelley L a, Schultz-Cherry S, Muse S V, Koci MD. Genomic analysis of closely related astroviruses. *J Virol.* 2008;82(10):5099–103.
185. Koci MD, Schultz-Cherry S. Avian astroviruses. *Avian Pathol.* 2002;31(3):213–27.
186. Herring a. J, Gray EW, Snodgrass DR. Purification and characterization of ovine astrovirus. *J Gen Virol.* 1981;53(1):47–55.
187. Diseases of Swine [Internet]. John Wiley & Sons; 2013 [cited 2016 Feb 15]. 1153 p. Available from: <https://books.google.com/books?id=IPOsWhQgNPkC&pgis=1>
188. Fukai K, Morioka K, Yoshida K. An Experimental Infection in Pigs Using a Foot-and-Mouth Disease Virus Isolated from the 2010 Epidemic in Japan. 2011;
189. Isaacson R, Isaacson R, Kim HB. The intestinal microbiome of the pig The intestinal microbiome of the pig. 2012;(August 2016).
190. Poskin A, Van Campe W, Mostin L, Cay B, De Regge N. Experimental Schmallenberg virus infection of pigs. Vol. 170, *Veterinary Microbiology.* 2014.
191. Mossel EC, Ramig RF. A lymphatic mechanism of rotavirus extraintestinal spread in the neonatal mouse. *J Virol* [Internet]. 2003 Nov [cited 2016 May 21];77(22):12352–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14581572>
192. Groenen M a, Archibald a L, Uenishi H, Tuggle CK, Takeuchi Y, Rothschild MF, et al. Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. *Nature* [Internet]. Nature Publishing Group; 2012;491(7424):393–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23151582>
193. FASS. Guide for the care and use of agricultural animals in research and teaching. 2010. 169 p.
194. Shaw RD, Hempson SJ, Mackow ER. Rotavirus diarrhea is caused by nonreplicating

- viral particles. *J Virol* [Internet]. 1995;69(10):5946–50. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=189489&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
195. Gibson-Corley KN, Olivier AK, Meyerholz DK. Principles for Valid Histopathologic Scoring in Research. *Vet Pathol* [Internet]. 2013 Nov 1 [cited 2016 May 6];50(6):1007–15. Available from: <http://vet.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/0300985813485099>
  196. Hohloch C, Reiner G, Bronnert B, Willems H, Reinacher M. Detection of porcine circovirus type 2 and its association with PMWS in wild boars and domestic pigs in Germany: a histopathological, immunohistochemical and molecular biological study. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift* [Internet]. 2015 Jan [cited 2016 Apr 17];128(5-6):200–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26054225>
  197. Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *CSH Protoc* [Internet]. 2008 Jan [cited 2016 Jan 7];2008:pdb.prot4986. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21356829>
  198. Rio DC, Ares M, Hannon GJ, Nilsen TW. Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harb Protoc* [Internet]. 2010 Jun [cited 2016 Apr 17];2010(6):pdb.prot5439. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20516177>
  199. Robertshaw D, Reece W. Temperature regulation and the thermal environment. *Dukes' Physiol Domest Anim* [Internet]. 2004 [cited 2016 May 6]; Available from: <http://www.cabdirect.org/abstracts/20043175304.html>
  200. Meliopoulos V a., Kayali G, Burnham A, Oshansky CM, Thomas PG, Gray GC, et al. Detection of antibodies against Turkey astrovirus in. *PLoS One*. 2014;9(5).
  201. Blutt SE, Matson DO, Crawford SE, Staat MA, Azimi P, Bennett BL, et al. Rotavirus antigenemia in children is associated with viremia. *PLoS Med* [Internet]. 2007 Apr [cited 2016 May 16];4(4):e121. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1852122&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  202. Brnić D, Prpić J, Keros T, Roić B, Starešina V, Jemeršić L. Porcine astrovirus viremia and high genetic variability in pigs on large holdings in Croatia. *Infect Genet Evol*. 2013;14(1):258–64.
  203. Hemming M, Huhti L, Räsänen S, Salminen M, Vesikari T. Rotavirus antigenemia in children is associated with more severe clinical manifestations of acute gastroenteritis. *Pediatr Infect Dis J* [Internet]. 2014 Apr [cited 2016 May 16];33(4):366–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24136370>
  204. Moon S, Wang Y, Dennehy P, Simonsen KA, Zhang J, Jiang B. Antigenemia, RNAemia, and innate immunity in children with acute rotavirus diarrhea. *FEMS Immunol Med Microbiol* [Internet]. 2012 Apr [cited 2016 May 16];64(3):382–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22176605>
  205. Takanashi S, Hashira S, Matsunaga T, Yoshida A, Shiota T, Tung PG, et al. Detection, genetic characterization, and quantification of norovirus RNA from sera of children with gastroenteritis. *J Clin Virol* [Internet]. 2009 Feb [cited 2016 May 16];44(2):161–3. Available from:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386653208004022>

