



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**IDENTIFICACIÓN DE DROGAS QUE INHIBEN LA REPLICACIÓN  
DE ROTAVIRUS Y LOCALIZACIÓN DE SU SITIO DE ACCIÓN**

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

**Fernando Chávez Maya**

Tutor

Luis Padilla Noriega

(Facultad de Medicina, UNAM)

Comité Tutorial

Gary García Espinosa

(Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM)

María Eugenia López Arellano

(INIFAP)

**CDMX**

**OCTUBRE, 2020**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **Agradecimientos**

El alumno agradece al Programa de Apoyos para la Superación del Personal Académico de la UNAM (PASPA) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la Universidad Nacional Autónoma de México por el apoyo proporcionado.

El Alumno agradece a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México por la comisión con goce de sueldo por estudios en el país.

Se agradece el financiamiento otorgado por la Fundación Miguel Alemán A.C.

Se agradece el financiamiento del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

## **Resumen**

Los rotavirus presentan un genoma de 11 segmentos de ARN de cadena doble (ARNcd), cubiertos por una cápside de tres capas proteicas y son uno de los principales agentes etiológicos de gastroenteritis aguda en individuos jóvenes de varias especies animales, incluyendo al humano. La vacunación protege contra la gastroenteritis causada por rotavirus en humanos y algunas especies de animales, sin embargo, la protección que confieren no es completa por lo que es necesario desarrollar antivirales. En este trabajo nos propusimos determinar el potencial anti-rotavirus de 12 drogas e identificar el gen blanco de la droga con el mayor efecto antiviral. Se determinó el efecto citotóxico de 12 drogas y su efecto inhibitorio sobre la replicación del genoma de dos clonas del rotavirus RRV (RRV1 y RRV2). Se identificó que concentraciones milimolares de benzimidazol inhiben la replicación de RRV1 y RRV2, y se seleccionaron independientemente las mutantes RRV1-B12b y RRV2-B12a mediante 12 pases seriados en presencia de benzimidazol. Se obtuvieron las secuencias de los genomas completos de las cepas silvestres y mutantes, y se identificaron 4 y 7 mutaciones puntuales en RRV1-B12b y RRV2-B12a, respectivamente. La mayoría de los cambios nucleotídicos (7/11) y la mayoría de los cambios nucleotídicos que se traducen en cambio de aminoácido (5/9), incluyendo la única mutación compartida en ambas mutantes (G2,414 → R[G/A], D800N), ocurrieron en el gene que codifica VP2, y específicamente en su dominio principal. VP2 tiene tres funciones conocidas, y en todas ellas participa su dominio principal: cofactor de la ARN polimerasa viral, forma la capa interna del virión y participa en la morfogénesis de los viroplasma, cuerpos de inclusión citoplásmicos donde se replica rotavirus. También se encontraron 4 cambios de residuos en 4 distintos dominios de 3 proteínas diferentes de VP2. Estos resultados identifican a VP2 como el blanco primario de benzimidazol.

**Palabras clave:** ARN replicasa, rotavirus, VP2, benzimidazol, genoma, mutación.

## **Abstract**

Rotaviruses have an 11-segment double-stranded RNA genome (dsRNA), wrapped in a three-layer protein capsid and are one of the main etiologic agents of acute gastroenteritis in young individuals of various animal species, including humans. Vaccination protects against gastroenteritis caused by rotavirus in humans and some animal species, however, the protection they confer is not complete, so there is a need for the development of antivirals. In this work the cytotoxic effect of 12 drugs was measured, as well as their inhibitory effect on the genome replication of two clones of the rotavirus RRV (RRV1 and RRV2). Millimolar concentrations of benzimidazole inhibited the replication of RRV1 and RRV2 and mutants RRV1-B12b and RRV2-B12a were selected by 12 serial passages in the presence of the drug. The sequences of the complete genomes of the wild and mutant strains were obtained, thus identifying 4- and 7-point mutations in RRV1-B12b and RRV2-B12a, respectively. Most mutations (7/11) and most mutations that resulted in amino acid changes (5/9), including the only one shared by both mutants (G2,414 → R [G / A], D800N ), occurred in the gene that encodes VP2, specifically in its main domain. VP2 has three known functions, and its main domain has a role in each of them: cofactor of the viral RNA polymerase, structural protein of the inner protein layer of the virion and participation in morphogenesis of cytoplasmic inclusion bodies where viral replication occurs, called viroplasms. We also found 4 mutations in 4 distinct domains of 3 different proteins other than VP2. These results identify VP2 as the primary target of benzimidazole.

**Keywords: RNA replicase, rotavirus, VP2, benzimidazole, genome, mutation.**

## Índice

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
<b>Agradecimientos</b> -----	<b>I</b>
<b>Resumen</b> -----	<b>II</b>
<b>Abstract</b> -----	<b>III</b>
<b>Índice</b> -----	<b>IV</b>
<b>Tablas</b> -----	<b>V</b>
<b>Figuras</b> -----	<b>VI</b>
<b>Introducción</b> -----	<b>1</b>
<b>Antecedentes</b> -----	<b>2</b>
<b>Justificación</b> -----	<b>6</b>
<b>Hipótesis</b> -----	<b>7</b>
<b>Objetivos</b> -----	<b>7</b>
<b>Material y métodos</b> -----	<b>8</b>
<b>Resultados</b> -----	<b>16</b>
<b>Discusión y conclusiones</b> -----	<b>40</b>
<b>Bibliografía</b> -----	<b>46</b>
<b>Anexo I</b> -----	<b>56</b>
<b>Anexo II</b> -----	<b>57</b>
<b>Anexo III</b> -----	<b>59</b>
<b>Anexo IV</b> -----	<b>61</b>
<b>Anexo V</b> -----	<b>62</b>
<b>Anexo VI</b> -----	<b>68</b>
<b>Anexo VII</b> -----	<b>69</b>
<b>Anexo VIII</b> -----	<b>70</b>

## Tablas

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
<b>Tabla 1</b>	Drogas seleccionadas para probar su efecto inhibitorio sobre la replicación del ARNcd de rotavirus.	<b>9</b>
<b>Tabla 2</b>	Concentración de cada droga utilizada en los ensayos de citotoxicidad.	<b>10</b>
<b>Tabla 3</b>	Concentración de 12 drogas con efecto citotóxico menor al 50% en células MA-104.	<b>16</b>
<b>Tabla 4</b>	Lecturas obtenidas de cada genoma luego del proceso de secuenciación.	<b>31</b>
<b>Tabla 5</b>	Ubicación y tipo de cambios nucleotídicos observados en la cepa mutante RRV1-B12b vs su respectiva cepa silvestre RRV1 y la cepa mutante RRV2-B12a vs su respectiva cepa silvestre RRV2.	<b>32</b>
<b>Tabla 6</b>	Ubicación y tipo de cambios de aminoácidos observados entre la cepa mutante RRV1-B12b vs su respectiva cepa silvestre RRV1 y la cepa mutante RRV2-B12a vs su respectiva cepa silvestre RRV2.	<b>33</b>

## Figuras

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
<b>Figura 1</b>	Virión de rotavirus	<b>2</b>
<b>Figura 2</b>	Estructuras químicas de benzotriazol, imidazol, quinolina, trifenilmetano, hidrocloreuro de guanidina e hidantoína.	<b>5</b>
<b>Figura 3</b>	Estructuras químicas del benzimidazol y algunos de sus derivados.	<b>5</b>
<b>Figura 4</b>	Inhibición de la replicación del ARNcd de RRV1.	<b>17</b>
<b>Figura 5</b>	Inhibición de la replicación del ARNcd de RRV2.	<b>18</b>
<b>Figura 6</b>	Benzimidazol inhibe la replicación de RRV1.	<b>20</b>
<b>Figura 7</b>	Quinolina inhibe la replicación de RRV1.	<b>21</b>
<b>Figura 8</b>	Benzimidazol inhibe la replicación de RRV2.	<b>22</b>
<b>Figura 9</b>	Quinolina inhibe la replicación de RRV2.	<b>23</b>
<b>Figura 10</b>	RRV1-B12b resiste parcialmente el tratamiento con benzimidazol 8 mM.	<b>25</b>
<b>Figura 11</b>	RRV1-Q12a no resiste el tratamiento con quinolina 5 mM.	<b>26</b>
<b>Figura 12</b>	RRV1-Q12b no resiste el tratamiento con quinolina 5 mM.	<b>27</b>
<b>Figura 13</b>	RRV2-B12a resiste el tratamiento con benzimidazol 8 mM.	<b>28</b>
<b>Figura 14</b>	RRV2-B12b no resiste el tratamiento con benzimidazol 8 mM.	<b>29</b>
<b>Figura 15</b>	RRV2-Q12b no resiste el tratamiento con quinolina 5 mM.	<b>30</b>
<b>Figura 16</b>	Localización de las mutaciones en VP2 de RRV1-B12b.	<b>34</b>
<b>Figura 17</b>	Localización de las mutaciones en VP2 de RRV2-B12a.	<b>35</b>
<b>Figura 18</b>	Localización de la mutación en VP3 de RRV1-B12b.	<b>36</b>
<b>Figura 19</b>	Localización de la mutación en VP3 de RRV2-B12a.	<b>37</b>
<b>Figura 20</b>	Localización de la mutación en NSP3 de RRV2-B12a.	<b>38</b>
<b>Figura 21</b>	Localización de la mutación en NSP6 de RRV2-B12a.	<b>39</b>



## **Introducción**

Los rotavirus están clasificados dentro del género *Rotavirus* que pertenece a la subfamilia *Sedoreovirinae* de la familia *Reoviridae* (Desselberger, 2014; International Committee on Taxonomy of Viruses, 2011). Se reconocen 8 diferentes especies de rotavirus identificadas con las letras de la A a la H (Kindler et al., 2013; Matthijnssens et al., 2012), la especie A ha sido descrita en mamíferos y en aves, las especies B, C, E y H solo se han descrito en mamíferos, y las especies D, F y G han sido descritas solo en aves (Johnne et al., 2011; Knipe et al., 2007; Otto et al., 2006). Además se han propuesto la especie I en perros y la J en murciélagos (Bányai et al., 2017; Mihalov-Kovács et al., 2015). La especie A de rotavirus tiene gran importancia como agente causal de gastroenteritis en animales jóvenes incluyendo al humano (Knipe et al., 2007). La vacunación ha ayudado a disminuir el impacto de la replicación de cepas de la especie A de rotavirus que afectan a humanos y a mamíferos domésticos, sin embargo, se han descrito limitaciones en la aplicación de esta estrategia (Heaton and Ciarlet, 2007; Kaneko et al., 2017; McClenahan et al., 2011; Nemoto et al., 2018; O’Ryan, 2007; Saif and Fernandez, 1996; Victoria et al., 2010). Una estrategia alternativa a la vacunación es la identificación de drogas con propiedades antivirales (De Clercq, 2002), las cuales podrían ayudar a disminuir el impacto de estos virus, sobre todo en poblaciones de animales domésticos y humanos que no han sido inmunizados o se encuentran inmunodeprimidos (Lee and Ison, 2014). En este trabajo nos propusimos determinar el potencial antiviral de algunas drogas similares a varias que presentan este efecto sobre algunos virus con genomas de ARN de cadena sencilla de polaridad positiva (ARN+) o ARN de cadena doble (ARNcd). Se determinó el efecto citotóxico de 12 drogas en células MA-104 y sus propiedades inhibitorias sobre la replicación de rotavirus. Se generaron mutantes resistentes a benzimidazol, la droga con mayor efecto inhibitorio, y mediante la secuenciación del genoma completo de las cepas mutantes y silvestres se identificó el gen blanco de esta droga.

## Antecedentes

Los rotavirus presentan un genoma de ácido ribonucleico de cadena doble dividido en 11 segmentos, con un tamaño aproximado de 18.5 kb. El genoma de rotavirus codifica 6 proteínas estructurales (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7) y de 5 a 6 proteínas no estructurales (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 y en algunas cepas NSP6) (Desselberger, 2014; International Committee on Taxonomy of Viruses, 2011). La partícula viral presenta una apariencia característica de rueda (*rota* = rueda), cuando se observa con la ayuda de microscopía electrónica. La capa de proteínas interna está formada por VP2 que cubre al genoma viral asociado a la ARN polimerasa VP1 y la guanilil- y metil-transferasa VP3, la capa intermedia del virión la constituye VP6 y la capa externa está formada por VP7 y espículas de VP4 ver figura 1 (Desselberger, 2014; International Committee on Taxonomy of Viruses, 2011).

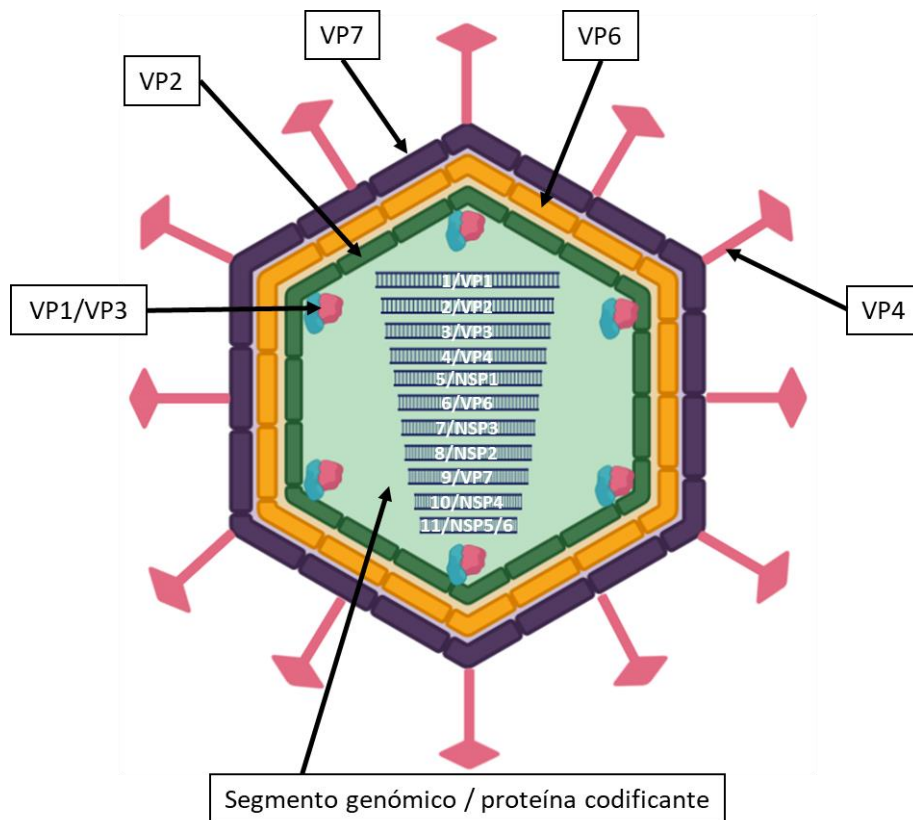


Figura 1. Virión de rotavirus. Se indican los componentes de la partícula viral, los 11 segmentos de ARNcd y sus respectivas proteínas codificantes.

Los rotavirus se replican principalmente en los enterocitos maduros de las puntas de las vellosidades del intestino delgado. En el proceso de adhesión de las partículas virales los viriones interactúan mediante sus espículas con varios receptores celulares (Compans et al., 2001; Rojas et al., 2008). Una vez dentro de la célula la partícula viral de triple capa (TLP del inglés triple layered particle) pierde la capa más externa transformándose en una partícula de doble capa (DLP del inglés double layered particle). Las DLP funcionan como nanomáquinas que sintetizan los 11 ARN<sup>+</sup> mensajeros, los cuales son utilizados para la síntesis de proteínas y como molde para la formación de cada uno de los 11 segmentos de ARN<sup>cd</sup> que formarán el genoma de los nuevos viriones (Desselberger, 2014; Silvestri et al., 2004). La replicación de los rotavirus ocurre en inclusiones citoplasmáticas electrodensas llamadas viroplasmos, formados por ARN (11 segmentos) y proteínas virales (NSP2, NSP5, VP1, VP2, VP3, y VP6), así como con microtúbulos celulares (Rojas et al., 2008). Dentro de los viroplasmos, se ensambla simultáneamente la capa interna del virión y se lleva a cabo la síntesis de ácido ribonucleico de cadena sencilla polaridad negativa (ARN<sup>-</sup>) utilizando como plantilla a los ARN<sup>+</sup> idénticos a los mensajeros y produciendo así cada uno de los 11 ARN<sup>cd</sup> que forman el genoma viral. Posteriormente ocurre el ensamblaje de las DLP, cuando la segunda capa proteica es añadida (Rojas et al., 2008; Silvestri et al., 2004). Las nuevas DLP sintetizadas dentro de los viroplasmos son transcripcionalmente activas, por lo que la gran mayoría de los ARN<sup>+</sup> se sintetizan en estos cuerpos de inclusión (Desselberger, 2014; Silvestri et al., 2004). Posteriormente las DLP geman al retículo endoplásmico, adquiriendo una membrana lipídica transitoria que se pierde en un proceso de maduración que produce las partículas virales de tres capas (Desselberger, 2014; Rojas et al., 2008; Trask et al., 2012). Las partículas virales salen de las células mediante lisis celular en células MA-104 o mediante gemación en células Caco-2 (Gardet et al., 2006; McNulty et al., 1976). Las partículas virales son expulsadas en grandes cantidades en las heces, transmitiéndose principalmente a través de una ruta fecal-oral y mediante el contacto directo entre individuos (Knipe et al., 2007).

Los rotavirus causan elevadas pérdidas económicas en la industria ganadera y avícola a nivel mundial (Cho and Yoon, 2014; Dhama et al., 2015; Falcone et al., 2015; Knipe et al., 2007; Otto et al., 2006). Aunque se han desarrollado vacunas contra rotavirus de la especie A que

afectan a mamíferos (Heaton and Ciarlet, 2007; Nemoto et al., 2018; O’Ryan, 2007; Saif and Fernandez, 1996), las cuales han sido muy útiles para reducir el impacto de estos virus, persisten algunas limitaciones para proporcionar una protección segura y eficiente (Kaneko et al., 2017; McClenahan et al., 2011; Saif and Fernandez, 1996; Victoria et al., 2010). Por otro lado, en el contexto avícola no existen vacunas ni tratamientos que se apliquen en la actualidad (Day, 2013; Devitt and Reynolds, 1993; McNulty et al., 1981). Una de las estrategias para disminuir el impacto de las infecciones por rotavirus tanto en mamíferos como en aves puede ser a través de drogas antivirales (De Clercq, 2002).

Mediante estudios en cultivo de células *in vitro* se ha encontrado que los benzotriazol (Bretner et al., 2005), imidazol, derivados de quinolina (Khan et al., 2012) y derivados de trifenilmetano cuyas estructuras se muestran en la figura 2 (Chen et al., 2009) inhiben la replicación de algunos virus de las familias *Flaviviridae*, *Coronaviridae* y *Picornaviridae*, los cuales presentan genomas de ARN<sup>+</sup> (Briguglio et al., 2011). Se sabe también que concentraciones milimolares de hidrocloreto de guanidina (GuHCl), ver figura 2, inhiben la replicación de varios virus de la familia *Picornaviridae*, tales como poliovirus, coxsackievirus, enterovirus humano B (echovirus) y el virus de la fiebre aftosa. En particular para poliovirus GuHCl interactúa de manera reversible con la proteína 2C<sup>ATPasa</sup> una proteína que tiene función de helicasa, resultando en la inhibición específica de la síntesis de ARN<sup>+</sup>. Un orthoreovirus de mamífero de la familia *Reoviridae* como los rotavirus, es inhibido de manera reversible utilizando 15 mM de GuHCl en células L929, cuando se utilizan concentraciones de hasta 20 mM de GuHCl no se observan efectos adversos en células L929, mientras que cuando se utilizan concentraciones mayores de 40 mM de GuHCl se observa evidencia de muerte celular a las 12 y a las 24 horas (Murray and Nibert, 2007). Se ha encontrado que varios derivados de benzimidazol (figura 3) inhiben la replicación de algunos virus de la familia *Picornaviridae*, tales como coxsackievirus, poliovirus y echovirus (De Palma et al., 2008; Shimizu et al., 2000) y coincidentemente con el GuHCl inducen mutaciones en la 2C<sup>ATPasa</sup> de poliovirus. Además en 2012 se identificaron dos derivados de benzimidazol con efecto antiviral sobre una cepa de rotavirus que afecta a humanos (Wa), sin embargo no se identificó el gen diana afectado por estas drogas (Bassyouni et al., 2012).

Finalmente la hidantoína (figura 2) también induce mutaciones en la proteína 2C de poliovirus, aunque se desconoce el mecanismo (Verlinden et al., 2000).

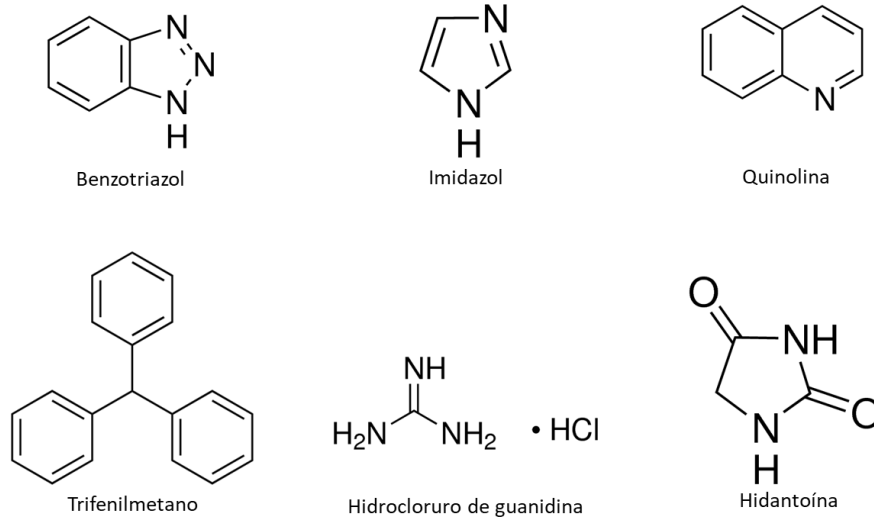


Figura 2. Estructuras químicas del benzotriazol, imidazol, quinolína, trifenilmetano, hidrocloruro de guanidina e hidantoína.

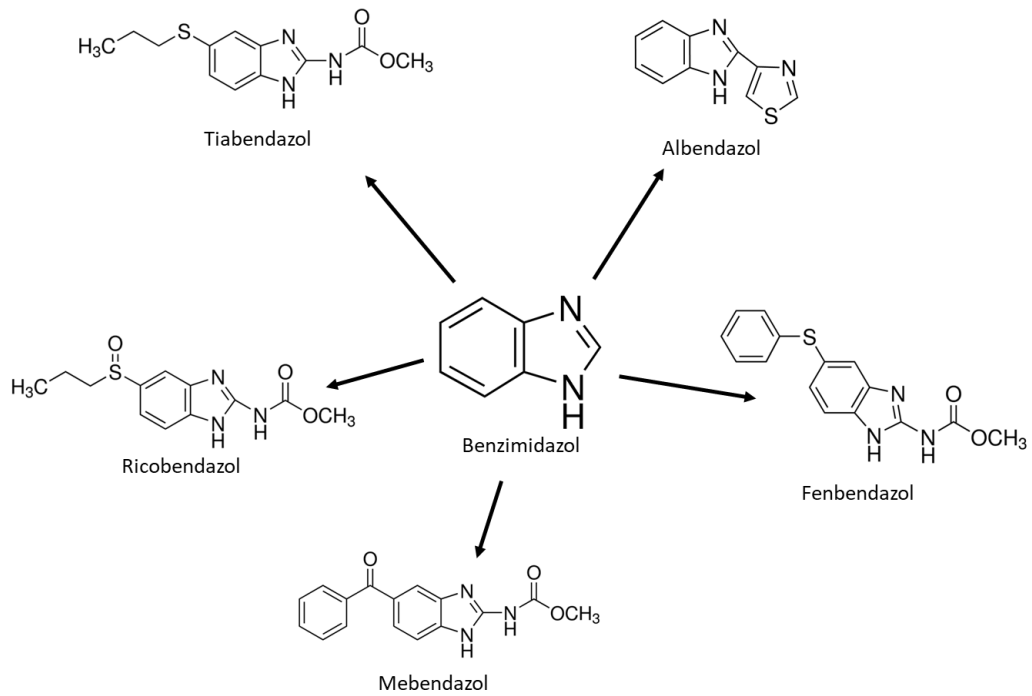


Figura 3. Estructuras químicas del benzimidazol y algunos de sus derivados.