206. Crawford SE, Patel DG, Cheng E, Berkova Z, Hyser JM, Ciarlet M, et al. Rotavirus Viremia and Extraintestinal Viral Infection in the Neonatal Rat Model. *J Virol* [Internet]. American Society for Microbiology; 2006 May 15 [cited 2016 Jun 25];80(10):4820–32. Available from: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.80.10.4820-4832.2006>
207. Nakano I, Taniguchi K, Ishibashi-Ueda H, Maeno Y, Yamamoto N, Yui A, et al. Sudden death from systemic rotavirus infection and detection of nonstructural rotavirus proteins. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2011 Dec [cited 2016 May 6];49(12):4382–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21998424>
208. Stern A, Bianco S, Yeh M Te, Wright C, Butcher K, Tang C, et al. Costs and benefits of mutational robustness in RNA viruses. *Cell Rep* [Internet]. 2014 Aug 21 [cited 2016 May 17];8(4):1026–36. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4142091&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

## 9. Anexos

### Inmunohistoquímica

El protocolo de inmunohistoquímica se desarrolló de manera convencional utilizando los protocolos generales con algunas modificaciones. Los tejidos embebidos en secciones parafinados fueron desparafinados en xileno y rehidratados con concentraciones descendientes de etanol iniciando en una concentración del 100% y finalizando en 50%, al final se lavaron con agua destilada. después la peroxidasa endógena se bloqueó con peróxido de hidrogeno al 3% en agua destilada por 15 minutos a temperatura ambiente; inmediatamente se bloquearon los sitios de union no especificos con proteinasa K al 0.001% (Invitrogen Cat# 25530-015) – Tris Buffered Saline (TBST) por 2 minutos a temperatura ambiente. Despues de lavar 2 veces con TBST, se adicionó el anticuerpo polyclonal anti- PoAstV/PUJP5 en una concentración de 1:200 dejándolo incubar por un tiempo de 1 hora en cámara húmeda a 37°C. Luego se hacen dos lavados con TBST, y se adiciona el conjugado cabra anti-conejo IgG (Dako™/Cat# P0448) en una concentración de 1:100 este anticuerpo se deja por una hora a temperatura ambiente, finalmente el conjugado se remueve y las células se lavan con TBST tres veces y se adicionan 3 gotas de biotynylated link antibody - LSAB™2Kits, Universal (DAKO Cat# K0690) en las laminillas por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se hacen dos lavados con TBST y se adiciona Biotinylated Link and Streptavidin-HRP (DAKO K0609 LSAB®2 System-HRP/Cat# K0609) siguiendo las instrucciones del fabricante, una vez más se hacen dos lavados con TBST y se ponen 4 gotas de DAKO AEC (3-Amino-9-ethylcarbazole/Cat# K3969) en las laminillas por un tiempo de 5 minutos en la oscuridad. Cuando se evidencie la aparición de la tinción color café citoplasmatica celular, se realizan de nuevo 2 lavados con TBST y tres lavados únicamente con agua destilada. Finalmente se adiciona la hematoxilina de Meyer como tinción de contraste por 5 minutos y el exceso se remueve con agua, después se sumergen las láminas en una solución de rinse amoniacal y se observan al microscopio.