En este estudio nos propusimos determinar el potencial anti-rotavirus de 12 drogas, similares químicamente a algunas que han tenido efecto antiviral sobre virus con genomas de ARN+ o ARNcd, e identificar el gen mayormente afectado por la droga con mayor efecto antiviral.

### **Justificación**

La vacunación contra rotavirus solo existe para algunas cepas de la especie A en mamíferos incluyendo al humano, por lo que es necesario desarrollar estrategias complementarias que puedan ayudar a disminuir el impacto de rotavirus en poblaciones de animales no vacunados o inmunodeprimidos. Actualmente no existen drogas que se utilicen como antivirales contra rotavirus, la identificación de drogas con propiedades antirotavirales es una estrategia que puede ayudar a complementar la vacunación.

## **Hipótesis**

Hidrocloruro de guanidina, hidantoína, benzotriazol, benzimidazol, tiabendazol, albendazol, fenbendazol, mebendazol, ricobendazol, imidazol, quinolina y trifenilmetano inhiben la replicación de ARNcd de 2 clonas de la cepa RRV de rotavirus en células MA-104.

## **Objetivo general**

Identificar el efecto inhibitorio de hidrocloruro de guanidina, hidantoína, benzotriazol, benzimidazol, tiabendazol, albendazol, fenbendazol, mebendazol, ricobendazol, imidazol, quinolina y trifenilmetano sobre la replicación de ARNcd de 2 clonas de la cepa RRV de rotavirus e identificar la proteína viral blanco.

## **Objetivos específicos**

- 1) Determinar concentraciones de hidrocloruro de guanidina, hidantoína, benzotriazol, benzimidazol, tiabendazol, albendazol, fenbendazol, mebendazol, ricobendazol, imidazol, quinolina y trifenilmetano con efecto citotóxico menor al 50% en células MA-104.
- 2) Identificar concentraciones de hidrocloruro de guanidina, hidantoína, benzotriazol, benzimidazol, tiabendazol, albendazol, fenbendazol, mebendazol, ricobendazol, imidazol, quinolina y trifenilmetano con efecto inhibitorio sobre la replicación de ARNcd de 2 clonas de la cepa RRV de rotavirus en células MA-104.
- 3) Seleccionar mutantes resistentes a cada una de las dos drogas con mayor efecto inhibitorio sobre la replicación de ARNcd de rotavirus.
- 4) Secuenciar el genoma completo de las cepas silvestres y mutantes de RRV resistentes a la droga con mayor efecto antiviral.
- 5) Analizar la secuencia del genoma completo de las cepas silvestres y mutantes de RRV resistentes a la droga con mayor efecto antiviral para identificar la proteína viral blanco.

## **Material y métodos**

### Células

La línea celular MA-104 obtenida de Richard G. Wyatt (National Institutes of Health, Bethesda, MD) fue cultivada con protocolos previamente descritos (Arnold et al., 2009). Brevemente, las células MA104 fueron mantenidas en una atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, con una humedad >95% en medio mínimo esencial de Eagle (Corning, número de catálogo 51-010-PCR) sin antibióticos, suplementado con 7% de suero fetal bovino (Biowest, número de catálogo S1810-500) y con una concentración 2 mM de L-alanyl-L-Glutamina (Gibco, número de catálogo 35050-061). Las células fueron subcultivadas en confluencia utilizando 0.5 mg/ml de tripsina (Gibco, número de catálogo 27250-042).

### Clonación de la cepa RRV de rotavirus

La cepa RRV de rotavirus que les dio origen a las cepas silvestres y mutantes utilizadas en este trabajo se obtuvo de Harry B. Greenberg (Stanford University, Stanford, CA). Con el objetivo de disminuir la heterogeneidad genética de la cepa silvestre de RRV se obtuvieron dos clonas identificadas como RRV1 y RRV2, mediante tres ensayos secuenciales de formación de placas (Arnold et al., 2009).

### Titulación de las clonas de RRV silvestres y las cepas seleccionadas en presencia del tratamiento

Mediante el ensayo de formación de placas, se titularon las cepas silvestres RRV1 y RRV2, así como las cepas seleccionadas durante 12 pases secuenciales en presencia de benzimidazol (RRV1-B12b, RRV2-B12b y RRV2-B12a) o quinolina (RRV1-Q12b, RRV1-Q12a y RRV2-Q12b). El título viral en unidades formadoras de placas (UFP) que se obtuvo en cada caso fue de:

$$\text{RRV1} = 6 \times 10^7 \text{ UFP/1 ml.}$$

$$\text{RRV1-B12b} = 2 \times 10^7 \text{ UFP/1 ml.}$$

$$\text{RRV1-Q12b} = 5 \times 10^7 \text{ UFP/1 ml.}$$

$$\text{RRV1-Q12a} = 7 \times 10^7 \text{ UFP/1 ml.}$$

$$\text{RRV2} = 6 \times 10^7 \text{ UFP/1 ml.}$$



RRV2-B12b =  $2 \times 10^7$  UFP/1 ml.

RRV2-Q12b =  $5 \times 10^7$  UFP/1 ml.

RRV2-B12a =  $2 \times 10^7$  UFP/1 ml.

#### Selección de drogas con posible efecto inhibitorio en rotavirus

A partir de publicaciones previas se seleccionaron drogas similares químicamente a algunas que han tenido efecto antiviral sobre virus con genomas de ARN+ o ARNcd (Bassyouni et al., 2012; Briguglio et al., 2011; De Palma et al., 2008; Murray and Nibert, 2007; Shimizu et al., 2000; Verlinden et al., 2000), con el objetivo de identificar sus propiedades inhibitorias sobre la replicación del ARNcd de dos clonas de RRV (RRV1 y RRV2), en la tabla 1 se indican las drogas seleccionadas.

Tabla 1. Drogas seleccionadas para probar su efecto inhibitorio sobre la replicación del ARNcd de rotavirus.

<b>Nombre de la droga</b>	<b>Número de catálogo (Sigma-Aldrich)</b>
Albendazol	A4673-10G
Benzimidazol	194123-100G
Benzotriazol	B11400-100G
Fenbendazol	F5396-5G
Hidrocloruro de guanidina	50933-50G
Hidantoína	156361-100G
Imidazol	I5513-5G
Mebendazol	M2523-25G
Quinolina	241571-5G
Ricobendazol	19953-25G
Tiabendazol	T5535-50G
Trifenilmetano	101303-25G

#### Determinación de la solubilidad de cada una de las drogas seleccionadas

Se determinó la cantidad máxima de cada droga que podía ser solubilizada en dimetilsulfóxido (DMSO) o en medio mínimo esencial de Eagle sin suero (MEM-SS) respectivamente, con excepción del hidrocloruro de guanidina, debido a que en el laboratorio se contaba con información previa (no publicada) que definió su concentración máxima de trabajo. Se añadieron distintas concentraciones de cada droga en 1 ml de diluyente, hasta detectar la cantidad máxima de cada soluto que produjera un líquido cristalino a simple vista

para obtener la concentración máxima en unidades molares, a una temperatura de 20 a 25°C. Posteriormente se tomaron diferentes volúmenes de cada droga y se añadió cuanto baste para 1 ml de MEM-SS (a una temperatura de 20 a 25°C) para producir la concentración de trabajo, cuidando que no se observaran indicios de precipitación a simple vista. En la columna 3 de la tabla 2 se indican las concentraciones máximas utilizadas en los ensayos de citotoxicidad de acuerdo con la solubilidad de cada una de las drogas, dichas concentraciones y 5 diluciones dobles seriadas se utilizaron en los ensayos de citotoxicidad.

Tabla 2. Concentración de cada droga utilizada en los ensayos de citotoxicidad.

<b>Nombre de la droga</b>	<b>Peso molecular</b>	<b>Concentración utilizada en ensayos de citotoxicidad</b>
Albendazol	265.33	32µM
Benzimidazol	118.14	16 mM
Benzotriazol	119.12	64 mM
Fenbendazol	299.35	16µM
Hidrocloruro de guanidina	95.53	80mM
Hidantoína	100.08	8 mM
Imidazol	68.08	0.5 M
Mebendazol	295.29	16 µM
Quinolina	129.16	10 mM
Ricobendazol	281.33	320 µM
Tiabendazol	201.25	60 µM
Trifenilmetano	244.33	32µM

#### Determinación del efecto citotóxico de cada una de las 12 drogas en células MA-104

La determinación del efecto citotóxico de distintas concentraciones de cada droga en células MA-104 se realizó en placas de 96 pozos mediante tinción con cristal violeta al 0.5% (Feoktistova et al., 2016) (Sigma-Aldrich, número de catálogo C6158-50). La evaluación del efecto citotóxico se realizó a las 18 horas después de haber añadido la droga, midiendo la Abs<sub>570</sub> del cristal violeta solubilizado que habían internalizado las células todavía adheridas a la placa. Se realizaron 3 ensayos independientes, en cada ensayo cada concentración de cada droga se probó por quintuplicado. Los resultados obtenidos fueron graficados utilizando los promedios y el error estándar para cada concentración utilizada de cada droga

seleccionada. Las concentraciones con efecto citotóxico menor al 50% de cada droga se indican en la columna 2 de la tabla 3.

#### Determinación del efecto inhibitorio de cada droga, sobre la replicación de ARNcd de las clonas RRV1 y RRV2

Se determinó el efecto inhibitorio del hidrocloreuro de guanidina, hidantoína, benzotriazol, benzimidazol, tiabendazol, albendazol, fenbendazol, mebendazol, ricobendazol, imidazol, quinolina y trifenilmetano sobre la replicación de ARNcd de las clonas RRV1 y RRV2 replicadas en células MA-104. En placas de 6 pozos se infectaron  $1 \times 10^6$  células MA104 con la respectiva cepa de rotavirus a una MOI de 5, después de la adsorción e internalización de rotavirus se agregó cada una de las drogas respectivamente (concentración citotóxica menor al 50 %, ver tabla 3, columna 2) en ensayos independientes para cada una de las drogas. A las 18 horas post infección (hpi) se cosechó todo el contenido de cada pozo, ver anexo I, se realizó extracción de ARN mediante fenol cloroformo a partir de 200  $\mu$ l del volumen total de cada pozo y se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida (Rio et al., 2010) seguida de tinción con nitrato de plata. La imagen de cada gel se capturó mediante un G2-800 Calibrated Densitometer (BIO-RAD, número de catálogo 170-7980). A cada imagen capturada se le realizó un análisis densitométrico mediante el software ImageJ 1.43u (Abramoff et al., 2004). Los datos obtenidos fueron graficados.

#### Determinación de la dosis inhibitoria 50% de benzimidazol y quinolina sobre la replicación de ARNcd de las clonas RRV1 y RRV2

Luego de identificar al benzimidazol y quinolina como las drogas que inhibían la replicación del ARNcd de las clonas RRV1 y RRV2 se determinó la dosis inhibitoria 50%. Se infectaron  $1 \times 10^6$  células MA-104 con la respectiva cepa de rotavirus a una MOI de 1, después de 2 horas de haber añadido el virus a las células se agregó la concentración de cada droga respectivamente (16 mM, 8 mM, 4 mM y 2 mM en el caso de benzimidazol y 10 mM, 5 mM, 2.5 mM y 1.25 mM en el caso de quinolina). A las 18 hpi se cosechó todo el contenido de cada pozo (ver anexo I). Posteriormente se realizó la extracción de ARN a partir de 200  $\mu$ l del volumen total cosechado seguido de una electroforesis en gel de poliacrilamida (Rio et

al., 2010) y tinción con nitrato de plata. Se realizaron 3 ensayos independientes, a cada gel de poliacrilamida obtenido se le realizó un análisis densitométrico mediante el software ImageJ 1.43u (Abramoff et al., 2004). Los datos obtenidos fueron mostrados en gráficas de replicación de ARNcd y utilizados para realizar el cálculo de la dosis inhibitoria 50% mediante una regresión logística de 4 parámetros (Sebaugh, 2011).

#### Selección de mutantes de RRV1 y RRV2 resistentes a benzimidazol y quinolina

Con el objetivo de generar mutantes resistentes al efecto inhibitorio de benzimidazol, se replicaron las clonas RRV1 y RRV2 durante 12 pases seriados en presencia de esta droga y se obtuvieron las 3 cepas RRV1-B12b, RRV2-B12b y RRV2-B12a. El mismo procedimiento se realizó para quinolina y se obtuvieron las 3 cepas RRV1-Q12b, RRV1-Q12a y RRV2-Q12b (ver anexo II).

#### Determinación de resistencia al efecto inhibitorio de benzimidazol y quinolina

Después de realizar los 12 pases selectivos, se evaluó la resistencia de las 3 cepas RRV-B12b, RRV2-B12b y RRV2-B12a al efecto inhibitorio de benzimidazol. También se evaluó la resistencia al efecto inhibitorio de quinolina de las 3 cepas RRV1-Q12b, RRV1-Q12a y RRV2-Q12b. Para este fin a una MOI de 1 se infectaron 2 pozos por cepa, conteniendo cada pozo  $1 \times 10^6$  células MA-104 en placas de 6 pozos. Después de la adsorción e internalización de rotavirus se agregó benzimidazol (8 mM) a uno de cada par de pozos infectados con RRV1, RRV2, RRV1-B12b, RRV2-B12b y RRV2-B12a y se agregó quinolina (5 mM) a uno de cada par de pozos infectados con RRV1, RRV2, RRV1-Q12b, RRV1-Q12a y RRV2-Q12b. Se incubó 18 horas y se cosechó todo el contenido de cada pozo, ver anexo I. Posteriormente se realizó extracción de ARN a partir de 200  $\mu$ l del volumen total cosechado, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida (Rio et al., 2010) y el gel se tiñó con nitrato de plata. Se realizaron 3 ensayos independientes. A cada fotografía de cada gel de poliacrilamida obtenido se le realizó un análisis densitométrico mediante el software ImageJ 1.43u (Abramoff et al., 2004). Con los datos obtenidos se construyeron gráficas de la replicación de ARNcd de cada ensayo.

Secuenciación del genoma de las mutantes resistentes a benzimidazol (RRV1-B12b y RRV2-B12a) y sus respectivas cepas silvestres (RRV1 y RRV2)

100 ml de cada cepa RRV1, RRV2, RRV1-B12b y RRV2-B12a se mezclaron de manera independiente con 100 ml de triclorofluorometano (CCL<sub>3</sub>F), se homogenizó y centrifugó a 4,000 rpm (JA-20, Beckman) por 30 minutos a 4°C y se colectó el sobrenadante. Las partículas virales se concentraron mediante centrifugación a 25,000 rpm (SW28, Beckman) por 1 hora a 4°C y se desechó el sobrenadante. Cada pastilla generada correspondiente a cada una de las 4 cepas se resuspendió en 1 ml de TBS (136 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM TRIS-BASE, pH 7.4), se añadió 0.01 volúmenes de EDTA 0.5 M pH8, se homogenizó y se incubó 30 minutos a 37°C, después se colocó en hielo. Cada muestra se colocó en la parte superior de un gradiente de sacarosa de 15-45% previamente formado en un tubo para rotor SW28 (Beckman). Se centrifugó a 25,000 rpm (SW28, Beckman) por 1 hora a 4°C.

Las bandas correspondientes a DLP y SLP se colectaron y centrifugaron a 25,000 rpm (SW65, Beckman) por 1 hora a 4°C. La pastilla se resuspendió en 500 µl de TBS, cada 50 µl del volumen final se colocaron en un tubo de 1.5 ml y se almacenaron a -20°C, ver anexo III. Las partículas virales purificadas se trataron con nucleasas utilizando el TURBO DNA-free™ Kit (Invitrogen, número de catálogo AM1907) y RNase Cocktail™ (Invitrogen, número de catálogo AM2286) siguiendo las especificaciones del proveedor, ver anexo III. Se extrajo y purificó el ARNcd correspondiente al genoma de rotavirus mediante TRIzol™ Plus RNA Purification Kit and Phasemaker™ Tubes Complete System (Invitrogen, número de catálogo A33254), siguiendo las especificaciones del proveedor.

Posteriormente en la Unidad de Secuenciación Masiva y Bioinformática del Instituto de Biotecnología de la UNAM, Cuernavaca, Morelos, cada ARNcd de cada muestra se cuantificó con el Qubit™ dsDNA BR Assay Kit (ThermoFisher Scientific, Invitrogen, número de catálogo Q32850), obteniendo los valores de: 0.0534 ng/µ, 0.0046 ng/µ, 0.0680 ng/µ y 0.0196 ng/µ para las muestras RRV1, RRV1-B12b, RRV2 y RRV2-B12a respectivamente. Se tomaron 5 µl de cada muestra y se construyó una biblioteca de RNAseq utilizando el TruSeq Stranded mRNA Library Prep (96 Samples) (Illumina, número de catálogo 20020595), siguiendo las especificaciones del proveedor. Posteriormente los

productos de las bibliotecas se analizaron mediante electroforesis capilar utilizando un Bioanalyzer 2100 (Agilent, número de catálogo G2939BA) y un chip de ADN 1000 (Agilent, número de catálogo 5067-1504) para determinar el tamaño promedio de cada biblioteca. También se cuantificaron las muestras a través de una reacción de qPCR utilizando el Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2X (Thermo Fisher Scientific, número de catálogo K0222) siguiendo las especificaciones del proveedor. Con los datos del tamaño y la concentración se determinó la concentración molar de cada muestra y se normalizaron a 4 nM para su posterior secuenciación. Posteriormente las bibliotecas se secuenciaron utilizando un TG NextSeq® 500/550 High Output Kit v2 de 150 cycles (Illumina, número de catálogo TG-160-2002).

#### Reconstrucción de los genomas de las cepas mutantes y silvestre e identificación de mutaciones en las cepas mutantes

A las lecturas crudas obtenidas se les realizó un análisis de calidad utilizando el programa FastQC (Babraham Bioinformatics, 2020). Posteriormente las lecturas se alinearon con un genoma de referencia de rotavirus (GenBank EU636924-EU636934), utilizando el programa BWA-MEM (Li and Durbin, 2010). Posteriormente se obtuvieron las secuencias consenso de cada segmento genómico, utilizando SaMtools (Li et al., 2009), ver anexo IV. La secuencia consenso de cada segmento genómico de cada mutante se comparó con la secuencia consenso de su respectiva cepa silvestre, utilizando el programa MEGA versión X (Kumar et al., 2018). Se identificó cada uno de los cambios nucleotídicos presentes dentro del genoma de cada cepa mutante resistente y su respectiva cepa silvestre. Luego de traducir la secuencia de nucleótidos a aminoácidos se identificaron los cambios nucleotídicos que se traducen en cambios de aminoácidos y se identificaron los cambios de aminoácidos no conservados. Posteriormente se compararon las mutaciones observadas en la secuencia genómica de la mutante RRV1-B12b y la mutante RRV2-B12a. Se identificaron los dominios de las proteínas virales donde se observaron las mutaciones.

### Localización de los cambios de aminoácido en modelos 3D de las proteínas afectadas

Las secuencias de nucleótidos de los segmentos genómicos donde se observaron las mutaciones se tradujeron a secuencias de aminoácidos utilizando Translate del ExPASy Bioinformatics Resource Portal (Gasteiger et al., 2003) el 01-10-2020. La secuencia de aminoácidos de las proteínas VP2 y VP3 de RRV1, RRV2, RRV1-B12b y RRV2-B12a y de las proteínas NSP3 y NSP6 de RRV2 y RRV2-B12a se utilizaron para identificar los modelos 3D con la secuencia de aminoácidos con mayor identidad y cobertura, estos modelos se utilizaron para construir los modelos 3D de las proteínas de interés utilizando Swiss-Model (Waterhouse et al., 2018) el 01-10-2020. Una vez construido el modelo 3D de las proteínas de interés se utilizó el programa UCSF ChimeraX 0.1 (Goddard et al., 2018) para superponer los modelos 3D de cada una de las proteínas de interés de cada mutante y su respectiva cepa silvestre e identificar las posiciones relativas de cada mutación. Los resultados de energía libre de Gibbs ( $\Delta\Delta G$ ) también se obtuvieron como medida cuantitativa para predecir la estabilidad de la proteína con cada una de las mutaciones utilizando SDM-2 (Pandurangan et al., 2017).

## Resultados

### Determinación del efecto citotóxico de 12 drogas en células MA-104

Luego de realizar los ensayos de citotoxicidad utilizando las concentraciones indicadas en la columna 3 de la tabla 2 y 5 diluciones dobles seriadas, se identificaron las concentraciones de las 12 drogas con efecto citotóxico menor al 50%, ver tabla 3 y figuras del anexo V.

Tabla 3. Concentración de 12 drogas con efecto citotóxico menor al 50% en células MA-104.

Nombre de la droga	Concentración con efecto citotóxico < 50%
Albendazol	32 $\mu$ M
Benzimidazol	16 mM
Benzotriazol	16 mM
Fenbendazol	16 $\mu$ M
Hidrocloruro de guanidina	20 mM
Hidantoína	8 mM
Imidazol	60.6 M
Mebendazol	4 $\mu$ M
Quinolina	10 mM
Ricobendazol	320 $\mu$ M
Tiabendazol	60 $\mu$ M
Trifenilmetano	16 $\mu$ M

### Determinación del efecto inhibitorio de las drogas sobre la replicación del ARNcd de las clonas RRV1 y RRV2

Con el fin de determinar el efecto inhibitorio sobre la replicación de rotavirus, se usaron inicialmente las concentraciones máximas de las 12 drogas que producen efecto citotóxico menor al 50% en células MA-104, ver columna 2 de la tabla 3. Para este fin se infectaron células MA-104 con RRV1 o RRV2 a una MOI de 5 y se adicionaron las distintas drogas a la concentración indicada. A las 18 hpi se determinó el rendimiento del genoma viral por electroforesis de ARNcd, tinción con nitrato de plata y densitometría. El ARNcd de la clona RRV1 no se detectó cuando fue tratado con benzimidazol a una concentración de 16 mM y quinolina a una concentración de 10 mM. El ARNcd de la clona RRV1 disminuye en presencia de benzotriazol a una concentración de 16 mM, imidazol 60 mM y trifenilmetano a una concentración de 16  $\mu$ M, ver figura 4. El ARNcd de la clona RRV2 no se detectó cuando la clona es tratada con 16 mM de benzimidazol y 10 mM de quinolina, ver figura 5.