### Extracción RNA.

Tanto a las muestras de sangre como las de suero y las muestras de heces se les realizó el aislamiento del RNA mediante el uso de Trizol LS(*Invitrogen*), la solución de fenol e isotiocianato de guanidina genera un RNA limpio y es el método a elegir cuando se trabaja con tejidos que contienen altos niveles de RNAasas endógenas, propias en las sangre y las

heces, para realizar este procedimiento se tomaran 400 uL de muestra (sangre, suero o heces), dispuestos en tubos de 1,5 mL a los cuales se les adicionará 500 uL de trizol LS (*Invitrogen*) 300 uL de agua tratada DEPC (dietilpicrocarbamato) para aumentar la fase acuosa y facilitar la separación de las fases, después de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente (15 a 30°C), lo que permite la disociación completa de los complejos proteicos, pasado este tiempo se adiciona 200 uL de cloroformo por cada mililitro de trizol LS utilizado, dar vórtex de 10 a 15 segundos y se dejan en incubación por 5 minutos a temperatura ambiente; posterior a esto se centrifugan a una velocidad de 16000 xg por 5 minutos a 4°C, luego se toma la fase menos densa que es donde se encuentra el RNA y se transfiere a un nuevo tubo de 1,5 mL este se precipita con Isopropanol (alcohol isopropilico) frío en una relación de volumen 1/1, luego se incuban las muestras a -20°C por 30 min y después de esto se centrifugan a 16000 xg por 25 min removiendose el sobrenadante y lavándose el pellet de RNA con etanol frio al 75%, dar vórtex y de nuevo se centrifugan a 16000 xg por 25 min este procedimiento se hace por duplicado, al final se deja secar el etanol y se resuspende el pellet de RNA en 25 uL de agua tratada DEPC libre de RNAasas mediante este proceso se inactivan las endo y exonucleasas; para finalizar se incubaba a 55°C durante 10 minutos en thermomixer La cuantificación de las muestras se realiza por el método espectrofotométrico en el nanodrop 2000 (Thermo) empleando 1 µl de muestra y haciendo la medición de cada una por duplicado.

### **Transcripción Reversa.**

La síntesis del cDNA se realizó usando el kit Superscript III (*Invitrogen*). El procedimiento consistio en poner el RNA obtenido de la extracción realizada anteriormente y que fue resuspendido en 25µl de agua ultrapura tratada DEPC. Por cada vial de RNA se tomaran 5µl de templado y se mezclaron con 2µl de primer reverso AST665R (180), se denaturaron por 7 minutos a 95°C en el termociclador C1000 Thermal Cycler (BIO-RAD) y luego se puso en contacto en un baño de hielo durante 5 minutos. Para la síntesis de la cadena complementaria, a estos 7 µl se le adicionan 13 µl de mezcla (master mix) que contiene ( Buffer 5x-RT, DTT dNTPs, agua ultra pura tratada DEPC) y la enzima Super Script III Reverse Transcriptase (RT) (*Invitrogen*), se lleva de nuevo al termociclador C1000 Thermal Cycler (BIO-RAD) durante 60 minutos a 50°C etapa de unión del primer y síntesis, y luego 15 minutos a 72°C que corresponden a la etapa de elongación. El cDNA que se obtiene se cuantifica por el método espectrofotométrico en el equipo Nanodrop 2000 (Thermo)

empleando 1 uL de cada muestra haciendo la medición de cada una por duplicado. Estos cDNA se almacenan a -20°C hasta su uso.

<b>Rx-RT</b>	
<b>Reactivos</b>	<b>Concentración</b>
Buffer 5X-RT	50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl <sub>2</sub>
DTT	5 mM
dNTP's	0,5 uM
Super Script III	3 U/uL
H <sub>2</sub> O tratada DEPC	6,7 uL para completar volumen 20 uL
Ast-665R	0,28 pM/uL
RNA Total	5 uL

Lista de reactivos y su concentración final en la reacción de transcripción reversa para obtener cDNAs de Astrovirus porcino cepa PoAstV-PUJ-P5.