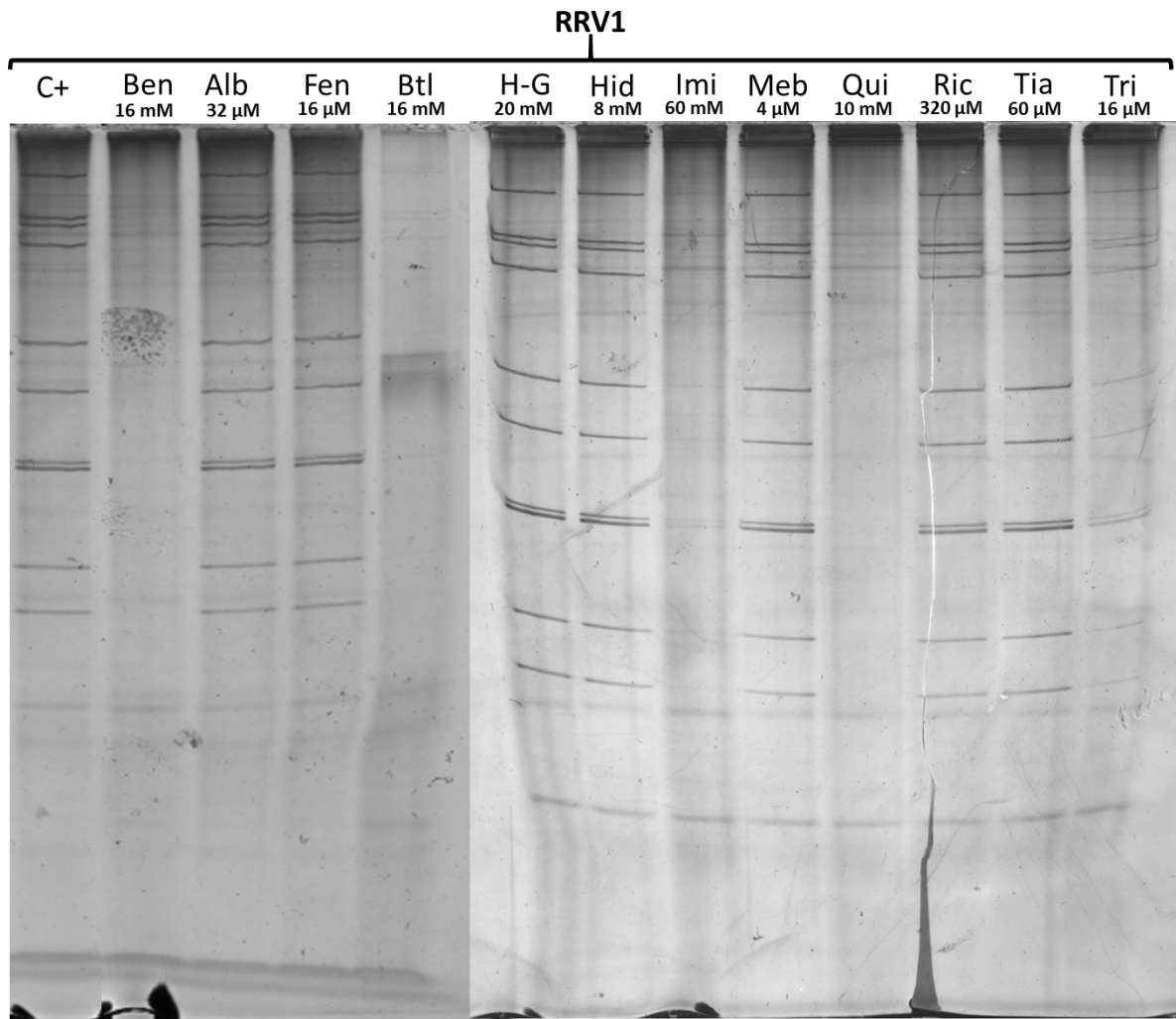


Figura 4. Inhibición de la replicación del ARNcd de RRV1. Células MA-104 confluentes en placas de 6 pozos fueron infectadas con RRV1 a una MOI de 5, el primer carril se utilizó como testigo positivo, a las 2 hpi en los carriles 2 al 13 se añadieron las concentraciones indicadas de benzimidazol (Ben), albendazol (Alb), fenbendazol (Fen), benzotriazol (Btl), hidrocloreuro de guanidina (H-G), hidantoína (Hid), imidazol (Imi), mebendazol (Meb), quinolina (Qui), ricobendazol (Ric), tiabendazol (Tia) o trifenilmetano (Tri). Las células fueron cosechadas a las 18 hpi y el ARNcd fue extraído y procesado mediante gel de poliacrilamida y teñido con nitrato de plata.

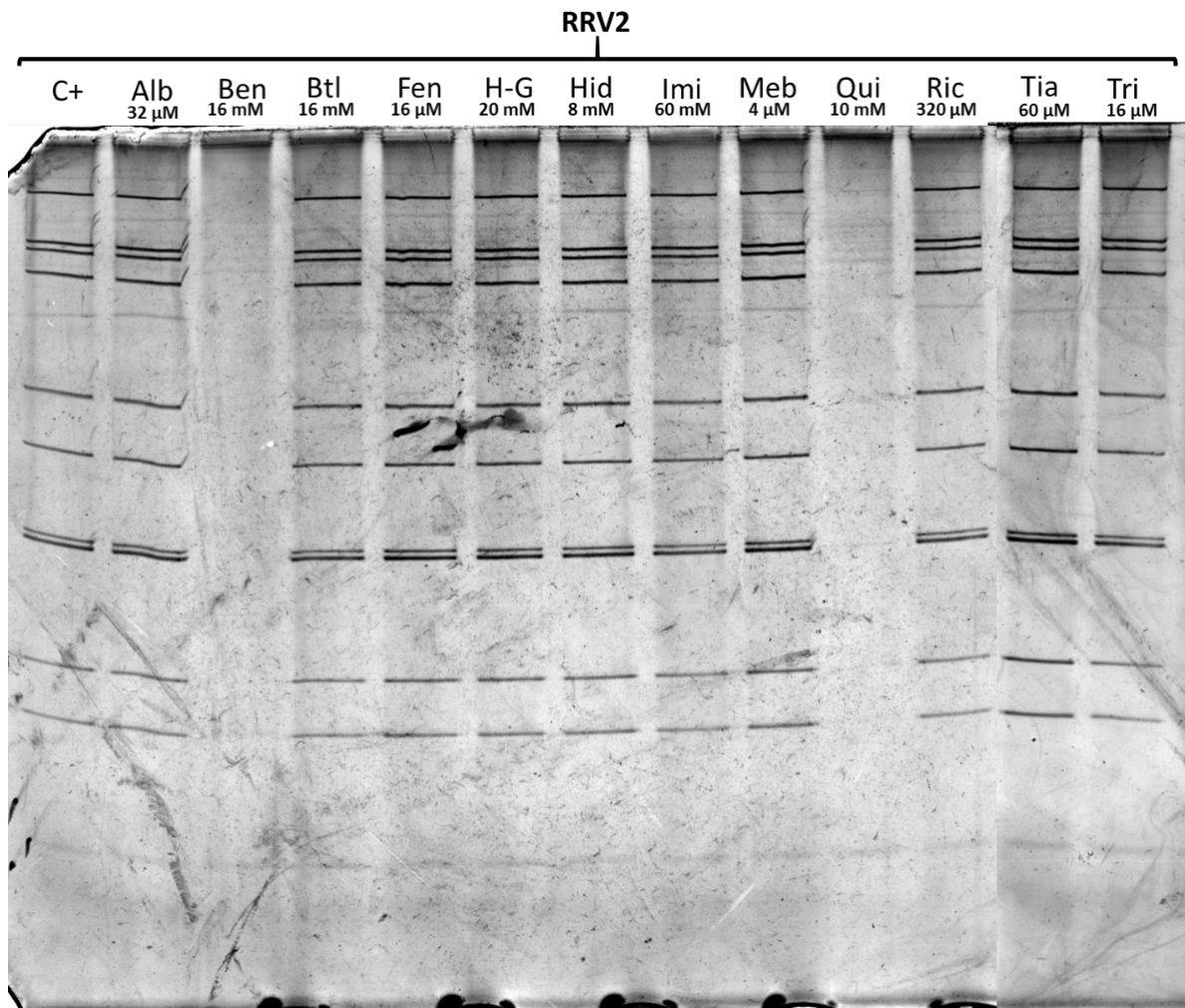


Figura 5. Inhibición de la replicación del ARNcd de RRV2. Células MA-104 confluentes en placas de 6 pozos fueron infectadas con RRV2 a una MOI de 5, el primer carril se utilizó como testigo positivo, a las 2 hpi en los carriles 2 al 13 se añadieron las concentraciones indicadas de albendazol (Alb), benzimidazol (Ben), benzotriazol (Btl), fenbendazol (Fen), hidrocloreuro de guanidina (H-G), hidantoína (Hid), imidazol (Imi), mebendazol (Meb), quinolina (Qui), ricobendazol (Ric), tiabendazol (Tia) o trifenilmetano (Tri). Las células fueron cosechadas a las 18 hpi y el ARNcd fue extraído y procesado mediante gel de poliacrilamida y teñido con nitrato de plata.

Determinación de la dosis inhibitoria 50% de benzimidazol y quinolina sobre la replicación del ARNcd de las cepas RRV1 y RRV2

Luego de identificar a benzimidazol y quinolina como las únicas drogas capaces de inhibir la replicación del ARNcd de las dos clonas RRV1 y RRV2, se determinaron las dosis inhibitorias 50% de estas dos drogas. Para este fin se infectaron células MA-104 con RRV1 o RRV2 a una MOI de 1, se adicionaron distintas concentraciones de benzimidazol o quinolina y a las 18 hpi se determinó el rendimiento del genoma viral por electroforesis de ARNcd, tinción con nitrato de plata y densitometría. A partir de tres ensayos independientes se encontró que la dosis inhibitoria 50% de benzimidazol sobre RRV1 es de 3.2 mM y para RRV2 es de 5.7 mM, ver figuras 6 y 8. Benzimidazol inhibe totalmente la replicación del ARNcd a una concentración de 16 mM tanto para RRV1 como para RRV2. Además, benzimidazol a una concentración de 8 mM inhibe totalmente el ARNcd para RRV1 y solamente de manera parcial para RRV2. Finalmente, benzimidazol a una concentración de 4 mM no inhibe el ARNcd para RRV2 y solamente de manera parcial para RRV1. Por otro lado, la dosis inhibitoria 50% de quinolina sobre RRV1 es de 1.9 mM y para RRV2 es de 2.6 mM, ver figuras 7 y 9. Quinolina a una concentración de 10 mM inhibe completamente el ARNcd de RRV1 y de manera parcial el de RRV2. Además, quinolina a una concentración de 5 mM no inhibe el ARNcd de RRV2, pero inhibe el de RRV1. Finalmente, quinolina a una concentración de 2.5 mM no inhibe el ARNcd de RRV1 ni de RRV2.

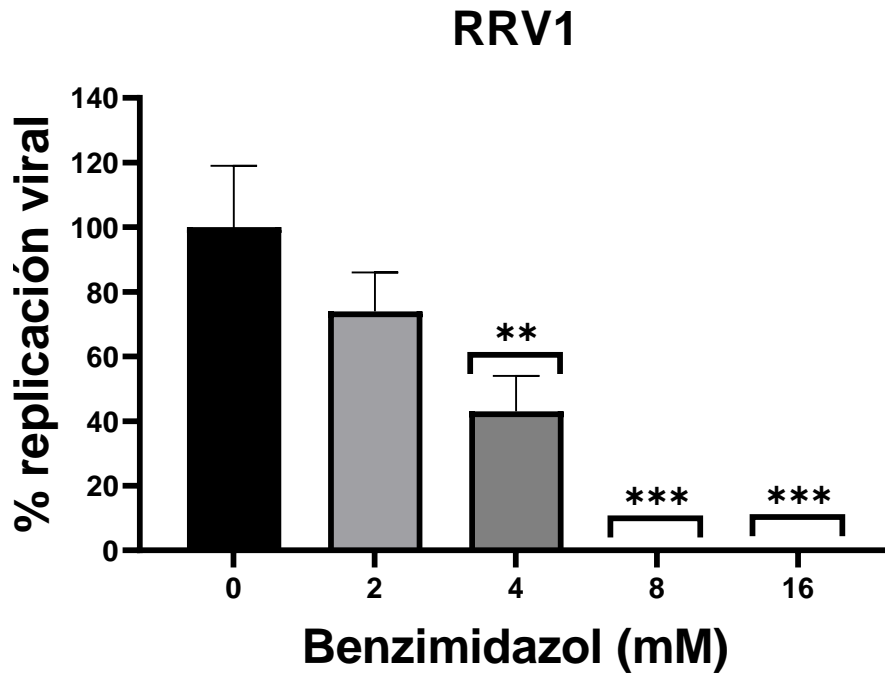


Figura 6. Benzimidazol inhibe la replicación de RRV1. Células MA-104 confluentes en placas de 6 pozos fueron infectadas con una MOI = 1 de RRV1, 2 hpi se añadieron 0, 2, 4, 8 o 16 mM de benzimidazol. Las células fueron cosechadas a las 18 hpi y el ARN fue extraído y procesado mediante gel de poliacrilamida y teñido con nitrato de plata. La cantidad de ARNcd viral fue medido mediante densitometría con base en tres ensayos independientes. Los datos son presentados como medias  $\pm$  la desviación estándar (\*\* =  $P < 0.01$ , \*\*\* =  $P < 0.001$ , prueba t de student).

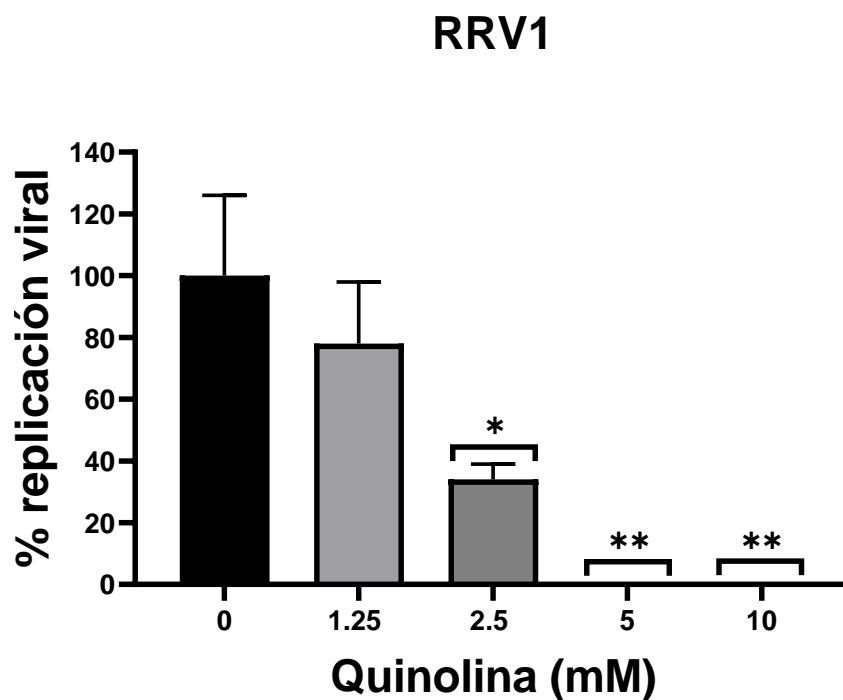


Figura 7. Quinolona inhibe la replicación de RRV1. Células MA-104 confluentes en placas de 6 pozos fueron infectadas con una MOI = 1 de RRV1, 2 hpi se añadieron 0, 1.25, 2.5, 5 o 10 mM de quinolona. Las células fueron cosechadas a las 18 hpi y el ARN fue extraído y procesado mediante gel de poliacrilamida y teñido con nitrato de plata. La cantidad de ARNcd viral fue medido mediante densitometría con base en tres ensayos independientes. Los datos son presentados como medias  $\pm$  la desviación estándar (( $*$  =  $P < 0.1$ ,  $**$  =  $P < 0.01$ , prueba t de student).

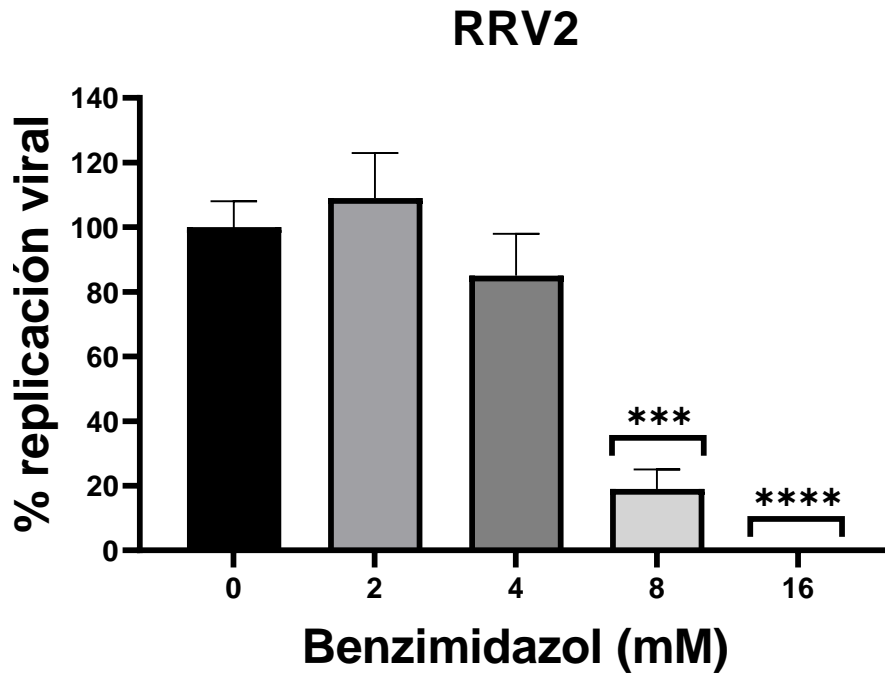


Figura 8. Benzimidazol inhibe la replicación de RRV2. Células MA-104 confluentes en placas de 6 pozos fueron infectadas con una MOI = 1 de RRV2, 2 hpi se añadieron 0, 2, 4, 8 o 16 mM de benzimidazol. Las células fueron cosechadas a las 18 hpi y el ARN fue extraído y procesado mediante gel de poliacrilamida y teñido con nitrato de plata. La cantidad de ARNcd viral fue medido mediante densitometría con base en tres ensayos independientes. Los datos son presentados como medias  $\pm$  la desviación estándar (\*\*\*) =  $P < 0.001$ , \*\*\*\* =  $P < 0.0001$ , prueba t de student).

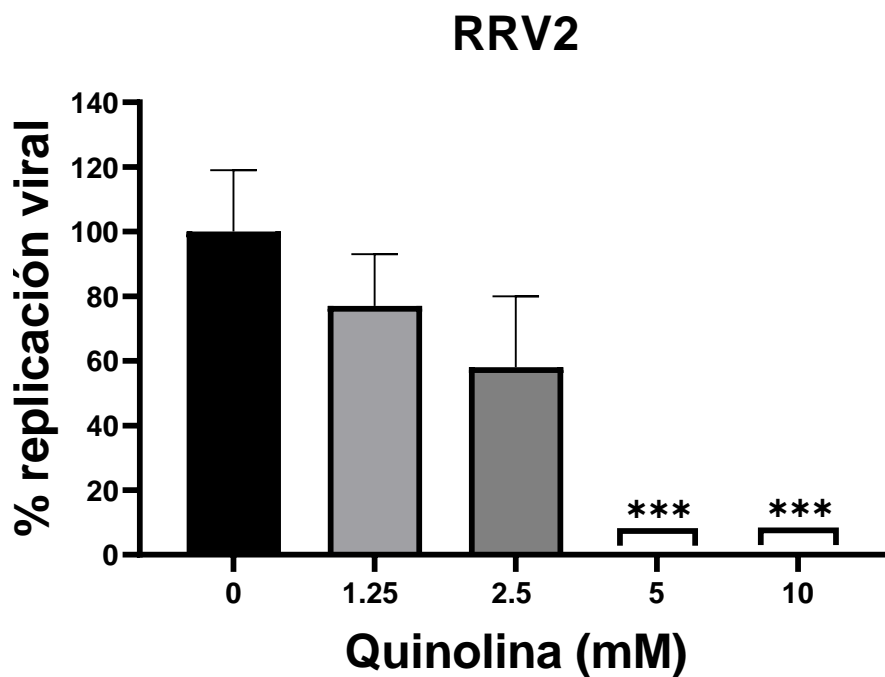


Figura 9. Quinolina inhibe la replicación de RRV2. Células MA-104 confluentes en placas de 6 pozos fueron infectadas con una MOI = 1 de RRV2, 2 hpi se añadieron 0, 1.25, 2.5, 5 o 10 mM de quinolina. Las células fueron cosechadas a las 18 hpi y el ARN fue extraído y procesado mediante gel de poliacrilamida y teñido con nitrato de plata. La cantidad de ARNcd viral fue medido mediante densitometría con base en tres ensayos independientes. Los datos son presentados como medias  $\pm$  la desviación estándar (\*\*\*) =  $P < 0.001$ , prueba t de student).

### Selección de mutantes resistentes de RRV1 y RRV2 a benzimidazol y quinolina

Con el fin de obtener mutantes de rotavirus resistentes a las dos drogas que inhiben su replicación, se realizaron 12 pases selectivos de RRV1 o RRV2 en presencia de concentraciones inhibitorias de benzimidazol o quinolina. Así se obtuvieron tres cepas derivadas de RRV1: RRV1-B12b seleccionada con benzimidazol, así como RRV1-Q12b y RRV1-Q12a seleccionadas con quinolina. También se obtuvieron tres cepas derivadas de RRV2: RRV2-B12b y RRV2-B12a seleccionadas con benzimidazol, así como RRV2-Q12b seleccionada con quinolina. Posteriormente se realizaron ensayos de inhibición de ARNcd para identificar cuales cepas, luego del proceso de selección, resisten al tratamiento (figuras 10 a la 15).

La replicación de ARNcd de la cepa RRV1-B12b resiste el efecto de 8 mM de benzimidazol alrededor de un 27%, mientras que la cepa silvestre es inhibida completamente cuando se le aplica el mismo tratamiento, ver figura 10. Por otro lado, la replicación de ARNcd de las cepas RRV1-Q12a y RRV1-Q12b es inhibido con 5 mM de quinolina, ver figuras 11 y 12.

La replicación de ARNcd de la cepa RRV2-B12a resiste un 72% el efecto de benzimidazol 8 mM, mientras que la cepa silvestre resiste la inhibición alrededor de un 14%, ver figura 13. Por otro lado, la replicación de ARNcd de la cepa RRV2-B12b no resiste el efecto de benzimidazol 8 mM, más allá de lo que la cepa silvestre lo hace, ver figura 14. Finalmente, la replicación de ARNcd de la cepa RRV2-Q12b no resiste el tratamiento con quinolina 5 mM, ver figura 15.



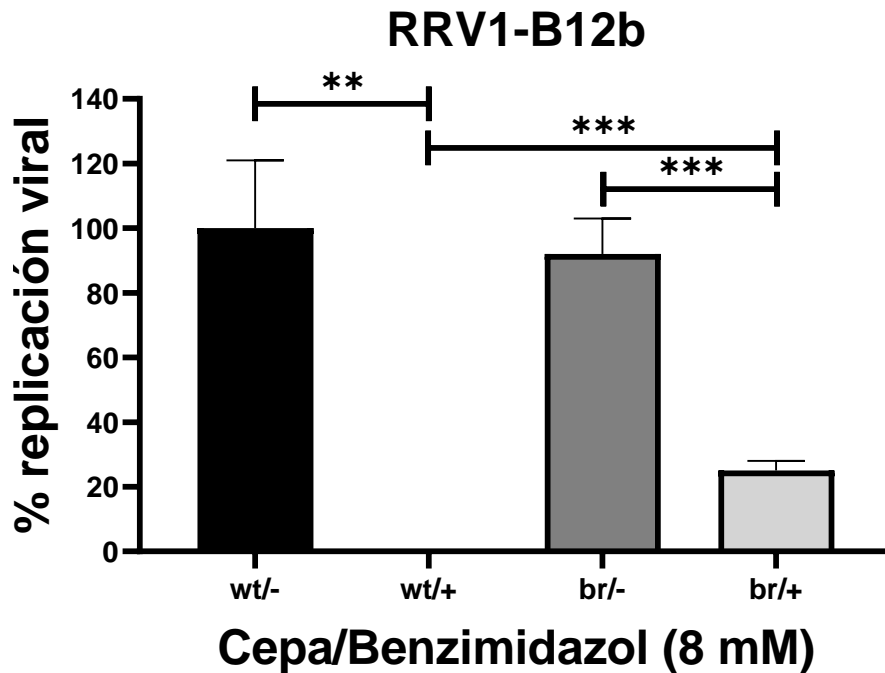


Figura 10. RRV1-B12b resiste parcialmente el tratamiento con benzimidazol 8 mM. Células MA-104 confluentes en placas de 6 pozos fueron infectadas con RRV1-B12b (br) o RRV1 (wt) a una MOI de 1, y a las 2 hpi se agregó o no benzimidazol 8 mM. A las 18 hpi el ARN fue extraído, procesado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y teñido con nitrato de plata. La cantidad de ARNcd viral fue medida mediante densitometría con base en tres ensayos independientes. Los datos se presentan como la media más menos la desviación estándar (\*\* =  $P < 0.01$ , \*\*\* =  $P < 0.001$ , prueba t de student).

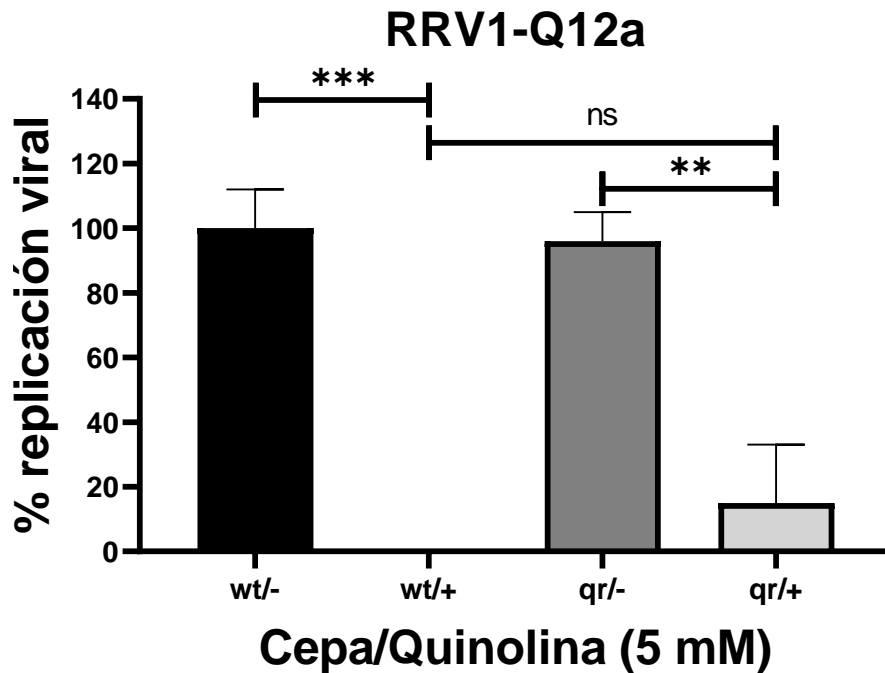


Figura 11. RRV1-Q12a no resiste el tratamiento con quinolina 5 mM. Células MA-104 confluentes en placas de 6 pozos fueron infectadas con RRV1-Q12a (qr) o RRV1 (wt) a una MOI de 1, y a las 2 hpi se agregó o no quinolina 5 mM. A las 18 hpi el ARN fue extraído, procesado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y teñido con nitrato de plata. La cantidad de ARNcd viral fue medida mediante densitometría con base en tres experimentos independientes. Los datos se presentan como la media más menos la desviación estándar (\*\* =  $P < 0.01$ , \*\*\* =  $P < 0.001$ , ns = no significancia, prueba t de student).

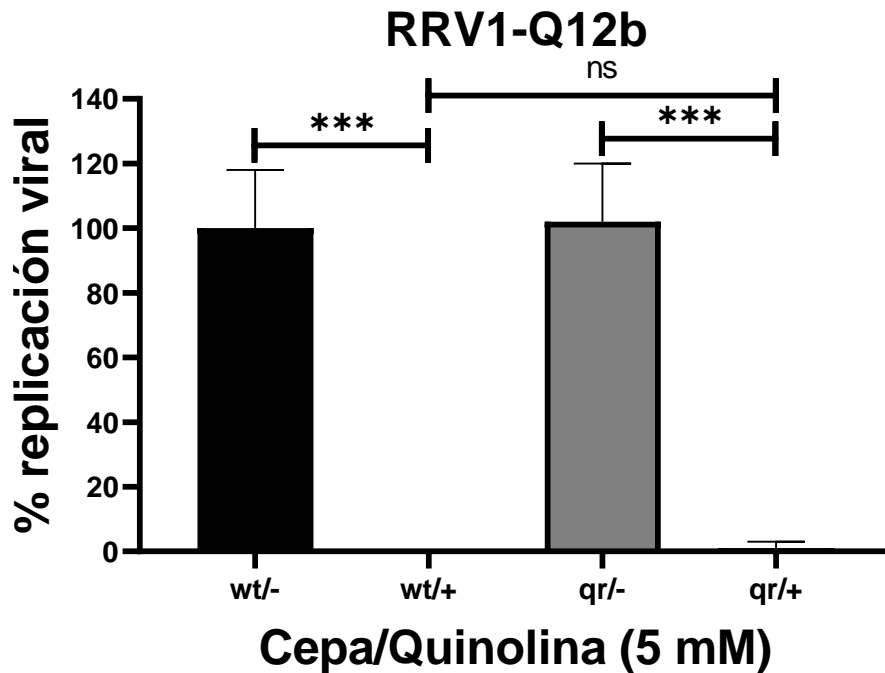


Figura 12. RRV1-Q12b no resiste el tratamiento con quinolina 5 mM. Células MA-104 confluentes en placas de 6 pozos fueron infectadas con RRV1-Q12b (qr) o RRV1 (wt) a una MOI de 1, y a las 2 hpi se agregó o no quinolina 5 mM. A las 18 hpi el ARN fue extraído, procesado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y teñido con nitrato de plata. La cantidad de ARNcd viral fue medida mediante densitometría con base en tres experimentos independientes. Los datos se presentan como la media más menos la desviación estándar (\*\* =  $P < 0.01$ , \*\*\* =  $P < 0.001$ , ns = no significancia, prueba t de student).

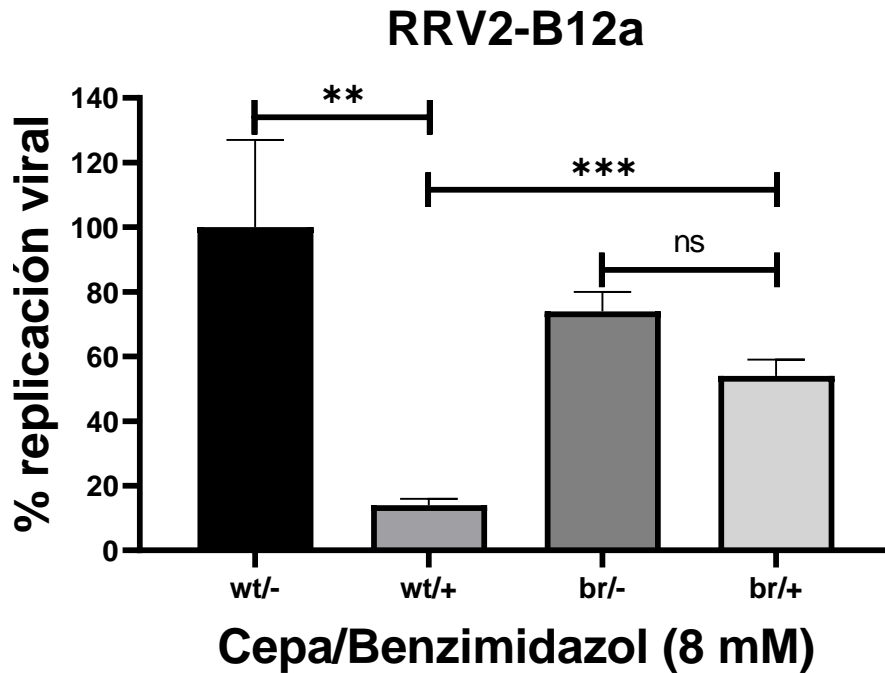


Figura 13. RRV2-B12a resiste el tratamiento con benzimidazol 8 mM. Células MA-104 confluentes en placas de 6 pozos fueron infectadas con RRV2-B12a (br) o RRV2 (wt) a una MOI de 1, y a las 2 hpi se agregó o no benzimidazol 8 mM. A las 18 hpi el ARN fue extraído, procesado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y teñido con nitrato de plata. La cantidad de ARNcd viral fue medida mediante densitometría con base en tres experimentos independientes. Los datos se presentan como la media más menos la desviación estándar (\*\* =  $P < 0.01$ , \*\*\* =  $P < 0.001$ , ns = no significancia, prueba t de student).

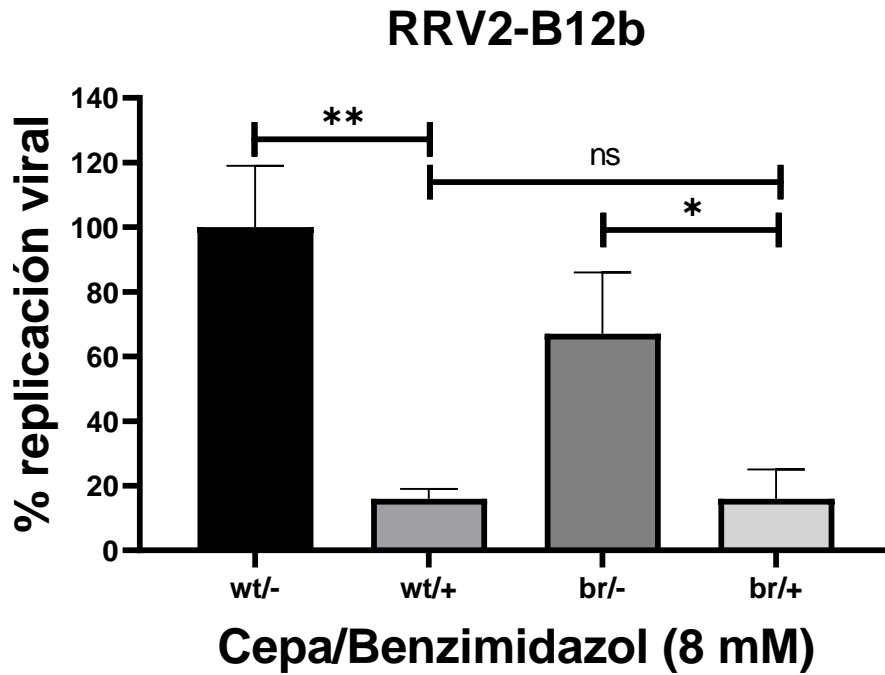


Figura 14. RRV2-B12b no resiste el tratamiento con benzimidazol 8 mM. Células MA-104 confluentes en placas de 6 pozos fueron infectadas RRV2-B12b (br) o RRV2 (wt) a una MOI de 1, y a las 2 hpi se agregó o no benzimidazol 8 mM. A las 18 hpi el ARN fue extraído, procesado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y teñido con nitrato de plata. La cantidad de ARNcd viral fue medida mediante densitometría con base en tres experimentos independientes. Los datos se presentan como la media más menos la desviación estándar (\* =  $P < 0.1$ , \*\* =  $P < 0.01$ , ns = no significancia, prueba t de student).

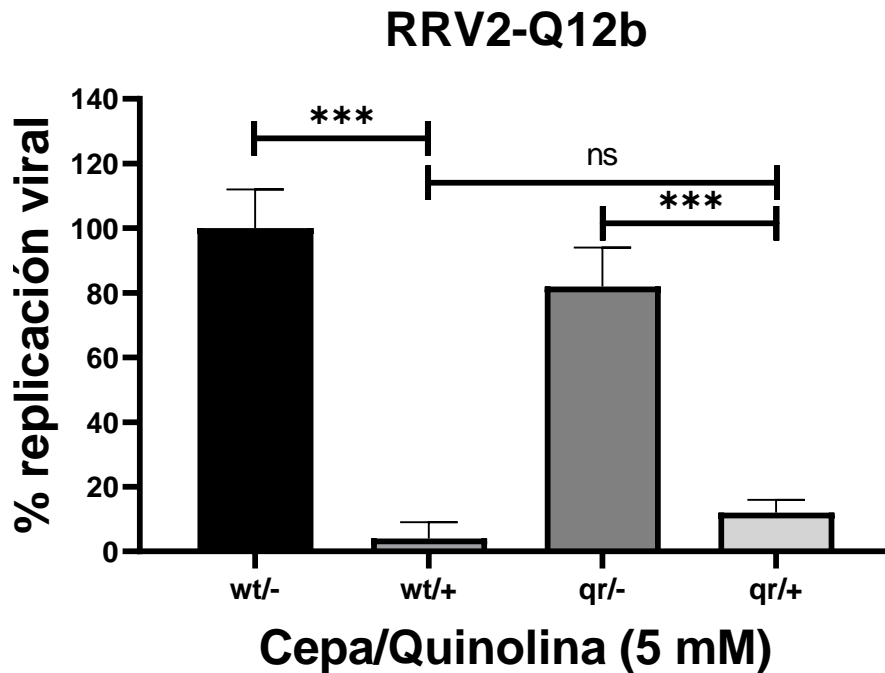


Figura 15. RRV2-Q12b no resiste el tratamiento con quinolina 5 mM. Células MA-104 confluentes en placas de 6 pozos fueron infectadas con RRV2-Q12b (qr) o RRV2 (wt) a una MOI de 1, y a las 2 hpi se agregó o no quinolina 5 mM. A las 18 hpi el ARN fue extraído, procesado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y teñido con nitrato de plata. La cantidad de ARNcd viral fue medida mediante densitometría con base en tres experimentos independientes. Los datos se presentan como la media más menos la desviación estándar (\*\*\*) =  $P < 0.001$ , ns = no significancia, prueba t de student).

### Secuenciación del genoma de las mutantes resistentes a benzimidazol (RRV1-B12b y RRV2-B12a) y sus respectivas cepas silvestres (RRV1 y RRV2)

Con el fin de identificar al gen blanco de benzimidazol se purificaron por sedimentación en gradientes de sacarosa las cepas silvestres RRV1 y RRV2, así como sus mutantes seleccionadas durante 12 pases seriados en presencia de la droga, RRV1-B12b y RRV2-B12a. Para minimizar la contaminación con ADN o ARN celulares se trataron los virus con desoxirribonucleasa y ribonucleasas, y posteriormente se extrajeron y purificaron sus ácidos nucleicos. Finalmente se realizó secuenciación de cada cepa por RNAseq. Por cada cepa secuenciada se obtuvieron 2 archivos FASTQ que en conjunto contenían más de 25 millones de lecturas, con una longitud de 76 nt y un valor de Q mayor a 30 por base ver tabla 4.

Tabla 4. Lecturas obtenidas de cada genoma luego del proceso de secuenciación.

Muestra	Archivos FASTQ	# de lecturas	Longitud de lecturas	Valor Q
RRV1	RRV1_R1	33,480,576	76	> 30
	RRV1_R2			
RRV1-B12b	RRV1-B12b_R1	25,086,446	76	> 30
	RRV1-B12b_R2			
RRV2	RRV2_R1	25,652,142	76	> 30
	RRV2_R2			
RRV2-B12a	RRV2-B12a_R1	26,955,090	76	> 30
	RRV2-B12a_R2			

### Reconstrucción de los genomas de las cepas mutantes y silvestre e identificación de mutaciones en las cepas mutantes

Se logró obtener por lo menos una cobertura del 99.94% para cada genoma. Los nucleótidos faltantes fueron  $\leq 5$  en posiciones no traducidas y conservadas de los extremos 5' o 3' de algunos segmentos. El valor promedio de profundidad alcanzado fue  $\geq 5,817$  con una desviación estándar de 2,127 para cada muestra. En el anexo VI se indica el número de nucleótidos y la cobertura obtenidos de cada segmento genómico y de cada genoma. Se indican los nucleótidos faltantes de cada segmento genómico. También se indica la profundidad con su desviación estándar de cada genoma.

Al comparar la secuencia de nucleótidos de los genomas de la mutante RRV1-B12b y la cepa silvestre RRV1 se observaron 3 mutaciones en el segmento 2 (todas ellas transiciones) y una

mutación en el segmento 3 (una transversión), y todas estas son bases mixtas donde una de ellas es compartida con la cepa silvestre, ver tabla 5.

Al comparar la secuencia de nucleótidos de los genomas de la mutante RRV2-B12a y la cepa silvestre RRV2 se observaron 4 mutaciones en el segmento 2 y una mutación en cada uno de los segmentos 3, 7 u 11, siendo todas estas bases mixtas donde una de las dos es compartida con la cepa silvestre, ver tabla 5. De las 7 mutaciones en RRV2-B12a una en el segmento 2 es una transversión y las 6 restantes son transiciones.

Interesantemente, solo una mutación en el segmento 2 del genoma viral (G2,414 → R[G/A]) es compartida por las dos mutantes, ver tabla 5.

Tabla 5. Ubicación y tipo de cambios nucleotídicos observados en la cepa mutante RRV1-B12b vs su respectiva cepa silvestre RRV1 y la cepa mutante RRV2-B12a vs su respectiva cepa silvestre RRV2.

Segmento genómico*	RRV1	RRV1-B12b	RRV2	RRV2-B12a
1/VP1/3302 nt	--	--	--	--
2/VP2/2708 nt	1209 (C) 2375 (G) <b>2414 (G)*</b>	1209 (Y) 2375 (R) <b>2414 (R)*</b>	410 (A) 502 (G) <b>2414 (G)*</b> 2452 (T)	410 (M) 502 (R) <b>2414 (R)*</b> 2452 (Y)
3/VP3/2591 nt	1517 (A)	1517 (M)	2540 (T)	2540 (Y)
4/VP4/2362 nt	--	--	--	--
5/NSP1/1600 nt	--	--	--	--
6/VP6/1356 nt	--	--	--	--
7/NSP3/1078 nt	--	--	371 (A)	371 (R)
8/NSP2/1059 nt	--	--	--	--
9/VP7/1062 nt/	--	--	--	--
10/NSP4/750 nt	--	--	--	--
11/NSP5 - NSP6/667 nt	--	--	162 (A)	162 (R)

\* GenBank: EU636924-EU636934. nt = nucleótidos. A = adenina; G = guanina; C = citocina; T = timina; Y = C o T; R = G o A; M = A o C.

Las 4 mutaciones observadas en la cepa RRV1-B12b se traducen en cambios de aminoácido (mutaciones no sinónimas) de estas solo el cambio de aminoácido del residuo 398 de VP2 es un cambio de aminoácido no conservado. En el caso de las 7 mutaciones observadas en la cepa RRV2-B12a solo 5 se traducen en cambios de aminoácido (mutaciones no sinónimas) de estas solo el cambio de aminoácido del residuo 116 de NSP3 es un cambio de aminoácido no conservado. En el caso de la mutación observada en la posición 162 en el segmento 11, esta solo se traduce en un cambio de aminoácido (mutación no sinónima) en la proteína NSP6 y no en la proteína NSP5, ya que este segmento codifica a ambas proteínas en marcos de



lectura traslapados. El cambio nucleotídico observado en la posición 2,414 del segmento 2 de ambas mutantes se traduce a un cambio de aminoácido mixto (D/N) en el residuo 800 de la proteína VP2. En la tabla 6 se indica la deducción a aminoácidos de los cambios nucleotídicos observados en a tabla 5.

Tabla 6. Ubicación y tipo de cambios de aminoácidos observados entre la cepa mutante RRV1-B12b vs su respectiva cepa silvestre RRV1 y la cepa mutante RRV2-B12a vs su respectiva cepa silvestre RRV2.

Seg. Genómico■	RRV1	RRV1-B12b	RRV2	RRV2-B12a
1/VP1/1088 aa	--	--	--	--
2/VP2/ 887 aa	398 (T) 787 (A) <b>800 (D)*</b>	398 (T/I)● 787 (A/T) <b>800 (D/N)*</b>	132 (I) 162 (L) ♦ <b>800 (D)*</b> 812 (D) ♦	132 (I/L) 162 (L) ♦ <b>800 (D/N)*</b> 812 (D) ♦
3/VP3/835 aa	490 (I)	490 (I/L)	831 (F)	831 (F/L)
4/VP4/776 aa	--	--	--	--
5/NSP1/501 aa	--	--	--	--
6/VP6/397 aa	--	--	--	--
7/NSP3/313 aa	--	--	116 (K)	116 (K/E)●
8/NSP2/317 aa	--	--	--	--
9/VP7/326 aa	--	--	--	--
10/NSP4/175 aa	--	--	--	--
11/NSP5-NSP6/198 aa-92 aa	--	--	47 (A) [NSP5] ♦ 28 (H) [NSP6]	47 (A) [NSP5] ♦ 28 (R) [NSP6]

■ GenBank: EU636924-EU636934 aa = aminoácidos; I = isoleucina; L = leucina; D = ácido aspártico; N = asparagina; F = fenilalanina; K = lisina; E = ácido glutámico; H = histidina; R = arginina; T = treonina; A = alanina. ♦ indica que no hubo cambio de aminoácido con el cambio de nucleótido observado en la tabla 7. \* indica el cambio de aminoácido compartido entre las mutantes. ● indica cambio de aminoácido no conservado.

#### Localización de los cambios de aminoácido en modelos 3D de las proteínas afectadas

En el anexo VII se indican los modelos 3D construidos de cada proteína afectada por las mutaciones, las referencias utilizadas, los valores de GMQE (del inglés Global Model Quality Estimation), QMEAN (del inglés Qualitative Model Energy Analysis) y el porcentaje de cobertura e identidad de cada modelo obtenido con respecto a su referencia. En las figuras 16 a la 21, se muestran las posiciones relativas y los valores de  $\Delta\Delta G$  de cada mutación.

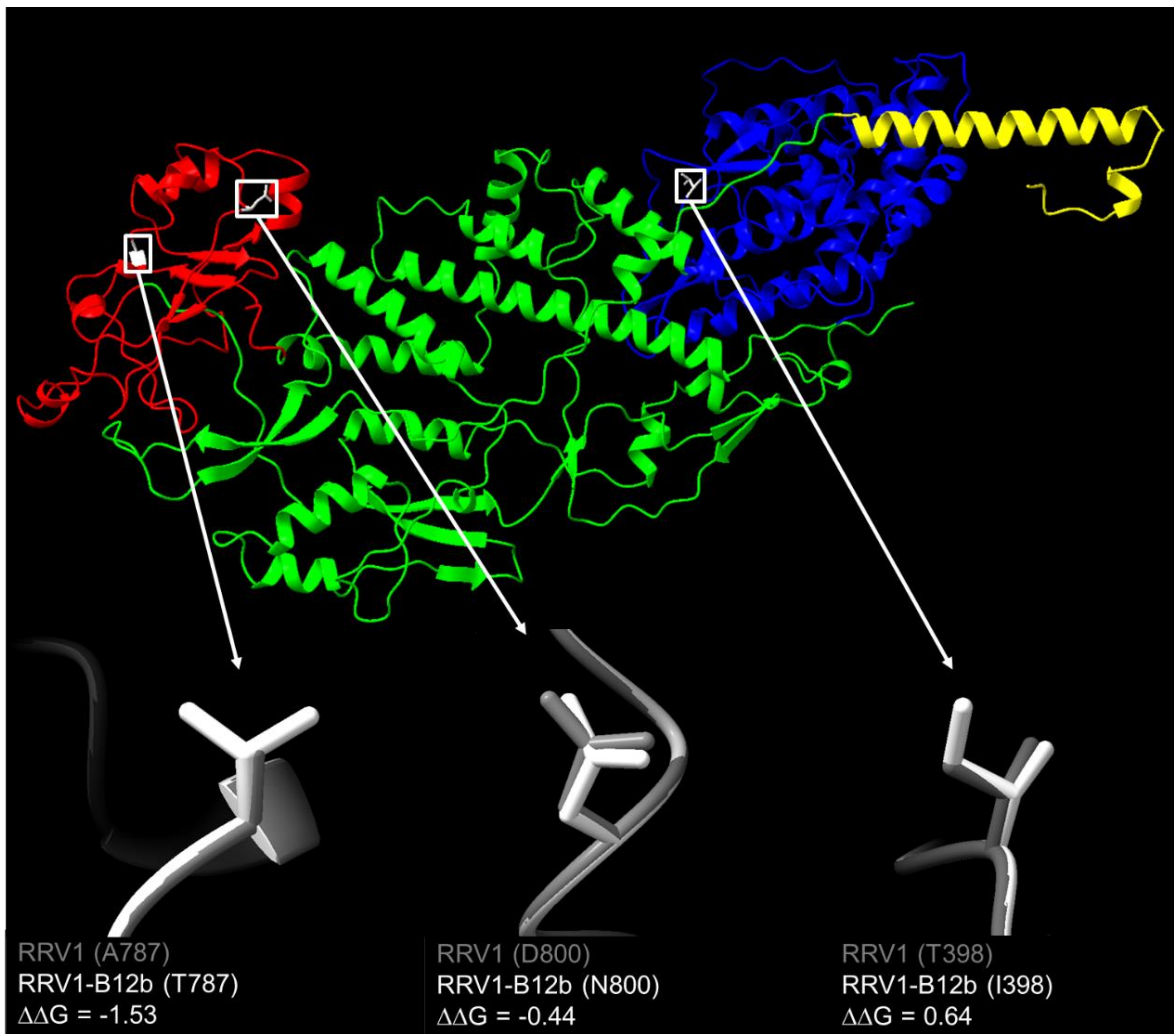


Figura 16. Localización de las mutaciones en VP2 de RRV1-B12b. Las secuencias de nucleótidos del segmento 2 de RRV1 y de RRV1-B12b se tradujeron a aminoácidos y se construyeron los respectivos modelos 3D, posteriormente se superpusieron y se localizaron las mutaciones en VP2 de RRV1-B12b, también se calculó el  $\Delta\Delta G$  de cada mutación. En color amarillo el extremo N-terminal, del dominio principal se indica: en color azul la región apical, en color verde la región central y en color rojo la región de dimerización. Con un cuadro blanco se indica la posición relativa de cada una de las mutaciones observadas en VP2 de RRV1-B12b. La superposición de la región de cada mutación se indica en color gris para RRV1 y en color blanco para RRV1-B12b. También se indican los valores de  $\Delta\Delta G$  calculados de cada mutación.