## PCR

Para la determinación de la presencia o ausencia del segmento de 417 pb que está ubicado en el ORF-2 de PoAstV-PUJ-P5 en las muestras de; sangre, suero y heces fecales de los lechones del estudio, se realizará la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) convencional; Posterior a la cuantificación de cada cDNA, la concentración de cada muestra se estandarizará a 50 ng/uL de los cuales se tomaran 2 ul y se mezclaran con 23 uL de master mix que contiene (Buffer, MgCl<sub>2</sub>, primer forward o cebador directo AST248F, primer reverse o cebador reverso AST665R (180), dNTP's, agua ultra pura tratada DEPC) y la enzima platinum Taq Polymerase (*Ivitrogen*), el tubo que contiene la mezcla y el cDNA se lleva al termociclador C1000 Thermal Cycler (BIO-RAD) con el siguiente programa de termociclado que consiste en: Denaturación; 5 minutos a 95°C, 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, anillamiento, 30 segundos a 55°C, elongación y extensión, 30 segundos a 72°C y al final extensión por 7 minutos a 72°C.

<b>Rx-PCR</b>	
<b>Reactivos</b>	<b>Concentración</b>
Buffer 10X	20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl
MgCl <sub>2</sub>	1,25 mM



PF AST248F	0,4 uM
PR AST665R	0,4 uM
dNTP's	0,4 mM
H2O tratada DEPC	15,95 uL para completar volumen a 25 uL
Platinum Taq Polymerase	0,6 U Enzimáticas.
Cdna	2 uL

Lista de reactivos y su concentración final en la en la amplificación del segmento de 417 pb del ORF-2 por PCR convencional.

Todos los productos amplificados fueron dispuestos en un gel de agarosa al 1,5% que contenía 0.5 uL/mL de bromuro de etidio (agente intercalante del DNA) y se sometieron a una electroforesis de ácidos nucleicos en las siguientes condiciones de corrido, 60 minutos, 100 voltios, 80 mAmp; se utiliza un marcador de tamaño de 100 pb (*100 bp ladder invitrogen*) y por cada grupo de muestras procesadas bajo la técnica de PCR se utiliza un control positivo que consistía en tomar células ESK-4 infectadas con PoASTV-PUJP5, a las que se les extrae el RNA y se obtuvo el cDNA, y un control negativo que contenía todos los reactivos del master mix o mezcla de reacción a excepción del cDNA (material genético), en su lugar se adiciona agua ultra pura tratada DEPC que corresponde al volumen del cDNA que se agregará a los demás tubos de reacción.

### **Purificación de bandas productos de PCR**

La purificación de los productos de PCR se realizó siguiendo el protocolo de la enzima B-Agarasa (New England BioLabs) que consistió en:

Primer paso, digestión de la agarosa: para esto se equilibró el DNA contenido en la agarosa de bajo peso molecular, lavando el gel sólido con 2 volúmenes del buffer 1X B-Agarasa I en hielo por 30 min luego de esto se remueve el buffer remanente y se funde la agarosa por incubación a 65° C por 10 min, después se enfría a 42° C y se incuba la agarosa fundida con 1 unidad de B-Agarasa I a 42 ° C por 1 hora, a continuación el aislamiento del DNA.

El DNA es precipitado mientras los carbohidratos se encuentran en la solución, de la siguiente manera se ajusta la concentración de la sal de la  $\beta$ -Agarasa I tratando la solución para la precipitación del DNA con isopropanol (0.5 M NaCl, 0.3 M NaOAc, 2.5 M NH<sub>4</sub>OAc o

0.8 M LiCl), luego se enfria en hielo por 15 min, luego se centrifuga a 15.000 x g por 15 min para sedimentar cualquier carbohidrato restante que no se digiera, después se remueve el DNA-contenido en el sobrenadante, y se precipita con 2 volúmenes de isopropanol, después se mezcla, enfria y centrifuga a 15.000 x g por 15 min por último se removió el sobrenadante, se lava el pellet con IPA frio al 70% y se seca a °T amb. El pellet se resuspende en agua tratada DEPC.