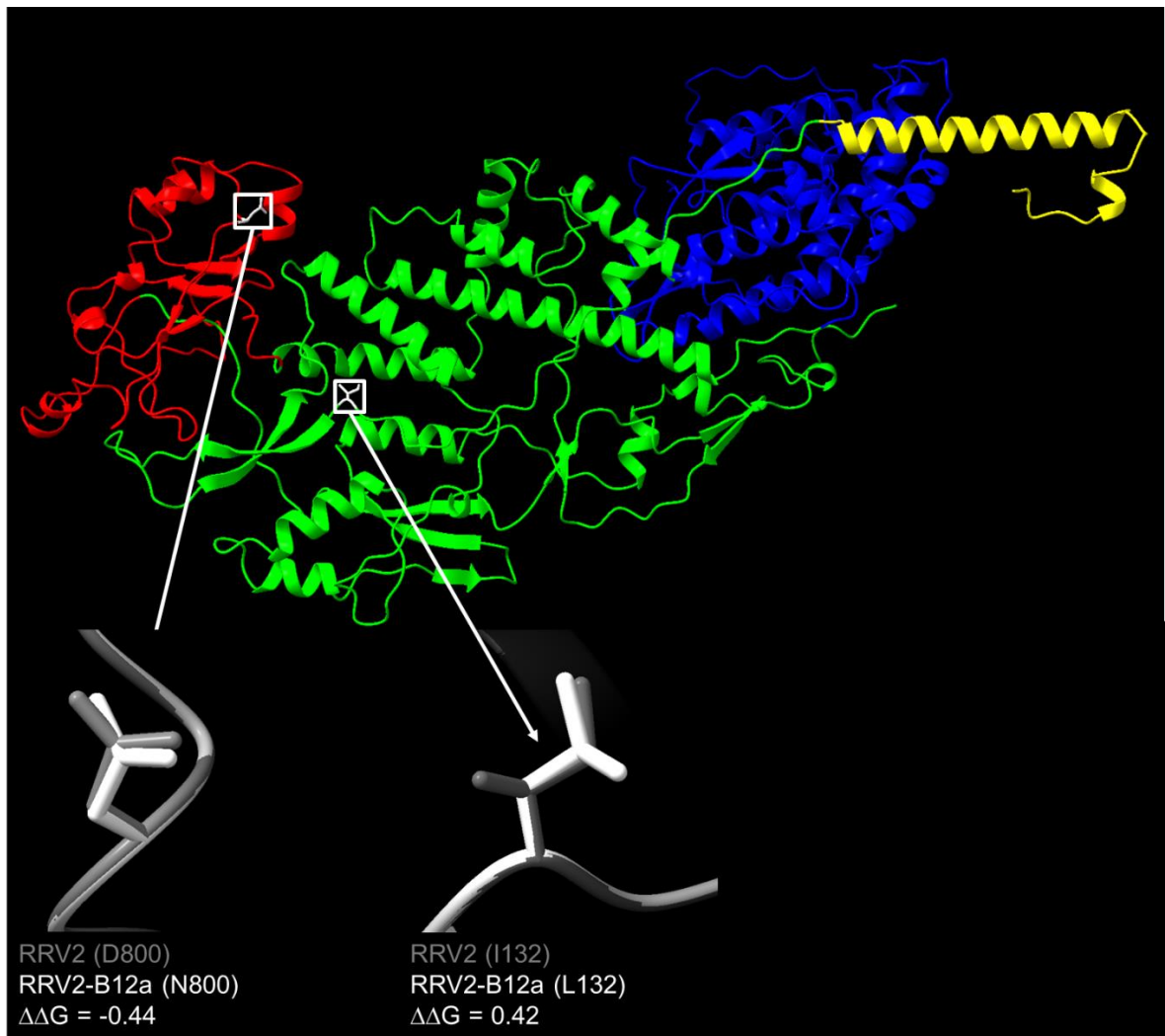


Figura 17. Localización de las mutaciones en VP2 de RRV2-B12a. Las secuencias de nucleótidos del segmento 2 de RRV2 y de RRV2-B12a se tradujeron a aminoácidos y se construyeron los respectivos modelos 3D, posteriormente se superpusieron y se localizaron las mutaciones en VP2 de RRV2-B12a, también se calculó el  $\Delta\Delta G$  de cada mutación. En color amarillo se indica el extremo N-terminal, del dominio principal se indica: en color azul la región apical, en color verde la región central y en color rojo la región de dimerización. Con un cuadro blanco se indica la posición relativa de cada una de las mutaciones observadas en VP2 de RRV2-B12a. La superposición de la región de cada mutación se indica en color gris para RRV2 y en color blanco para RRV2-B12a. También se indican los valores de  $\Delta\Delta G$  calculados de cada mutación.



Figura 18. Localización de la mutación en VP3 de RRV1-B12b. Las secuencias de nucleótidos del segmento 3 de RRV1 y de RRV1-B12b se tradujeron a aminoácidos y se construyeron los respectivos modelos 3D, posteriormente se superpusieron y se localizó la mutación en VP3 de RRV1-B12b, también se calculó el  $\Delta\Delta G$  de la mutación. En color rojo se indica el extremo N-terminal, en color verde la región correspondiente al dominio N7-MTase, en color naranja la región correspondiente al dominio 2'-O-MTase, en color azul la región RTPase/GTase y en color rosa la región correspondiente al dominio PDE (fosfodiesterasa). Con un cuadro blanco se indica la posición relativa de la mutación observada en VP3 de RRV1-B12b. La superposición de la región de la mutación se indica en color gris para RRV1 y en color blanco para RRV1-B12b. También se indica el valor de  $\Delta\Delta G$  calculado de la mutación.

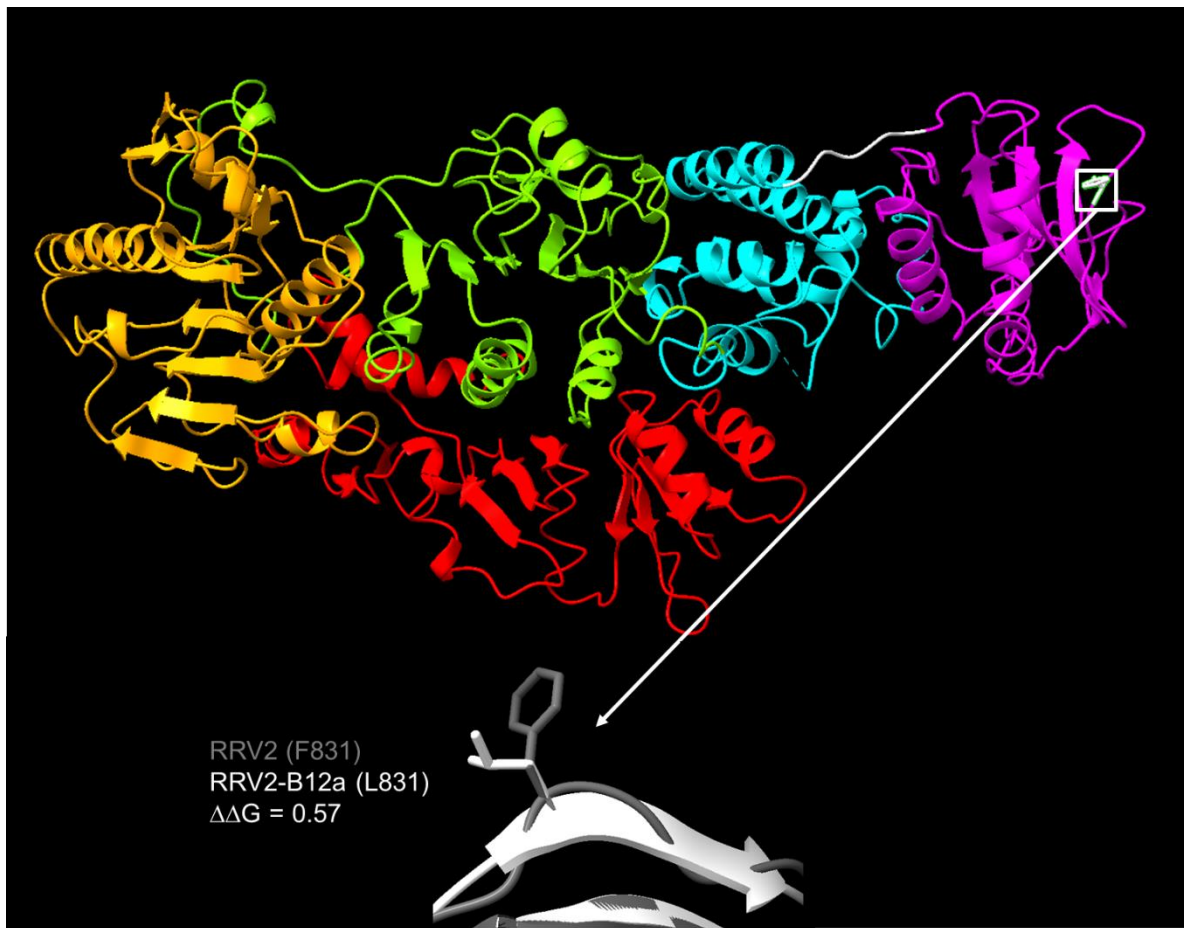


Figura 19. Localización de la mutación en VP3 de RRV2-B12a. Las secuencias de nucleótidos del segmento 3 de RRV2 y de RRV2-B12a se tradujeron a aminoácidos y se construyeron los respectivos modelos 3D, posteriormente se superpusieron y se localizó la mutación en VP3 de RRV2-B12a, también se calculó el  $\Delta\Delta G$  de dicha mutación. En color rojo se indica el extremo N-terminal, en color verde la región correspondiente al dominio N7-MTase, en color naranja la región correspondiente al dominio 2'-O-MTase, en color azul la región RTPase/GTase y en color rosa la región correspondiente al dominio PDE. Con un cuadro blanco se indica la posición relativa de la mutación observada en VP3 de RRV2-B12a. La superposición de la región de la mutación se indica en color gris para RRV2 y en color blanco para RRV2-B12a. También se indica el valor de  $\Delta\Delta G$  calculado de la mutación.

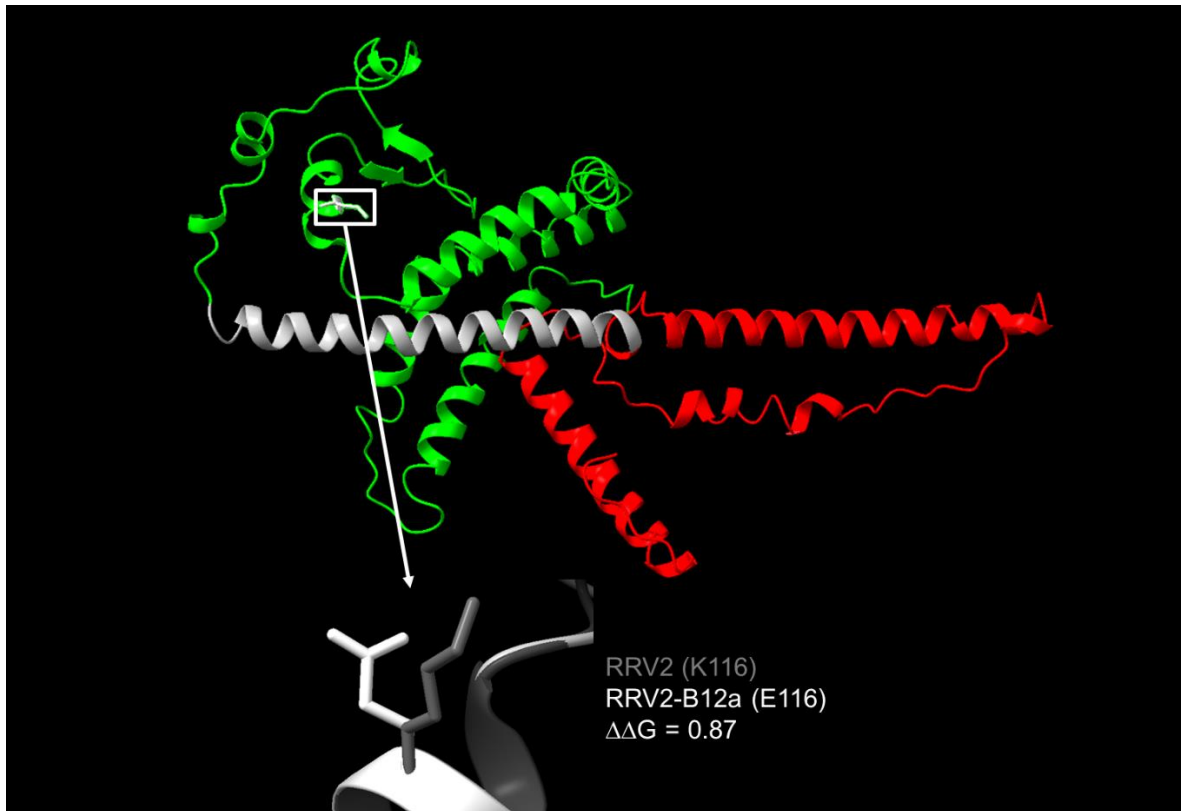


Figura 20. Localización de la mutación en NSP3 de RRV2-B12a. Las secuencias de nucleótidos del segmento 7 de RRV2 y de RRV2-B12a se tradujeron a aminoácidos y se construyeron los respectivos modelos 3D, posteriormente se superpusieron y se localizó la mutación en NSP3 de RRV2-B12a, también se calculó el  $\Delta\Delta G$  de dicha mutación. En color verde se indica el extremo N-terminal (1-170 aa), en color rojo se indica el extremo carboxilo terminal (206-313 aa) y en color blanco se indican los aminoácidos 171-205. Con un cuadro blanco se indica la posición relativa de la mutación observada en NSP3 de RRV2-B12a. La superposición de la región de la mutación se indica en color gris para RRV2 y en color blanco para RRV2-B12a. También se indica el valor de  $\Delta\Delta G$  calculado de la mutación.

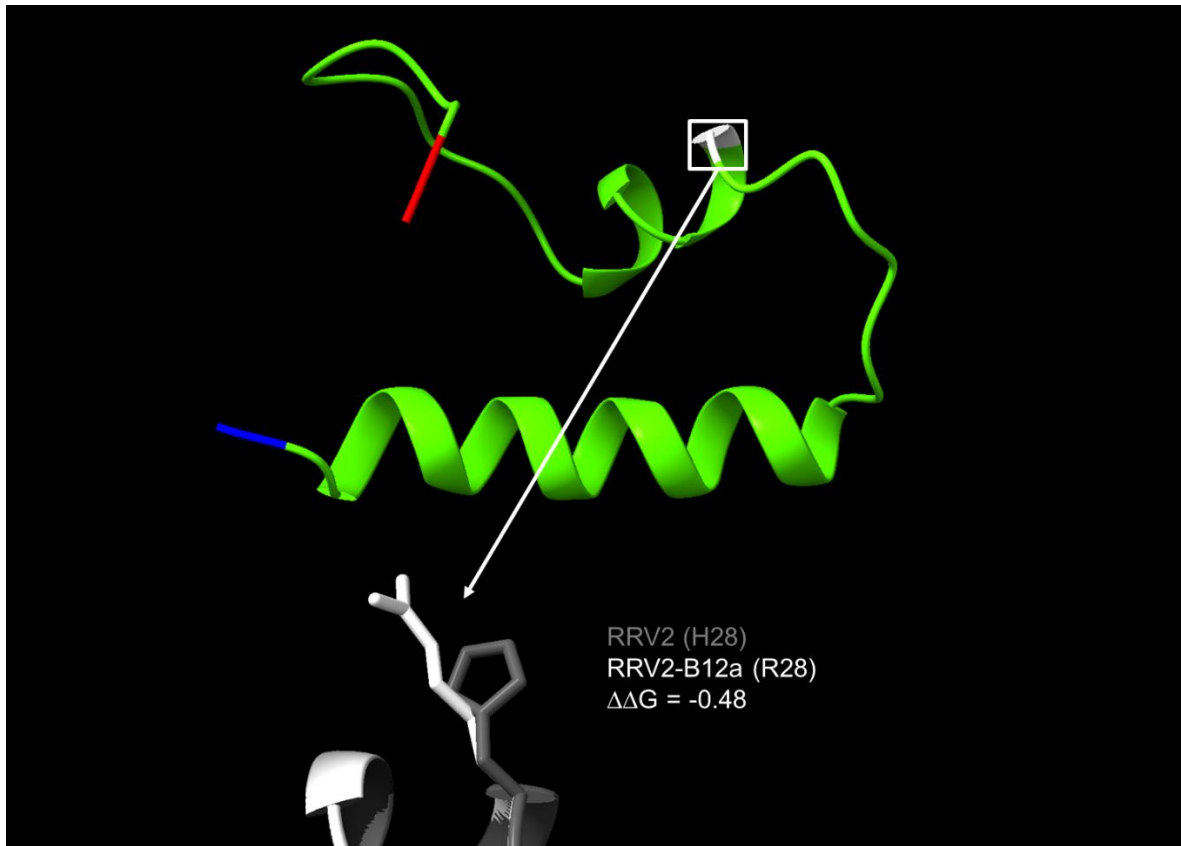


Figura 21. Localización de la mutación en NSP6 de RRV2-B12a. Las secuencias de nucleótidos del segmento 11 de RRV2 y de RRV2-B12a se tradujeron a aminoácidos, se seleccionó el marco de lectura correspondiente a NSP6, y se construyeron los respectivos modelos 3D, posteriormente se superpusieron y se localizó la mutación en NSP6 de RRV2-B12a, también se calculó el  $\Delta\Delta G$  de dicha mutación. En color rojo se indica el extremo N-terminal, en color azul se indica el extremo carboxilo terminal y en color verde se indican los aminoácidos 13-52. Con un cuadro blanco se indica la posición relativa de la mutación observada en NSP6 de RRV2-B12a. La superposición de la región de la mutación se indica en color gris para RRV1 y en color blanco para RRV2-B12a. También se indica el valor de  $\Delta\Delta G$  calculado de la mutación.

## Discusión y conclusiones

En este trabajo se encontró que el benzimidazol inhibe la replicación del ARNcd de dos clonas de la cepa RRV de rotavirus utilizando concentraciones milimolares. En trabajos previos se han identificado derivados de benzimidazol con actividad antirotaviral, sin embargo, ninguno de ellos satisface los requerimientos para ser considerado como un tratamiento efectivo contra rotavirus. En el 2012 (Bassyouni et al., 2012) se evaluó el efecto inhibitorio en la replicación de rotavirus por 8 drogas derivadas de benzimidazol, en dicho trabajo solo 2 de las drogas identificadas como 12a y 12b, inhibieron la replicación de ARNcd de la cepa Wa de rotavirus *in vitro* utilizando concentraciones micromolares. Por otro lado, en el 2015 (Shaker et al., 2015) se evaluó el efecto inhibitorio en la replicación de rotavirus de 17 drogas derivadas del benzimidazol, en dicho trabajo solo 3 de las drogas identificadas como 17a, 17b y 18a, inhibieron la replicación de ARNcd de la cepa Wa de rotavirus *in vitro*, también en concentraciones micromolares. En este estudio encontramos que el benzimidazol a concentraciones milimolares presenta propiedades antirotavirales pero también efecto citotóxico menor al 50%. El benzimidazol por sí solo no es atractivo como droga terapéutica debido a que su efecto inhibitorio de la replicación de rotavirus solo se observa a concentraciones con efecto citotóxico a las 18 hpi, pero si es una droga que puede ser utilizada como herramienta para seleccionar mutantes resistentes a su efecto antirotaviral.

En este trabajo se encontró que la quinolina inhibe la replicación del ARNcd de las dos clonas de RRV a concentraciones milimolares. En 1983 (Bednarz-Prashad and John, 1983) se reportó a un derivado de la quinolina que a concentraciones micromolares presenta propiedades antirotavirales sobre la cepa EDIM de origen murino, en dicho trabajo se especula que el efecto del clioquinol (5-chloro-7-iodo-8-hydroxyquinolinol) se lleva a cabo en el lumen intestinal. Se hipotetiza que, debido a un efecto de quelación de los cationes divalente, modifica la capa más externa de la partícula viral, inhibiendo la capacidad de rotavirus de infectar a las células intestinales. En este estudio encontramos que quinolina tiene efecto antirotaviral a pesar de haber sido añadida posteriormente a la adsorción e internalización de rotavirus, lo que implica que tiene capacidad para inhibir la replicación viral en etapas posteriores a estos eventos. Quinolina a concentraciones milimolares presenta propiedades antirotavirales, pero también efecto citotóxico menor al 50% a las 18 hpi.



Quinolina no es atractivo como droga terapéutica debido a su pobre efecto inhibitorio a concentraciones citotóxicas a las 18 hpi, pero sirve como antecedente para buscar entre sus derivados drogas con efecto antirotaviral.

Luego de 12 pases selectivos en presencia de quinolina no se observó resistencia a esta droga por parte de las cepas seleccionadas, por lo que hasta el momento no se puede responder si es posible seleccionar mutantes resistentes al efecto inhibitorio de quinolina. Por otro lado, 12 pases de replicación viral en presencia de benzimidazol permitieron que las clonas RRV1 y RRV2 adquirieran mutaciones que les confieren resistencia a esta droga. A la fecha no existen reportes de replicación de rotavirus en presencia de quinolina, de benzimidazol o alguno de los derivados de estas dos drogas con fines de generar mutantes resistentes e identificar la proteína viral blanco. La secuenciación del genoma de rotavirus y su asociación con fenotipos de las mutantes temperatura sensibles ha permitido analizar la función de los dominios de algunas de sus proteínas, por ejemplo el dominio N terminal de VP1, en el cual se observó una mutación que se relaciona con disminución en la replicación viral, en la síntesis de ARNcd, en la síntesis de proteínas y en la morfogénesis viral a una temperatura de 39°C (McKell et al., 2017). En este estudio se logró identificar a benzimidazol como una droga que permite seleccionar mutantes resistentes a su efecto inhibitorio sobre la replicación de ARNcd de rotavirus. Secuenciado el genoma completo de las dos mutantes resistentes al efecto inhibitorio de benzimidazol y sus respectivas cepas silvestres se logró identificar el segmento genómico mayormente afectado por esta droga.

La región genómica mayormente afectada por las mutaciones nucleotídicas fue la misma para las dos mutantes, el segmento genómico 2 que codifica para la proteína VP2. De las 7 mutaciones nucleotídicas observadas en el dominio principal de VP2 de las dos mutantes dos de ellas son mutaciones silenciosas (no hay cambio de aminoácido) localizadas en RRV2-B12a, de las 5 mutaciones que se traducen en cambio de aminoácido en las dos mutantes solo una de ellas, observada en RRV1-B12b, es un cambio de aminoácido no conservado mixto (T398T/I). El dominio principal de VP2 es el único dominio de todas las proteínas de rotavirus que presenta más de un cambio de aminoácido, en el residuo 800, se localiza la única mutación que está presente tanto en RRV1-B12b como en RRV2-B12a. El número de mutaciones nucleotídicas y su localización dentro de la región del segmento 2 que codifica

para el dominio principal de la proteína VP2 y sobre todo la mutación observada en los dos genomas sugieren que estos cambios nucleotídicos le permiten a las dos mutantes evadir el efecto inhibitorio de benzimidazol sobre la replicación del ARNcd de rotavirus. La proteína VP2 con una longitud de 887 aminoácidos es el principal componente de la nucleocápside de rotavirus, 120 monómeros se organizan en 12 unidades decaméricas, en cada monómero de VP2 se reconoce al dominio amino terminal (NTD) correspondiente a los aminoácidos 1 al 100 y el dominio principal correspondiente a los aminoácidos 101 al 880, el cual puede ser dividido en tres subdominios: el apical, el central y el que forma dímeros (Boudreaux et al., 2013; McClain et al., 2010). El NTD de VP2 interactúa con VP1 (Zeng et al., 1998), VP3 y los ARN+ virales (Labbe et al., 1994; McDonald et al., 2009; Patton et al., 1997; Zeng et al., 1998), lo cual es fundamental para la incorporación de estos 3 componentes de la nucleocápside, la activación de la ARN polimerasa dependiente de ARN para que se lleve a cabo la síntesis de los 11 segmentos genómicos del rotavirus (Guglielmi et al., 2011; Lawton et al., 1997; Patton et al., 1997). En el 2011 se reportó la importancia de los subdominios apical y/o central (del dominio principal) en el proceso de activación de la ARN polimerasa (McDonald and Patton, 2011). Se ha descrito previamente que una sola mutación localizada en el subdominio apical del dominio principal de VP2 interfiere con la formación de la capa proteica de rotavirus (Mansell et al., 1994). Se ha reportado que mutaciones en el subdominio central del dominio principal de VP2 puede interferir en la interacción entre VP2 y NSP5, dando como resultado defectos en el ensamble de viroplasmas y bloqueando la síntesis de ARN viral (Buttafuoco et al., 2020). Por otro lado, la interacción entre VP2 y NSP5 es necesaria para que el complejo VP1, VP3, VP2 y los ARN+ virales interactúe de manera indirecta con NSP2 y se lleve a cabo la síntesis de la cadena negativa para producir cada uno de los 11 ARNcd (Berois et al., 2003). Dos de los 3 cambios de aminoácido observados en VP2 de RRV1-B12b se localizan en el subdominio relacionado con la formación de dímeros del dominio principal, de estos la mutación A787A/T es la que presenta el valor de  $\Delta\Delta G$  (-1.53) más bajo de todas las mutaciones en los dos genomas, el tercer cambio de aminoácido es un cambio no conservado y se localiza en el subdominio apical del dominio principal de VP2, presenta un valor de  $\Delta\Delta G = 0.64$ . Uno de los 2 cambios de aminoácido observados en VP2 de RRV2-B12a se localiza en el subdominio central con un valor de  $\Delta\Delta G = 0.42$ , el

segundo cambio de aminoácido se localiza en el subdominio relacionado con la formación de dímeros del dominio principal de VP2. De los 5 cambios de aminoácido observados en el dominio principal de VP2 en las 2 mutantes 3 de ellos se localizan en el subdominio relacionado con la formación de dímeros, el que se localiza en el residuo 800 está presente en las dos mutantes con un valor de  $\Delta\Delta G = -0.44$ . Los hallazgos de este trabajo pueden relacionar al fenotipo de las mutantes con una alteración en la formación de los viroplasmos, en un ensamble negativo de las partículas virales interrumpiéndose al mismo tiempo la síntesis de ARNcd o con una deficiente interacción entre VP2 y VP1 no activándose la ARN polimerasa dependiente de ARN y, por lo tanto, no se lleve a cabo la síntesis de ARNcd.

En cada mutante resistente a benzimidazol se localiza una mutación nucleotídica en el segmento 3 que codifica para la proteína VP3. Cada mutación nucleotídica se traduce en un cambio de aminoácido conservado en la proteína VP3, aunque en dominios diferentes. VP3 se une a los ARN+ y mediante su actividad de guanililtransferasa añade una caperuza a cada uno de los 11 ARN+ en su extremo 5' (Ogden et al., 2014; Ramanathan et al., 2016), gracias a su dominio que se encuentra entre los aminoácidos 171 al 690 (Brandmann and Jinek, 2015). VP3 en su dominio carboxilo terminal, entre los aminoácidos 697 y 835, codifica una fosfodiesterasa (PDE), la cual presenta dos motivos catalíticos (HxT/S) que puede cortar a la 2'-5'-oligoadenilato sintetasa previniendo la activación de RNasa L, lo cual favorece la replicación viral antagonizando la respuesta inmune innata antiviral de la célula (Brandmann and Jinek, 2015; Mazumder et al., 2002; Ogden et al., 2014; Rong Zhang, Babal K. Jha, Kristen M. Ogden, Beihua Dong, Ling Zhao, Ruth Elliott, John T. Patton, Robert H. Silverman, 2013). Una de las 4 mutaciones observadas en el genoma de RRV1-B12b se traduce en un cambio de aminoácido en el residuo 490 el cual se ubica en el dominio con actividad guanililtransferasa de la proteína VP3, esta mutación presentó un valor de  $\Delta\Delta G = -0.8$ . Por otro lado, una de las 5 mutaciones nucleotídicas observadas en la mutante RRV2-B12a se traduce en un cambio de aminoácido conservado en el residuo 831 el cual se ubica en el dominio carboxilo terminal específicamente en la región que codifica para PDE, pero alejado de los sitios catalíticos de PDE de la proteína VP3, esta mutación presentó un valor de  $\Delta\Delta G = 0.57$ . La relación entre las mutaciones observadas en el segmento 3 de cada

mutante con la resistencia al efecto inhibitorio de benzimidazol queda poco clara, aunque no puede descartarse.

Solamente en la mutante RRV2-B12a se observó una mutación nucleotídica en el segmento 7 que codifica para la proteína NSP3. NSP3 presenta un dominio N-terminal (NTD) ubicado entre los aminoácidos 1 y 170, el cual le permite formar homodímeros, además de unirse al extremo 3' de los ARN<sup>+</sup> virales mediante la secuencia consenso GACC de estos, actividad homóloga a la que presenta la proteína que se une a poli-A (del inglés poly(A)-binding protein PABP) sobre los ARN mensajeros eucarióticos (Piron et al., 1999; Poncet et al., 1994, 1993; Vende et al., 2000). NSP3 gracias a su dominio C-terminal (CTD) ubicado entre los aminoácidos 206 a 313, interactúa con un segmento de eIF4G, el cual se sobrepone con el sitio de unión de la PABP (Piron et al., 1999; Vende et al., 2000). La interacción de NSP3 con ssRNA<sup>+</sup> y con eIF4G facilita la transcripción de los ARN<sup>+</sup> virales, mientras bloquea el reclutamiento de PABP por eIF4G (Michel et al., 2000; Vende et al., 2000). El cambio de aminoácido en el dominio amino terminal de la proteína NSP3, específicamente en el residuo 116 de la proteína NSP3, es el único cambio de aminoácido no conservado en el genoma de RRV2-B12a, además de presentar el valor de  $\Delta\Delta G$  (0.87) más elevado de todas las mutaciones observadas en los dos genomas. Dicha mutación no explica con claridad la resistencia de las dos mutantes al efecto inhibitorio del ARN<sup>cd</sup> de benzimidazol.

Solamente en la mutante RRV2-B12a se observó una mutación nucleotídica en el segmento 11 que codifica para las proteínas NSP5 y NSP6 en marcos de lectura diferentes. Dicha mutación se traduce en cambio de aminoácido solo en NSP6 en el residuo 28. NSP6 codificada por el segmento 11 (Mohan et al., 2006) puede presentar variación en el número de aminoácidos que la conforman (algunas cepas con 92 aa (cepa RRV), otras con hasta 98 aa (cepa LLR) y algunas con menos de 92 aa (cepas Ala y Mc323)) (Mazumder et al., 2002), puede estar truncado su marco abierto de lectura como en la cepa Alabama de conejo (Gorziglia et al., 1989) o la cepa OSU de cerdo (González, Silvia A. and Burrone, 1989), o simplemente no estar presente su codón de inicio por lo tanto no codificar NSP6 como en las cepas Mc323 (Kojima et al., 1996) y 512-C (Wu et al., 1998), lo cual ha derivado en el planteamiento de que esta proteína no tiene una participación esencial durante la infección de rotavirus (Torres-Vega et al., 2000). NSP6 interactúa con ARN<sup>+</sup> y ARN<sup>cd</sup> de manera

inespecífica (Rainsford and McCrae, 2007), también se ha reportado que interactúa con el CTD de NSP5 que es la región de esta proteína implicada en su dimerización e hiperfosforilación (Torres-Vega et al., 2000). Se ha propuesto que la interacción de NSP6 con el CTD de NSP5 presenta un efecto regulatorio sobre la auto asociación e hiperfosforilación de NSP5 (Torres-Vega et al., 2000). El cambio de aminoácido observado en el residuo 28 de la proteína NSP6, con un valor de  $\Delta\Delta G = -0.48$ , no explica con claridad la capacidad de resistir al efecto inhibitorio de benzimidazol de la mutante RRV2-B12a.

Concluimos que la selección de drogas con antecedentes de efecto inhibitorio sobre la replicación de virus con genomas ARN<sup>+</sup> y ARN<sup>cd</sup> es una estrategia que permitió identificar drogas con efecto inhibitorio sobre la cepa RRV de la especie A de rotavirus. Utilizando 12 pases en presencia de benzimidazol, de manera independiente y de forma paralela, se logró obtener mutantes resistentes al efecto inhibitorio de benzimidazol, sin embargo, las mutantes obtenidas no son estables. Mediante la secuenciación del genoma completo de las mutantes y sus respectivas cepas silvestres se logró identificar al segmento genómico 2 que codifica para la proteína VP2 como la región genómica mayormente afectada por las mutaciones. También se observaron 4 mutaciones nucleotídicas en 3 segmentos genómicos distintos, cada uno de los 4 cambios de aminoácido resultantes se ubica en un dominio diferente de las 3 proteínas involucradas. En este trabajo los cambios de nucleótidos y de aminoácidos encontrados en las cepas mutantes no identifican de manera concluyente a la proteína viral blanco de benzimidazol, sin embargo, el número de mutaciones y su localización en el dominio principal de VP2 sugieren que esta proteína se encuentra mayormente involucrada en el efecto inhibitorio de benzimidazol.

## Bibliografia

- Abramoff, M.D., Magalhaes, P.J., Ram, S.J., 2004. Image processing with imageJ. *Biophotonics Int.* 11, 36–41. <https://doi.org/10.1201/9781420005615.ax4>
- Arnold, M., Patton, J.T., McDonald, S.M., 2009. Culturing, Storage and Quantification of Rotaviruses. *Curr. Protocols Microbiol. Unit-15C.3*, 1–29. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc15c03s15>
- Babraham Bioinformatics, 2020. FASTQC [WWW Document]. (accessed 01-04-2020). URL <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Bányai, K., Kemenesi, G., Budinski, I., Földes, F., Zana, B., Marton, S., Varga-Kugler, R., Oldal, M., Kurucz, K., Jakab, F., 2017. Candidate new rotavirus species in Schreiber's bats, Serbia. *Infect. Genet. Evol.* 48, 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.12.002>
- Bassyouni, F.A., Saleh, T.S., Elhefnawi, M.M., El-Moez, S.I.A., El-Senousy, W.M., Abdel-Rehim, M.E., 2012. Synthesis, pharmacological activity evaluation and molecular modeling of new polynuclear heterocyclic compounds containing benzimidazole derivatives. *Arch. Pharm. Res.* 35, 2063–2075. <https://doi.org/10.1007/s12272-012-1204-6>
- Bednarz-Prashad, A.J., John, E.I., 1983. Effect of Clioquinol, an 8-Hydroxyquinoline Derivative, on Rotavirus Infection in Mice. *J. Infect. Dis.* 148, 613. <https://doi.org/10.1093/infdis/148.3.613>
- Berois, M., Sapin, C., Erk, I., Poncet, D., Cohen, J., 2003. Rotavirus Nonstructural Protein NSP5 Interacts with Major Core Protein VP2. *J. Virol.* 77, 1757–1763. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.3.1757-1763.2003>
- Boudreaux, C.E., Vile, D.C., Gilmore, B.L., Tanner, J.R., Kelly, D.F., McDonald, S.M., 2013. Rotavirus core shell subdomains involved in polymerase encapsidation into virus-like particles. *J. Gen. Virol.* 94, 1818–1826. <https://doi.org/10.1099/vir.0.052951-0>
- Brandmann, T., Jinek, M., 2015. Crystal structure of the C-terminal 2',5'-phosphodiesterase domain of group a rotavirus protein VP3. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 83, 997–1002. <https://doi.org/10.1002/prot.24794>

- Bretner, M., Baier, A., Kopańska, K., Najda, A., Schoof, A., Reinholz, M., Lipniacki, A., Piasek, A., Kulikowski, T., Borowski, P., 2005. Synthesis and biological activity of 1H-benzotriazole and 1H-benzimidazole analogues - Inhibitors of the NTPase/helicase of HCV and of some related Flaviviridae. *Antivir. Chem. Chemother.* 16, 315–326. <https://doi.org/10.1177/095632020501600504>
- Briguglio, I., Piras, S., Corona, P., Carta, A., 2011. Inhibition of RNA Helicases of ssRNA + Virus Belonging to Flaviviridae, Coronaviridae and Picornaviridae Families . *Int. J. Med. Chem.* 2011, 1–22. <https://doi.org/10.1155/2011/213135>
- Buttafuoco, A., Michaelsen, K., Tobler, K., Ackermann, M., Fraefel, C., Eichwald, C., 2020. Conserved Rotavirus NSP5 and VP2 Domains Interact and Affect Viroplasm. *J. Virol.* 94, 1–21. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/JVI.01965-19>
- Chen, C.S., Chiou, C.T., Chen, G.S., Chen, S.C., Hu, C.Y., Chi, W.K., Chu, Y.D., Hwang, L.H., Chen, P.J., Chen, D.S., Liaw, S.H., Chern, J.W., 2009. Structure-based discovery of triphenylmethane derivatives as inhibitors of hepatitis C virus helicase. *J. Med. Chem.* 52, 2716–2723. <https://doi.org/10.1021/jm8011905>
- Cho, Y. il, Yoon, K.J., 2014. An overview of calf diarrhea - infectious etiology, diagnosis, and intervention. *J. Vet. Sci.* 15, 1–17. <https://doi.org/10.4142/jvs.2014.15.1.1>
- Compans, R.W., Cooper, M.D., Honjo, T., Melchers, F., Olsnes, S., Vogt, P.K., 2001. *Reoviruses: Entry, Assembly and Morphogenesis*, 1st ed. Springer, Berlin, Germany. <https://doi.org/10.1007/3-540-30773-7>
- Day, J., 2013. Viral Enteric Infections, Rotavirus Infections, in: Swayne, D., Gilsson, J., McDougald, L., Nolan, L., Suarez, D., Nair, V. (Eds.), *Disease of Poultry*. Wiley-Blackwell, Ames (Iowa), pp. 382–391.
- De Clercq, E., 2002. Strategies in the design of antiviral drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 13–25. <https://doi.org/10.1038/nrd703>
- De Palma, A.M., Heggermont, W., Lanke, K., Coutard, B., Bergmann, M., Monforte, A.-M., Canard, B., De Clercq, E., Chimirri, A., Purstinger, G., Rohayem, J., van Kuppeveld, F., Neyts, J., 2008. The Thiazolobenzimidazole TBZE-029 Inhibits Enterovirus Replication by Targeting a Short Region Immediately Downstream from Motif C in the Nonstructural Protein 2C. *J. Virol.* 82, 4720–4730.

- <https://doi.org/10.1128/jvi.01338-07>
- Desselberger, U., 2014. Rotaviruses. *Virus Res.* 190, 75–96.  
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.06.016>
- Devitt, C.M., Reynolds, D.L., 1993. Characterization of a Group D Rotavirus. *Avian Dis.* 37, 749–755. <https://doi.org/10.2307/1592024>
- Dhama, K., Saminathan, M., Karthik, K., Tiwari, R., Shabbir, M.Z., Kumar, N., Malik, Y.S., Singh, R.K., 2015. Avian rotavirus enteritis – an updated review. *Vet. Q.* 35, 142–158. <https://doi.org/10.1080/01652176.2015.1046014>
- Falcone, E., Busi, C., Lavazza, A., Monini, M., Bertoletti, M., Canelli, E., Vignolo, E., Ruggeri, F.M., Boniotti, M.B., 2015. Molecular characterization of avian rotaviruses circulating in Italian poultry flocks. *Avian Pathol.* 44, 509–515.  
<https://doi.org/10.1080/03079457.2015.1096011>
- Feoktistova, M., Geserick, P., Leverkus, M., 2016. Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harb. Protoc.* 343–346.  
<https://doi.org/10.1101/pdb.prot087379>
- Gardet, A., Breton, M., Fontanges, P., Trugnan, G., Chwetzoff, S., 2006. Rotavirus Spike Protein VP4 Binds to and Remodels Actin Bundles of the Epithelial Brush Border into Actin Bodies. *J. Virol.* 80, 3947–3956. <https://doi.org/10.1128/jvi.80.8.3947-3956.2006>
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R.D., Bairoch, A., 2003. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* 31, 3784–3788. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg563>
- Goddard, T.D., Huang, C.C., Meng, E.C., Pettersen, E.F., Couch, G.S., Morris, J.H., Ferrin, T.E., 2018. UCSF ChimeraX: Meeting modern challenges in visualization and analysis. *Protein Sci.* 27, 14–25. <https://doi.org/10.1002/pro.3235>
- González, Silvia A. and Burrone, O.R., 1989. Porcine OSU rotavirus segment 11 sequence shows common features with the viral gene of human origin. *Nucleic Acids Res.* 17, 1619–1633. <https://doi.org/10.1093/nar/17.15.6402>
- Gorziglia, M., Nishikawa, K., Fukuhara, N., 1989. Evidence of duplication and deletion in super short segment 11 of rabbit rotavirus Alabama strain. *Virology* 170, 587–590.



- [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(89\)90453-4](https://doi.org/10.1016/0042-6822(89)90453-4)
- Guglielmi, K.M., McDonald, S.M., Patton, J.T., 2011. Mechanism of Intraparticle Synthesis of the Rotavirus Double-stranded RNA Genome. *J. Biol. Chem.* 285, 18123–18128. <https://doi.org/10.1074/jbc.R110.117671>
- Heaton, P.M., Ciarlet, M., 2007. The Pentavalent Rotavirus Vaccine: Discovery to Licensure and Beyond. *Clin. Infect. Dis.* 45, 1618–1624. <https://doi.org/10.1086/522997>
- International Committee on Taxonomy of Viruses, I. 9th R. (2011), 2011. Reoviridae [WWW Document]. [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_9th\\_report/dsrna-viruses-2011/w/dsrna\\_viruses/188/reoviridae](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsrna-viruses-2011/w/dsrna_viruses/188/reoviridae). URL [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_9th\\_report/dsrna-viruses-2011/w/dsrna\\_viruses/188/reoviridae](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsrna-viruses-2011/w/dsrna_viruses/188/reoviridae)
- Johne, R., Otto, P., Roth, B., Löhren, U., Belnap, D., Reetz, J., Trojnar, E., 2011. Sequence analysis of the VP6-encoding genome segment of avian group F and G rotaviruses. *Virology* 412, 384–391. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.01.031>
- Kaneko, M., Takanashi, S., Thongprachum, A., Hanaoka, N., Fujimoto, T., Nagasawa, K., Kimura, H., Okitsu, S., Mizuguchi, M., Ushijima, H., 2017. Identification of vaccine-derived rotavirus strains in children with acute gastroenteritis in Japan, 2012–2015. *PLoS One* 12, 2012–2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184067>
- Khan, I.A., Siddiqui, S., Rehmani, S., Kazmi, S.U., Ali, S.H., 2012. Fluoroquinolones inhibit HCV by targeting its helicase. *Antivir. Ther.* 17, 467–476. <https://doi.org/10.3851/IMP1937>
- Kindler, E., Trojnar, E., Heckel, G., Otto, P.H., Johne, R., 2013. Analysis of rotavirus species diversity and evolution including the newly determined full-length genome sequences of rotavirus F and G. *Infect. Genet. Evol.* 14, 58–67. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.11.015>
- Knipe, D., Howley, P., Griffin DE Lamb, R., Martin, M., Roizman, B., 2007. Rotaviruses, in: *Fields Virology*. Philadelphia, pp. 1917–74.
- Kojima, K., Taniguchi, K., Urasawa, T., Urasawa, S., 1996. Sequence analysis of normal and rearranged NSP5 genes from human rotavirus strains isolated in nature: Implications for the occurrence of the rearrangement at the step of plus strand

- synthesis. *Virology* 224, 446–452. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0551>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Labbe, M., Baudoux, P., Charpilienne, A., Poncet, D., Cohen, J., 1994. Identification of the nucleic acid binding domain of the rotavirus VP2 protein. *J. Gen. Virol.* 75, 3423–3430. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-75-12-3423>
- Lawton, J.A., Zeng, C.Q., Mukherjee, S.K., Cohen, J., Estes, M.K., Prasad, B.V., 1997. Three-dimensional structural analysis of recombinant rotavirus-like particles with intact and amino-terminal-deleted VP2: implications for the architecture of the VP2 capsid layer. *J. Virol.* 71, 7353–7360. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.10.7353-7360.1997>
- Lee, L.Y., Ison, M.G., 2014. Diarrhea caused by viruses in transplant recipients. *Transpl. Infect. Dis.* 16, 347–358. <https://doi.org/10.1111/tid.12212>
- Li, H., Durbin, R., 2010. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 26, 589–595. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp698>
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25, 2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
- Mansell, E.A., Ramig, R.F., Patton, J.T., 1994. Temperature-Sensitive Lesions in the Capsid Proteins of the Rotavirus Mutants tsF and tsG That Affect Virion Assembly. *Virology* 204, 69–81. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1511>
- Matthijnssens, J., Otto, P.H., Ciarlet, M., Desselberger, U., van Ranst, M., Johne, R., 2012. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Arch. Virol.* 157, 1177–1182. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1273-3>
- Mazumder, R., Iyer, L.M., Vasudevan, S., Aravind, L., 2002. Detection of novel members, structure-function analysis and evolutionary classification of the 2H phosphoesterase superfamily. *Nucleic Acids Res.* 30, 5229–5243. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf645>
- McClain, B., Settembre, E., Temple, B.R.S., Bellamy, A.R., Harrison, S.C., 2010. X-ray Crystal Structure of the Rotavirus Inner Capsid Particle at 3.8 Å Resolution. *J. Mol.*

- Biol. 397, 587–599. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.01.055>
- McClenahan, S.D., Krause, P.R., Uhlenhaut, C., 2011. Molecular and infectivity studies of porcine circovirus in vaccines. *Vaccine* 29, 4745–4753. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.04.087>
- McDonald, S.M., Aguayo, D., Gonzalez-Nilo, F.D., Patton, J.T., 2009. Shared and Group-Specific Features of the Rotavirus RNA Polymerase Reveal Potential Determinants of Gene Reassortment Restriction. *J. Virol.* 83, 6135–6148. <https://doi.org/10.1128/jvi.00409-09>
- McDonald, S.M., Patton, J.T., 2011. Rotavirus VP2 Core Shell Regions Critical for Viral Polymerase Activation. *J. Virol.* 85, 3095–3105. <https://doi.org/10.1128/JVI.02360-10>
- McKell, A.O., LaConte, L.E.W., McDonald, S.M., 2017. A Temperature-Sensitive Lesion in the N-Terminal Domain of the Rotavirus Polymerase Affects Its Intracellular Localization and Enzymatic Activity. *J. Virol.* 91, 1–18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00062-17>
- McNulty, M.S., Allan, G.M., Todd, D., McFerran, J.B., McCracken, R.M., 1981. Isolation from chickens of a rotavirus lacking the rotavirus group antigen. *J. Gen. Virol.* 55, 405–413. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-55-2-405>
- McNulty, M.S., Curran, W.L., McFerran, J.B., 1976. The morphogenesis of a cytopathic bovine rotavirus in Madin Darby bovine kidney cells. *J. Gen. Virol.* 33, 503–508. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-33-3-503>
- Michel, Y.M., Poncet, D., Piron, M., Kean, K.M., Borman, A.M., 2000. Cap-poly(A) synergy in mammalian cell-free extracts. Investigation of the requirements for poly(A)-mediated stimulation of translation initiation. *J. Biol. Chem.* 275, 32268–32276. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004304200>
- Mihalov-Kovács, E., Gellért, Á., Marton, S., Farkas, S.L., Fehér, E., Oldal, M., Jakab, F., Martella, V., Bányai, K., 2015. Candidate new Rotavirus species in sheltered Dogs, Hungary. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 660–663. <https://doi.org/10.3201/eid2104.141370>
- Mohan, K.V.K., Glass, R.I., Atreya, C.D., 2006. Comparative molecular characterization of gene segment 11-derived NSP6 from lamb rotavirus LLR strain used as a human vaccine in China. *Biologicals* 34, 265–272.