### **Elisa Directo**

Con el fin de corroborar la capacidad infectiva de la cepa PoAstV-PUJP5 en células ESK-4 se tomó una placa de 96 pozos para ELISA donde se incubo el antígeno (obtenido anteriormente) en un volumen de 50 uL de muestra en cada pozo de la placa, con un tiempo de incubación a 37°C por tres horas y luego a 4°C por 16 horas. (Tiempo requerido para que se fijen los antígenos a la base de cada pozo). Posteriormente la proteína que no unida fue retirada lavando 2 veces con: PBS+Tween 20 al 0.05% cada 5 min, la caja fue bloqueada con dos lavados de 100µl de leche deslactosada 5X por espacio de 1 hora a temperatura ambiente.

Las proteínas adheridas fueron incubadas con 50 µl del anticuerpo policlonal primario respectivo en una dilución de 1:3000 en PBS el cual se dejó por un espacio de 90 min a temperatura ambiente. El anticuerpo no unido fue retirado mediante dos lavados con PBS-Tween 20 al 0.05% a continuación se le adiciono a cada pozo el anticuerpo secundario Anti-conejo conjugado a peroxidasa en una dilución 1:3000 en PBS tween 20 a temperatura ambiente. El exceso de anticuerpo secundario fue retirado con tres lavados de PBS+Tween 20 al 0.05% cada 5 min.

Finalmente, la detección se llevó a cabo Aparte se inicia la preparación del (o-Phenylenediamine dihydrochloride) OPD SIGMA FAST™ (Sigma): preparar 20 minutos antes que se cumpla el tiempo del anticuerpo secundario, tomar 20 mL de H<sub>2</sub>O y adicionar 1 pastilla dorada y 1 pastilla plateada, dejar en ultrarocker 20 min en completa oscuridad. Este reactivo que viene en una presentación de tabletas ha sido diseñado para ser usado como sustrato soluble para la detección de la actividad de la peroxidasa en inmunoensayos enzimáticos (EIA). Por último se realizarán lavados, luego dispensar 100 uL de OPD en cada pozo, dejar en oscuridad 30 minutos y de inmediato leer la placa en el

lector de placas de ELISA o espectrofotómetro a 450 nm. Los controles a tener en cuenta para este ensayo fueron; control negativo de diluyente (PBS), control positivo Lisado de células ESK-4 infectadas con PoAstVPUJP5 y control negativo lisado de células ESK-4 sin infectar.

### Cuantificación de RNA y cDNA a partir de material fecal

Al realizar la extracción de RNA total a partir de las muestras de materia fecal de lechones infectados y no infectados, se obtuvieron las siguientes concentraciones iniciales de RNA, las cuales fueron luego usadas en la retro transcripción, en las tablas a continuación se observan las concentraciones obtenidas:

<b>Cód. Muestra</b>	<b>[RNA] ng/μL</b>	<b>Relación Abs 260/280</b>
IP día 0	32,5	1,36
NIP día 0	31	1,35
IP día 1	208,2	1,63
NIP día 1	37,9	1,36
IP día 2	50,8	1,4
NIP día 2	40,8	1,36
IP día 3	47,8	1,39
NIP día 3	35,8	1,36
IP día 4	40,8	1,4
NIP día 4	34,1	1,39
IP día 5	33,2	1,34
NIP día 5	31,4	1,34
Agua Blanco RX	-6,4	1,78

Concentración de RNA total en muestras de heces tomadas de los corrales de lechones infectados (IP) y no infectados (NIP) durante el tiempo del ensayo.

Al realizar el proceso de retrotranscripción, las concentraciones obtenidas para el DNA complementario (cDNA) son las siguientes (ver tabla 8):

<b>Cód. Muestra</b>	<b>[cDNA] ng/μL</b>	<b>Relacion 260/280</b>
IP día 0	1038,7	1,75
NIP día 0	1014,9	1,74
IP día 1	1228,6	1,75
NIP día 1	1001,8	1,74
IP día 2	965,8	1,74
NIP día 2	1334,4	1,77
IP día 3	1395,4	1,73

NIP día 3	1457,2	1,75
IP día 4	1104,5	1,74
NIP día 4	1051,6	1,68
IP día 5	920,4	1,72
NIP día 5	938,3	1,71
Agua Blanco RX	-1,2	1,98

Concentración de DNA después de retrotranscripción en muestras de heces tomadas de los corrales de lechones infectados (IP) y no infectados (NIP) durante el tiempo del ensayo.