- <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2005.11.005>
- Murray, K.E., Nibert, M.L., 2007. Guanidine Hydrochloride Inhibits Mammalian Orthoreovirus Growth by Reversibly Blocking the Synthesis of Double-Stranded RNA. *J. Virol.* 81, 4572–4584. <https://doi.org/10.1128/jvi.02106-06>
- Nemoto, M., Inagaki, M., Tamura, N., Bannai, H., Tsujimura, K., Yamanaka, T., Kokado, H., 2018. Evaluation of inactivated vaccines against equine group A rotaviruses by use of a suckling mouse model. *Vaccine* 36, 5551–5555. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.07.057>
- O’Ryan, M., 2007. Rotarix™ (RIX4414): an oral human rotavirus vaccine. *Expert Rev. Vaccines* 6, 11–19. <https://doi.org/10.1586/14760584.6.1.11>
- Ogden, K.M., Snyder, M.J., Dennis, A.F., Patton, J.T., 2014. Predicted Structure and Domain Organization of Rotavirus Capping Enzyme and Innate Immune Antagonist VP3. *J. Virol.* 88, 9072–9085. <https://doi.org/10.1128/jvi.00923-14>
- Otto, P., Liebler-Tenorio, E.M., Elschner, M., Reetz, J., Löhren, U., Diller, R., 2006. Detection of Rotaviruses and Intestinal Lesions in Broiler Chicks from Flocks with Runting and Stunting Syndrome (RSS). *Avian Dis.* 50, 411–418. <https://doi.org/https://doi.org/10.1637/7511-020106R.1>
- Pandurangan, A.P., Ochoa-Montaño, B., Ascher, D.B., Blundell, T.L., 2017. SDM: A server for predicting effects of mutations on protein stability. *Nucleic Acids Res.* 45, W229–W235. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx439>
- Patton, J.T., Jones, M.T., Kalbach, A.N., He, Y.W., Xiaobo, J., 1997. Rotavirus RNA polymerase requires the core shell protein to synthesize the double-stranded RNA genome. *J. Virol.* 71, 9618–9626. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.12.9618-9626.1997>
- Piron, M., Delaunay, T., Grosclaude, J., Poncet, D., 1999. Identification of the RNA-Binding, Dimerization, and eIF4GI-Binding Domains of Rotavirus Nonstructural Protein NSP3. *J. Virol.* 73, 5411–5421. <https://doi.org/10.1128/jvi.73.7.5411-5421.1999>
- Poncet, D., Aponte, C., Cohen, J., 1993. Rotavirus protein NSP3 (NS34) is bound to the 3’ end consensus sequence of viral mRNAs in infected cells. *J. Virol.* 67, 3159–3165. <https://doi.org/10.1128/jvi.67.6.3159-3165.1993>

- Poncet, D., Laurent, S., Cohen, J., 1994. Four nucleotides are the minimal requirement for RNA recognition by rotavirus non-structural protein NSP3. *EMBO J.* 13, 4165–4173. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06734.x>
- Rainsford, E.W., McCrae, M.A., 2007. Characterization of the NSP6 protein product of rotavirus gene 11. *Virus Res.* 130, 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.06.011>
- Ramanathan, A., Robb, G.B., Chan, S.H., 2016. mRNA capping: Biological functions and applications. *Nucleic Acids Res.* 44, 7511–7526. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw551>
- Rio, D.C., Ares, M., Hannon, G.J., Nilsen, T.W., 2010. Polyacrylamide gel electrophoresis of RNA. *Cold Spring Harb. Protoc.* 5, 1–7. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5444>
- Rojas, M., Ayala-Breton, C., López, S., 2008. BIOLOGÍA MOLECULAR DE ROTAVIRUS: UNA MIRADA A TRAVÉS DE LA INTERFERENCIA DE RNA. *Mensaje Bioquímico* 32, 149–162. <https://doi.org/http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>
- Rong Zhang, Babal K. Jha, Kristen M. Ogden, Beihua Dong, Ling Zhao, Ruth Elliott, John T. Patton, Robert H. Silverman, and S.R.W., 2013. Homologous 2',5'-phosphodiesterases from disparate RNA viruses antagonize antiviral innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 13114–13119. <https://doi.org/10.1073/pnas.1306917110>
- Saif, L.J., Fernandez, F.M., 1996. Group A Rotavirus Veterinary Vaccines. *J. Infect. Dis.* 174, S98–S106. [https://doi.org/10.1093/infdis/174.supplement\\_1.s98](https://doi.org/10.1093/infdis/174.supplement_1.s98)
- Sebaugh, J.L., 2011. Guidelines for accurate EC50 / IC50 estimation. *Pharm. Stat.* 10, 128–134. <https://doi.org/10.1002/pst.426>
- Shaker, Y.M., Omar, M.A., Mahmoud, K., Salwa, M., El-senousy, W.M., Ali, M.M., Mahmoud, A.E., Soliman, S.M., Diwani, H.I. El, 2015. Synthesis, in vitro and in vivo antitumor and antiviral activity of novel 1-substituted benzimidazole derivatives. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* 30, 826–845. <https://doi.org/10.3109/14756366.2014.979344>
- Shimizu, H., Agoh, M., Agoh, Y., Yoshida, H., Yoshii, K., Yoneyama, T., Hagiwara, A., Miyamura, T., 2000. Mutations in the 2C Region of Poliovirus Responsible for

- Altered Sensitivity to Benzimidazole Derivatives. *J. Virol.* 74, 4146–4154.  
<https://doi.org/10.1128/jvi.74.9.4146-4154.2000>
- Silvestri, L.S., Taraporewala, Z.F., Patton, J.T., 2004. Rotavirus Replication: Plus-Sense Templates for Double-Stranded RNA Synthesis Are Made in Viroplasm. *J. Virol.* 78, 7763–7774. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.14.7763-7774.2004>
- Torres-Vega, M.A., González, R.A., Duarte, M., Poncet, D., López, S., Arias, C.F., 2000. The C-terminal domain of rotavirus NSP5 is essential for its multimerization, hyperphosphorylation and interaction with NSP6. *J. Gen. Virol.* 81, 821–830.  
<https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-3-821>
- Trask, S.D., McDonald, S.M., Patton, J.T., 2012. Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 165–177.  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2673>
- Vende, P., Piron, M., Castagne, N., Poncet, D., 2000. Efficient Translation of Rotavirus mRNA Requires Simultaneous Interaction of NSP3 with the Eukaryotic Translation Initiation Factor eIF4G and the mRNA 3' End. *J. Virol.* 74, 7064–7071.  
<https://doi.org/10.1128/jvi.74.15.7064-7071.2000>
- Verlinden, Y., Cuconati, A., Wimmer, E., Rombaut, B., 2000. The antiviral compound 5-(3,4-dichlorophenyl) methylhydantoin inhibits the post-synthetic cleavages and the assembly of poliovirus in a cell-free system. *Antiviral Res.* 48, 61–69.  
[https://doi.org/10.1016/S0166-3542\(00\)00119-4](https://doi.org/10.1016/S0166-3542(00)00119-4)
- Victoria, J.G., Wang, C., Jones, M.S., Jaing, C., McLoughlin, K., Gardner, S., Delwart, E.L., 2010. Viral Nucleic Acids in Live-Attenuated Vaccines: Detection of Minority Variants and an Adventitious Virus. *J. Virol.* 84, 6033–6040.  
<https://doi.org/10.1128/jvi.02690-09>
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.T., De Beer, T.A.P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., Schwede, T., 2018. SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 46, W296–W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- Wu, H., Taniguchi, K., Urasawa, T., Urasawa, S., 1998. Serological and genomic characterization of human rotaviruses detected in China. *J. Med. Virol.* 55, 168–176.

[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9071\(199806\)55:2<168::AID-JMV14>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9071(199806)55:2<168::AID-JMV14>3.0.CO;2-E)  
Zeng, C.Q.-Y., Estes, M.K., Charpilienne, A., Cohen, J., 1998. The N Terminus of  
Rotavirus VP2 Is Necessary for Encapsidation of VP1 and VP3. *J. Virol.* 72, 201–208.  
<https://doi.org/10.1128/jvi.72.1.201-208.1998>

## Anexo I

### Inhibición de la replicación de rotavirus

Sembrar placas de 6 pozos, a una concentración que en menos de 24 horas alcancen confluencia del 100%.

Tomar 600µl de virus y agregar 600 µl de freón [triclorofluorometano (CCL<sub>3</sub>F)]. Agitar vigorosamente y centrifugar 20 minutos, 5,000 rpm. Colectar el sobrenadante [300µl].

Infección en presencia de la droga seleccionada.

Activar rotavirus con tripsina 30 minutos a 37°C. Para 300µl de virus, se utiliza 1.5 µl de tripsina 2mg/ml (concentración final 1µg/ml).

De acuerdo con el título viral se realiza la dilución para obtener la MOI deseada.

Lavar 2 veces con MEM-SS las células [añadir HEPES 1M para concentración final 10mM en el MEM-SS] a 15°C. Retirar medio de cada pozo e inocular 1 ml del virus activado.

Añadir el virus activado (1 ml) a cada pozo respectivamente. Cuidar que no se sequen las células.

Incubar 1 hora a 15°C (adsorción). Mezclar cada 10 minutos durante la incubación.

Después de la incubación por 1 hora pasar cada placa a la incubadora de células a 37°C.

Pasadas 2 horas realizar 2 lavados con MEM-SS y añadir 3 ml MEM-SS a cada uno de los pozos control negativo y 3 ml de MEM-SS + droga a los pozos experimentales.

Incubar a 37°C durante 18 horas y cosechar.

La adsorción del virus se hace a 15°C x 1 hora, seguido de 2 horas a 37°C, se agregan las drogas y se incuba hasta las 18 horas después de agregar el virus a las células, posteriormente se cosecha todo el contenido de cada pozo.

0	1	2	3	.....	18
		Lavados	Añadir droga		
15°C	Incubación a 37°C				



**Anexo II**  
Selección de mutantes resistentes

- 1.- Añadir 3 µl de tripsina 2mg/ml a 600µl de virus.
- 2.- Activar el virus a 37°C por 30 minutos.
- 3.- Lavar 2 veces con MEM-SS frascos F75 con células MA-104 confluentes. Dejar 5 ml al final de los lavados.
- 4.- Añadir 600 ml de virus activado a cada F75 de manera indirecta a las células, homogenizar.
- 5.- Incubar 1 hora a 37°C (adsorción).
- 6.- Mezclar cada 10 minutos durante la incubación.
- 7.- Incubar 1 hora y retirar todo el medio. Realizar 2 lavados con MEM-SS.
- 8.- Añadir 15 ml de MEM-SS + **la droga** a cada frasco.
- 9.- Incubar a 37°C. Cosechar a las 18 horas después de haber añadido el virus a las células.

Se realizaron 12 pases (replicación viral) de RRV1 y de RRV2 en presencia de benzimidazol o quinolina, con lo cual se obtuvieron las cepas:

RRV1  
RRV1-B12b  
RRV1-Q12b  
RRV1-Q12a  
RRV2  
RRV2-B12b  
RRV2-Q12b  
RRV2-B12a

En la tabla 1 de este anexo se esboza el procedimiento al que fueron sometidas las cepas RRV1-B12b, RRV2-B12b y RRV2-B12a con el objetivo de seleccionar mutantes resistentes a benzimidazol. En la tabla 2 de este anexo se esboza el procedimiento al que fueron sometidas las cepas RRV1-Q12b, RRV1-Q12a y RRV2-Q12b con el objetivo de seleccionar mutantes resistentes a quinolina.

Tabla 1 del anexo II. Selección de mutantes de RRV resistentes a benzimidazol.

Mutante	Número de pases en presencia de benzimidazol (concentración mM de benzimidazol)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
RRV1-B12b	(16)*	(16)*	(16)*	(8)	(8)	(8)*	(8)	(8)	(8)*	(8)	(8)	(8)**
RRV2-B12a	(16)*	(16)*	(16)*	(8)	(8)	(8)*	(8)	(8)	(8)*	(16)	(16)	(16)**
RRV2-B12b	(16)*	(16)*	(16)*	(8)	(8)	(8)*	(8)	(8)	(8)*	(8)	(8)	(8)**

\* indica una amplificación en ausencia de benzimidazol.

\*\* indica dos amplificaciones en ausencia de benzimidazol y la determinación del título mediante ensayo de formación de placas.

Tabla 2 del anexo II. Selección de mutantes de RRV resistentes a quinolina.

Mutante	Número de pases en presencia de quinolina (concentración mM de quinolina)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
RRV1-Q12a	(10)*	(10)*	(10)*	(5)	(5)	(5)*	(5)	(5)	(5)*	(10)	(10)	(10)**
RRV1-Q12b	(10)*	(10)*	(10)*	(5)	(5)	(5)*	(5)	(5)	(5)*	(5)	(5)	(5)**
RRV2-Q12b	(10)*	(10)*	(10)*	(5)	(5)	(5)*	(5)	(5)	(5)*	(5)	(5)	(5)**

\* indica una amplificación en ausencia de quinolina.

\*\* indica dos amplificaciones en ausencia de quinolina y la determinación del título mediante ensayo de formación de placas.

### Anexo III

#### Purificación de rotavirus

##### Replicación de rotavirus en cultivo celular

La(s) cepa(s) de rotavirus se replica(n) en células MA-104 (*Cercopithecus aethiops*, epitelio de riñón). Se cosechan y se almacenan a -20 °C.

##### Purificación de partículas virales mediante gradiente de sacarosa.

Notas:

- 1) Manejar todo sobre hielo.
- 2) Se necesitan tubos para el rotor JA20, pipetas serológicas y Pasteur.
- 3) Antes de empezar poner a enfriar el TBS y los rotores JA20, SW28 y SW65.
- 1) Se utilizaron 100 ml de cada virus, se transfirió 20 ml con pipeta a 5 tubos (por cada muestra) del JA20.
- 2) Se añadió 20ml de triclorofluorometano (CCL<sub>3</sub>F) a cada tubo.
- 3) Homogenizar con el vortex a velocidad máxima por 1-2 min.  
Nota: si se deja mucho tiempo en hielo se congela la muestra con el freón. Es recomendable colocar los tubos dentro de un recipiente de unicel, para que no estén en contacto directo con hielo.
- 4) Centrifugar a 4,000 rpm en el JA20 por 30 min a 4°C, freno máximo.
- 5) Transferir la fase acuosa a un tubo del SW28 utilizando una pipeta serológica, tomando la zona contraria a la del pellet. Se deja un volumen de aproximadamente 2 ml para evitar coleccionar material indeseable.
- 6) Se repitió la extracción 1 vez con 10 ml de MEM-SS.
- 7) Se juntaron los sobrenadantes y se transfirieron a tubos del rotor SW28 (capacidad nominal de llenado 38.5 ml) para alcanzar la capacidad nominal se completó con MEM-SS. Se centrifugó por 1 hora a 25,000 rpm a 4°C, aceleración y desaceleración máximas.
- 8) Se decantó el sobrenadante y se colocó boca abajo el tubo sobre una sanita para eliminar la mayor cantidad de líquido.
- 9) La pastilla no se resuspende fácilmente, por lo que primero se despegó el pellet entero de cada tubo: se agregaron 50µl de TBS y después se transfirieron junto con el pellet a un tubo eppendorf. Después se enjuagó con otros 50µl cada tubo. Una vez que todo el volumen (menos de 500µl) estaba en el tubo eppendorf, el pellet se resuspendió usando una jeringa de 1ml, hasta que se observó una suspensión homogénea con partículas muy finas. El volumen final fue de 405µl.
- 10) Se añadieron 0.01 volúmenes de EDTA 0.5 M pH 8 (5mM)= 4.05µl
- 11) Se incubó por 30 minutos a 37°C, después se puso en hielo.

##### GRADIENTE DE SACAROSA

- 12) Se preparó un gradiente de sacarosa de 15-45% en tubos SW28 con capacidad nominal de 38.5 ml (el formador de gradientes se lavó con Extran® diluido, agua dd y agua MQ estéril).
- 13) Se aplicó el virus sobre el gradiente cuidadosamente.
- 14) El tubo SW28 se centrifugó 75 min a 25,000 rpm a 4°C aceleración mínima 9 y desaceleración mínima 9.
- 15) Para recuperar el virus se fueron colectando las distintas fracciones, enfriando en hielo las fracciones conforme se colectan: DLPs y TLPs.

- Nota: en este punto se pueden refrigerar las muestras para continuar el siguiente día.
- 16) Las fracciones DLPs y TLPs se depositaron en un tubo del SW65 que tenía 5ml de TBS y se mezcló con una punta de 1 ml.
  - 17) Se ultracentrifugó 1h a 25,000 rpm a 4°C en el SW65, aceleración y desaceleración máxima.
  - 18) No se observó pellet. El pellet se resuspendió en 100µl de TBS con una punta y se transfirió a un eppendorf, se lavó con otros 100µl dos veces (volumen total de 300µl) y se guardó a -20°C.

#### **MATERIAL PARA EL GRADIENTE**

##### **Triclorofluorometano (CCL<sub>3</sub>F)**

##### **TBS Tris-buffered saline (*sin dextrosa, sin Ca<sup>++</sup>, sin Mg<sup>++</sup>*)**

	500ml	1L
NaCl-----	4 gr (136mM)-----	8 gr [136 mM]
KCl-----	0.19 gr (5mM)-----	0.38 gr [5 mM]
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -----	0.05 gr (0.7mM)-----	0.1 gr [0.7 mM]
TRIS-BASE-----	1.5 gr (25mM)-----	3 gr [25 mM]
Disolver en de H <sub>2</sub> O MQ-----	500 ml-----	1000 ml
Ajustar con HCl -----	pH a 7.4-----	pH a 7.4

Autoclavear.

Mantener estéril.

##### **Sacarosa 45% en TBS<sup>-</sup> (*sin dextrosa, sin Ca<sup>++</sup>, sin Mg<sup>++</sup>*)**

Sacarosa-----	45 gr-----
Ajustar volumen a -----	100 ml-----

Filtrar y autoclavear

##### **Sacarosa 15% en TBS<sup>-</sup> (*sin dextrosa, sin Ca<sup>++</sup>, sin Mg<sup>++</sup>*)**

Sacarosa-----	15 gr-----
Ajustar volumen a -----	100 ml-----

Filtrar y autoclavear

##### **EDTA 0.5 M, pH8**

EDTA-----	9.505 gr-----
H <sub>2</sub> O MQ-----	40 ml-----
Ajustar con NaoH (1gr aprox)-----	pH a 8-----
Ajustar volumen a -----	50 ml-----

Autoclavear

#### **Eliminación de ADN y ARN de las células MA-104 antes de extraer el ARN viral.**

Muestra-----	100 µl (partículas virales purificadas)
Búffer Turbo DNase (Ambion)-----	10 µl
Turbo DNase (Ambion)-----	3 µl (6 U)
RNase Cocktail Enzyme Mix (Ambion)-----	2 µl (2 U)

1. Homogenizar con vortex.
2. Incubar 37°C por 30 minutos.
3. Al término de la incubación inmediatamente añadir 1ml de TRIzol™ (Invitrogen, número de catálogo A33254) y seguir las especificaciones del proveedor.

#### Anexo IV

Números de acceso del GenBank de los cuatro genomas secuenciados.

Segmento genómico	RRV1	RRV1-B12b	RRV2	RRV2-B12a
1	MT226612	MT226623	MT226634	MT226645
2	MT226613	MT226624	MT226635	MT226646
3	MT226614	MT226625	MT226636	MT226647
4	MT226615	MT226626	MT226637	MT226648
5	MT226616	MT226627	MT226638	MT226649
6	MT226617	MT226628	MT226639	MT226650
7	MT226618	MT226629	MT226640	MT226651
8	MT226619	MT226630	MT226641	MT226652
9	MT226620	MT226631	MT226642	MT226653
10	MT226621	MT226632	MT226643	MT226654
11	MT226622	MT226633	MT226644	MT226655

## Anexo V

### Citotoxicidad de 12 drogas en células MA-104

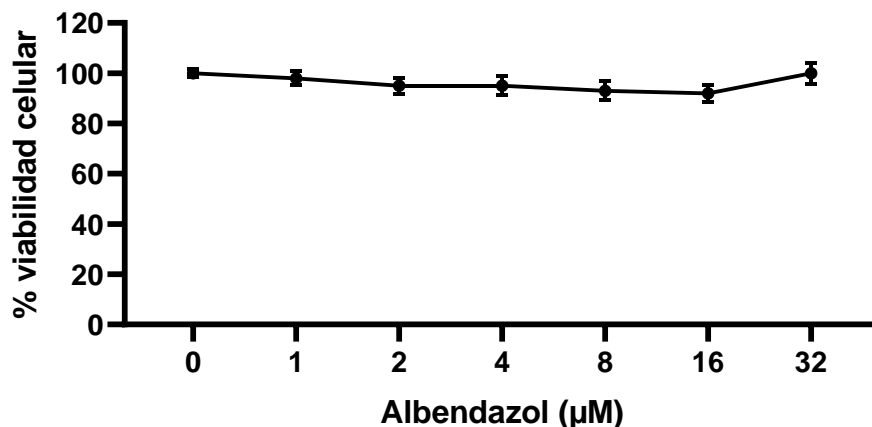


Figura 1 del anexo V. Citotoxicidad de albendazol en células MA-104. Células MA-104 confluentes en placas de 96 pozos fueron tratadas con 0, 1, 2, 4, 8, 16 y 32  $\mu\text{M}$  de albendazol por quintuplicado, se incubaron 18 horas. Las células fueron teñidas con 0.5% de cristal violeta, el contenido de cada pozo fue solubilizado y la  $\text{Abs}_{570}$  fue medida. Se muestra la media y el error estándar de tres experimentos independientes.

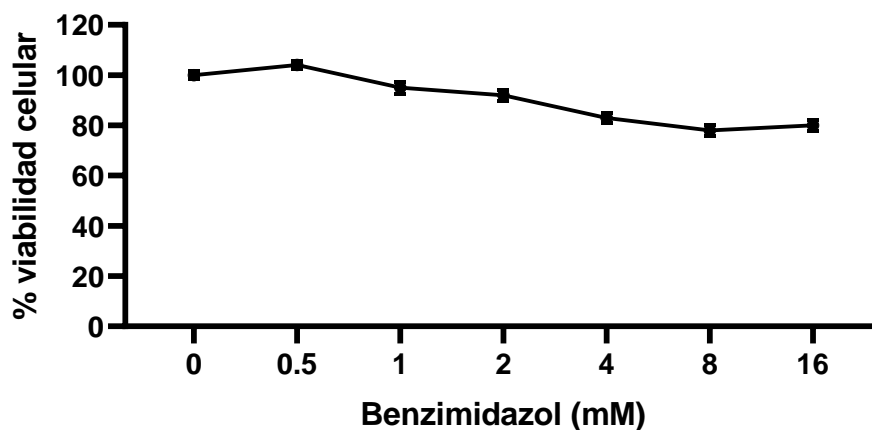


Figura 2 del anexo V. Citotoxicidad de benzimidazol en células MA-104. Células MA-104 confluentes en placas de 96 pozos fueron tratadas con 0, 0.5, 1, 2, 4, 8 y 16 mM de benzimidazol por quintuplicado, se incubaron 18 horas. Las células fueron teñidas con 0.5% de cristal violeta, el contenido de cada pozo fue solubilizado y la  $\text{Abs}_{570}$  fue medida. Se muestra la media y el error estándar de tres experimentos independientes.

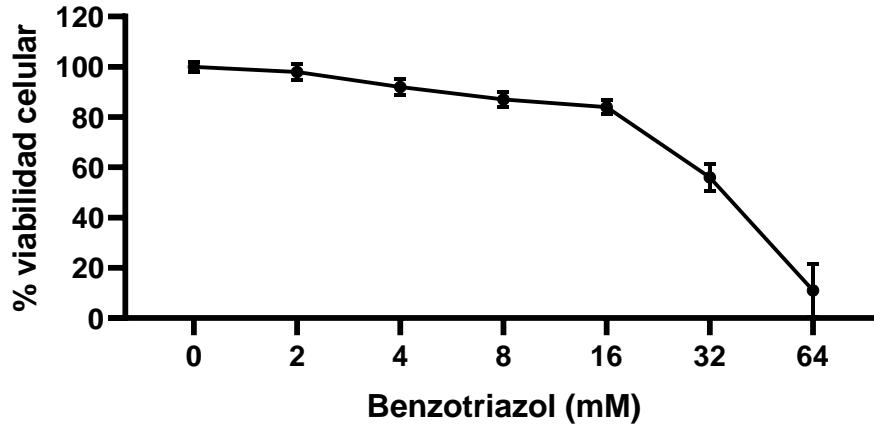


Figura 3 del anexo V. Citotoxicidad de benzotriazol en células MA-104. Células MA-104 confluentes en placas de 96 pozos fueron tratadas con 0, 2, 4, 8, 16, 32 y 64 mM de benzotriazol por quintuplicado, se incubaron 18 horas. Las células fueron teñidas con 0.5% de cristal violeta, el contenido de cada pozo fue solubilizado y la Abs<sub>570</sub> fue medida. Se muestra la media y el error estándar de tres experimentos independientes.

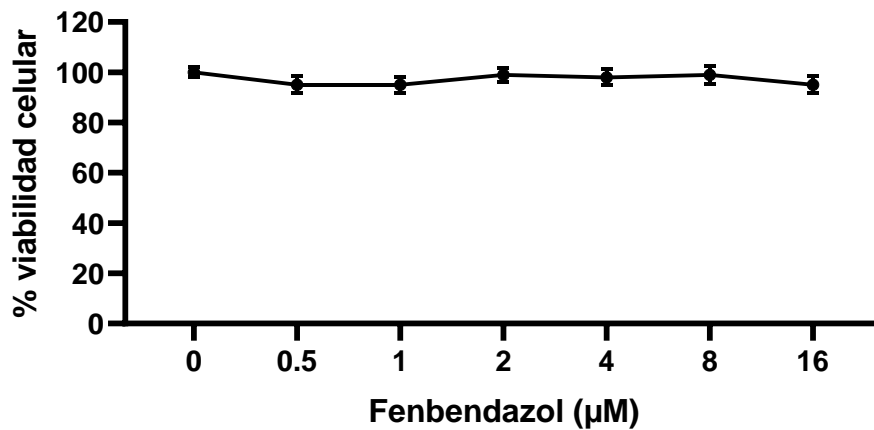


Figura 4 del anexo V. Citotoxicidad de fenbendazol en células MA-104. Células MA-104 confluentes en placas de 96 pozos fueron tratadas con 0, 0.5, 1, 2, 4, 8 y 16 µM de fenbendazol por quintuplicado, se incubaron 18 horas. Las células fueron teñidas con 0.5% de cristal violeta, el contenido de cada pozo fue solubilizado y la Abs<sub>570</sub> fue medida. Se muestra la media y el error estándar de tres experimentos independientes.

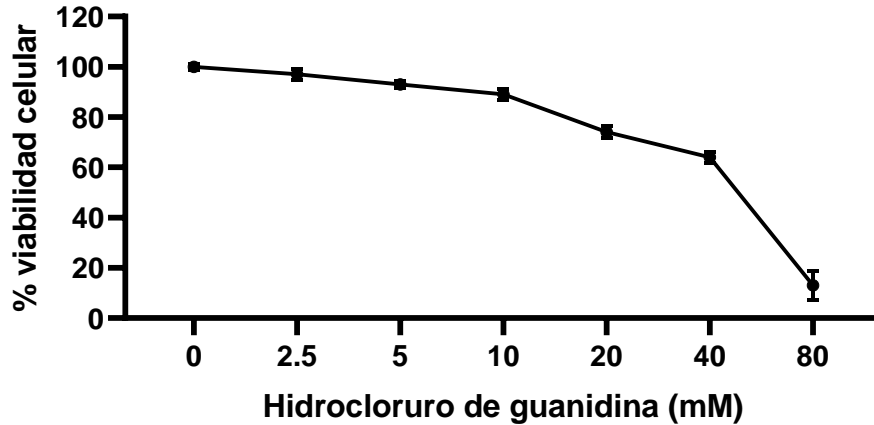


Figura 5 del anexo V. Citotoxicidad de hidrocloreuro de guanidina en células MA-104. Células MA-104 confluentes en placas de 96 pozos fueron tratadas con 0, 2.5, 5, 10, 20, 40 y 80 mM de hidrocloreuro de guanidina por quintuplicado, se incubaron 18 horas. Las células fueron teñidas con 0.5% de cristal violeta, el contenido de cada pozo fue solubilizado y la Abs<sub>570</sub> fue medida. Se muestra la media y el error estándar de tres experimentos independientes.

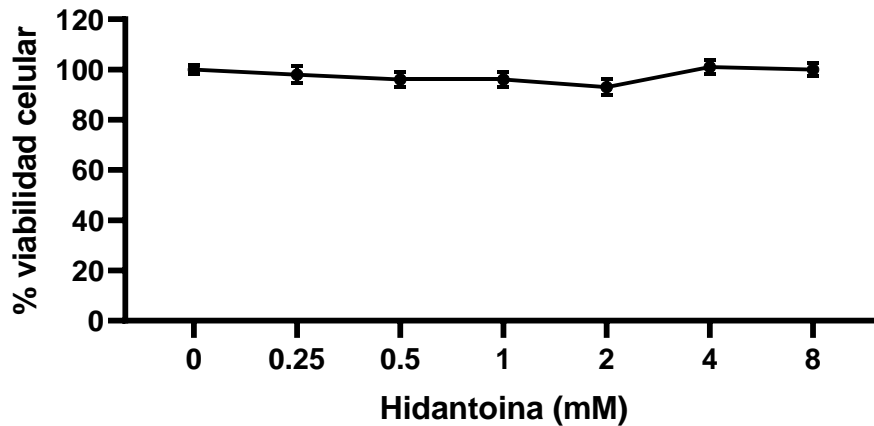


Figura 6 del anexo V. Citotoxicidad de hidantoína en células MA-104. Células MA-104 confluentes en placas de 96 pozos fueron tratadas con 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 y 8 mM de hidantoína por quintuplicado, se incubaron 18 horas. Las células fueron teñidas con 0.5% de cristal violeta, el contenido de cada pozo fue solubilizado y la Abs<sub>570</sub> fue medida. Se muestra la media y el error estándar de tres experimentos independientes.



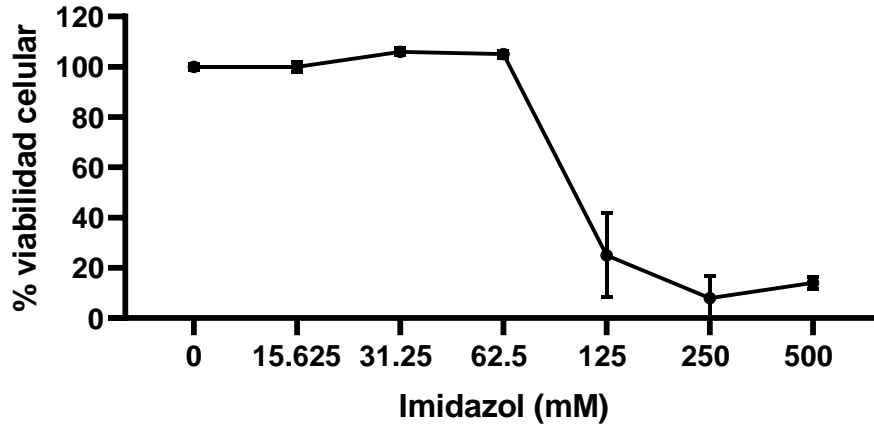


Figura 7 del anexo V. Citotoxicidad de imidazol en células MA-104. Células MA-104 confluentes en placas de 96 pozos fueron tratadas con 0, 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250 y 500 mM de imidazol por quintuplicado, se incubaron 18 horas. Las células fueron teñidas con 0.5% de cristal violeta, el contenido de cada pozo fue solubilizado y la Abs<sub>570</sub> fue medida. Se muestra la media y el error estándar de tres experimentos independientes.

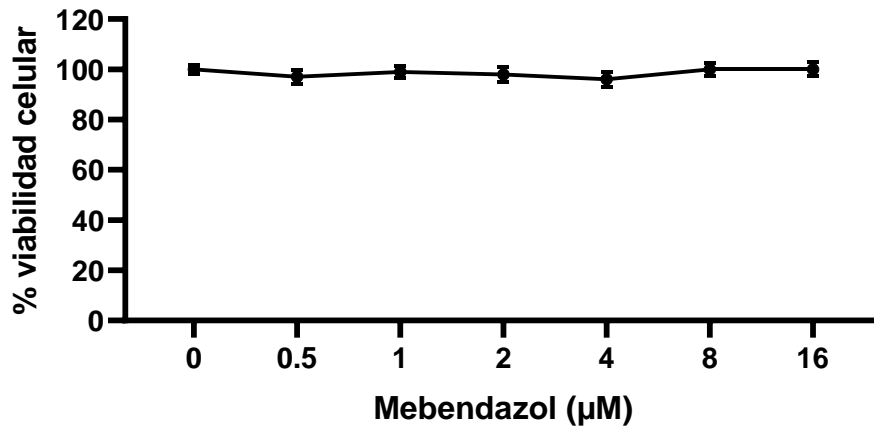


Figura 8 del anexo V. Citotoxicidad de mebendazol en células MA-104. Células MA-104 confluentes en placas de 96 pozos fueron tratadas con 0, 0.5, 1, 2, 4, 8 y 16 µM de mebendazol por quintuplicado, se incubaron 18 horas. Las células fueron teñidas con 0.5% de cristal violeta, el contenido de cada pozo fue solubilizado y la Abs<sub>570</sub> fue medida. Se muestra la media y el error estándar de tres experimentos independientes.

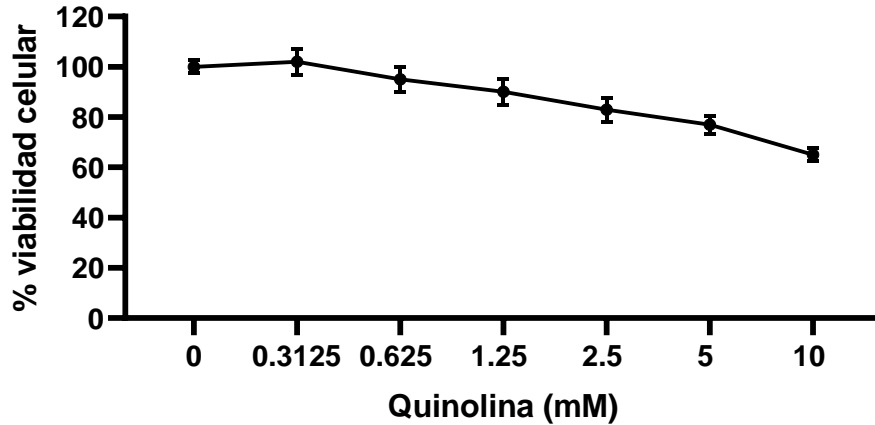


Figura 9 del anexo V. Citotoxicidad de quinolina en células MA-104. Células MA-104 confluentes en placas de 96 pozos fueron tratadas con 0, 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5 y 10 mM de quinolina por quintuplicado, se incubaron 18 horas. Las células fueron teñidas con 0.5% de cristal violeta, el contenido de cada pozo fue solubilizado y la Abs<sub>570</sub> fue medida. Se muestra la media y el error estándar de tres experimentos independientes.

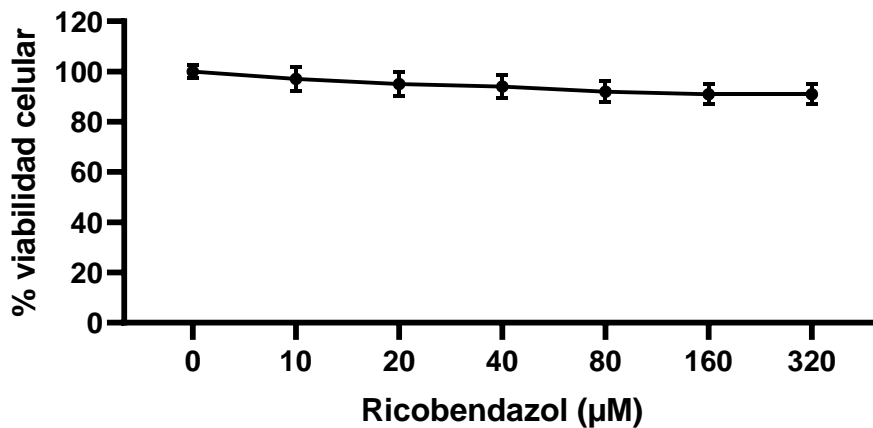


Figura 10 del anexo V. Citotoxicidad de ricobendazol en células MA-104. Células MA-104 confluentes en placas de 96 pozos fueron tratadas con 0, 10, 20, 40, 80, 160 y 320 µM de ricobendazol por quintuplicado, se incubaron 18 horas. Las células fueron teñidas con 0.5% de cristal violeta, el contenido de cada pozo fue solubilizado y la Abs<sub>570</sub> fue medida. Se muestra la media y el error estándar de tres experimentos independientes.

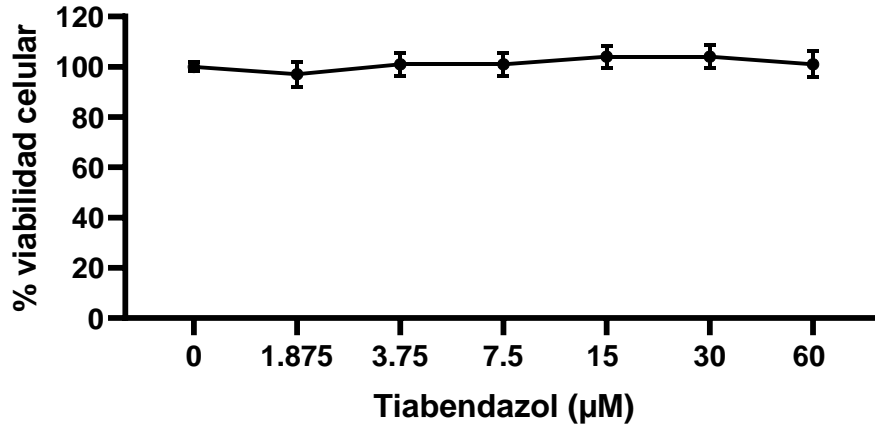


Figura 11 del anexo V. Citotoxicidad de tiabendazol en células MA-104. Células MA-104 confluentes en placas de 96 pozos fueron tratadas con 0, 1.875, 3.75, 7.5, 15, 30 y 60 µM de tiabendazol por quintuplicado, se incubaron 18 horas. Las células fueron teñidas con 0.5% de cristal violeta, el contenido de cada pozo fue solubilizado y la Abs<sub>570</sub> fue medida. Se muestra la media y el error estándar de tres experimentos independientes.

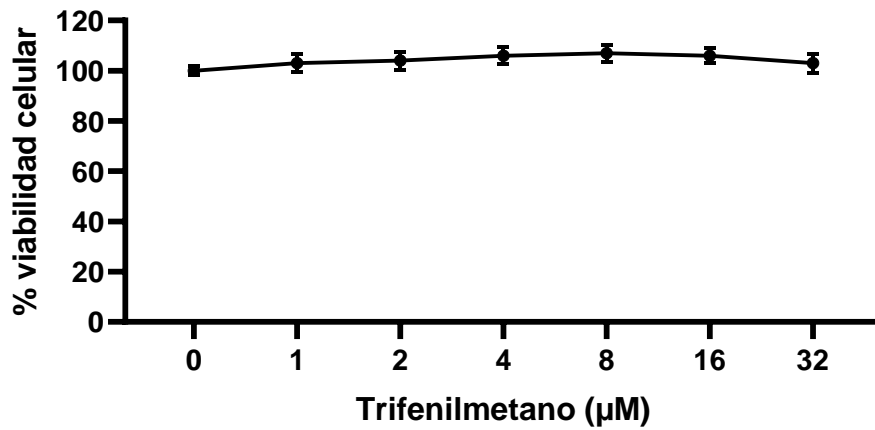


Figura 12 del anexo V. Citotoxicidad de trifluorometano en células MA-104. Células MA-104 confluentes en placas de 96 pozos fueron tratadas con 0, 1, 2, 4, 8, 16 y 32 µM de trifluorometano por quintuplicado, se incubaron 18 horas. Las células fueron teñidas con 0.5% de cristal violeta, el contenido de cada pozo fue solubilizado y la Abs<sub>570</sub> fue medida. Se muestra la media y el error estándar de tres experimentos independientes.

## Anexo VI

Cobertura y profundidad de los cuatro genomas secuenciados.

Segmento genómico*	RRV1	RRV1-B12b	RRV2	RRV2-B12a
1/VP1/3302 nt	3302 nt (100%)	3302 nt (100%)	3302 nt (100%)	3302 nt (100%)
2/VP2/2708 nt	2708 nt (100 %)	2708 nt (100 %)	2708 nt (100 %)	2708 nt (100 %)
3/VP3/2591 nt	2586 nt (99.80%) [5'-GGCTT]	2588 nt (99.88%) [5'-GGC]	2591 nt (100%)	2586 nt (99.80%) [5'-GGCTT]
4/VP4/2362 nt	2362 nt (100%)	2362 nt (100%)	2362 nt (100%)	2362 nt (100%)
5/NSP1/1600 nt	1596 nt (99.75%) [GACC-3']	1592 nt (99.50%) [5'-GGCT] [GACC-3']	1599 nt (99.93%) [C-3']	1600 nt (100%)
6/VP6/1356 nt	1356 nt (100%)	1356 nt (100%)	1356 nt (100%)	1356 nt (100%)
7/NSP3/1078 nt	1078 nt (100%)	1078 nt (100%)	1078 nt (100%)	1078 nt (100%)
8/NSP2/1059 nt	1058 nt (99.90%) [5'-G]	1059 nt (100%)	1059 nt (100%)	1059 nt (100%)
9/VP7/1062 nt	1062 nt (100%)	1062 nt (100%)	1062 nt (100%)	1062 nt (100%)
10/NSP4/750 nt	750 nt (100%)	750 nt (100%)	750 nt (100%)	750 nt (100%)
11/NSP5-NSP6/667 nt	667 nt (100%)	664 nt (99.55%) [5'-GG] [C-3']	667 nt (100%)	667 nt (100%)
<b>Total = 18,535 nt</b>	18,525 nt (99.94%)	18,521 (99.92%)	18,534 nt (99.99%)	18,530 nt (99.97%)
<b>Profundidad promedio</b>	7,341 (1,326)	5,817 (2,127)	6,880 (1,693)	7,236 (1,459)

\* GenBank: EU636924-EU636934. nt = nucleótidos. () = % de cobertura. [] = nt faltantes

## Anexo VII

### Modelos 3D de las proteínas afectadas por las mutaciones

<b>Modelo construido</b>	<b>Referencia</b>	<b>GMQE</b>	<b>QMEAN</b>	<b>Cobertura/Identidad</b>
<b>RRV1 (VP2)</b>	6oj4.1.D	0.98	-2.27	93.23%/100%
<b>RRV1-B12b (VP2)</b>	6oj4.1.D	0.98	-2.33	93.23%/99.66%
<b>RRV2 (VP2)</b>	6oj4.1.D	0.98	-2.28	93.23%/99.89%
<b>RRV2-B12a (VP2)</b>	6oj4.1.D	0.98	-2.32	93.23%/99.66%
<b>RRV1 (VP3)</b>	6o3v.2.A	0.97	-2.05	100%/90.06%
<b>RRV1-B12b (VP3)</b>	6o3v.2.A	0.97	-2.05	100%/89.94%
<b>RRV2 (VP3)</b>	6o3v.2.A	0.97	-2.08	100%/90.06%
<b>RRV2-B12a (VP3)</b>	6o3v.2.A	0.97	-2.05	100%/89.94%
<b>RRV2 (NSP3)</b>	1knz.1.A	0.52	0.16	51.43%/85.09%
	1lj2.1.B	0.26	-1.01	34.18%/72.90%
	1mlj.1.A	0.17	-3.71	38.33%/21.49%
<b>RRV2-B12a (NSP3)</b>	1knz.1.A	0.52	0.18	51.43%/84.47%
	1lj2.1.B	0.26	-1.01	34.18%/72.90%
	1mlj.1.A	0.17	-4.58	38.65%/21.49%
<b>RRV2 (NSP6)</b>	6btc.1.A	0.16	-1.07	45.65%/19.05%
<b>RRV2-B12a (NSP6)</b>	6btc.1.A	0.16	1.05	45.65%/19.05%

GMQE (del inglés Global Model Quality Estimation)

QMEAN (del inglés Qualitative Model Energy Analysis),

Cobertura/Identidad = cobertura e identidad del modelo construido con respecto a su referencia.

## Anexo VIII

Artículo publicado derivado del trabajo reportado en esta tesis:



Virus Research

Available online 10 October 2020, 198189

In Press, Journal Pre-proof ?



# Mutations in the VP2 gene of rotavirus associated with benzimidazole sensitivity

Fernando Chávez-Maya <sup>a</sup>✉, Gary García-Espinosa <sup>a</sup>✉, María Eugenia López-Arellano <sup>b</sup>✉, Luis Padilla-Noriega <sup>c</sup>✉

- <sup>a</sup> Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán 04510, Ciudad de México, Mexico
- <sup>b</sup> Departamento de Helmintología, Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad, INIFAP-México, Jiutepec 62550, Morelos, Mexico
- <sup>c</sup> Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, edificio A, primer piso, Coyoacán, CDMX 04510, Ciudad de México, Mexico

Received 26 May 2020, Revised 23 August 2020, Accepted 5 October 2020, Available online 10 October 2020.

Show less ^

<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198189>

[Get rights and content](#)