



---

---

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**“ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE CEPAS  
DE NOROVIRUS Y ROTAVIRUS IDENTIFICADAS EN  
MÉXICO”**

**TESIS**

QUE PRESENTA

**MC. CRISTEL SAMANTHA BENITEZ BUENO**

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

DIRECTORES

**DR. JOSÉ GUADALUPE RENDÓN MALDONADO**

**DR. SERGIO ALONSO DURÁN PÉREZ**

CULIACÁN DE ROSALES, SINALOA, MÉXICO A MAYO DE 2024



Dirección General de Bibliotecas  
Ciudad Universitaria  
Av. de las Américas y Blvd. Universitarios  
C. P. 80010 Culiacán, Sinaloa, México.  
Tel. (667) 713 78 32 y 712 50 57  
dgbuas@uas.edu.mx

## UAS-Dirección General de Bibliotecas

### Repositorio Institucional Buelna

#### Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial  
Compartir Igual, 4.0 Internacional



## DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mi familia; mis padres, Guadalupe Bueno Verástica y Humberto Benitez García, mi hermana Joselyn Irasú Benitez Bueno, por haber confiado en mí y apoyarme en todo momento, a mis sobrinos Romina y Eleazar por ser mi impulso para querer superarme y poder ser un ejemplo en sus vidas.

A mis amigos Estefania, Abel porque a pesar de que el destino nos ha llevado por rumbos separado siempre serán parte de mi vida al igual que Mariano que a pesar de que la vida no nos dejó compartir más tiempo yo sé que desde donde estés siempre me acompañarás y festejarás mis logros.

A quién fue parte fundamental para este trabajo Rogelio, quien se ha convertido en parte de mi familia y con quien he podido compartir esta experiencia, gracias por todo tu apoyo incondicional, por tus consejos, por las risas y enojos y por estar en las buenas, en las malas y en las peores.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la FCQB por mi formación como Lic. Químico Farmacéutico Biólogo.

A la Universidad Autónoma de Sinaloa por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de Licenciatura y posgrado.

Al Doctorado en Ciencias Biomédicas por permitirme ingresar al programa y brindarme las herramientas necesarias para desempeñar mi profesión. A CONACYT por la beca otorgada.

Al Dr. José Guadalupe Rendón Maldonado y el Dr. Sergio Alonso Durán Pérez por aceptar fungir como mis tutores y brindarme la oportunidad de desarrollarme como profesionalista en su laboratorio, por todo su tiempo y esfuerzo para que este trabajo pudiera ser realizado exitosamente, además de sus buenos consejos, conocimiento y asesorías.

A mi familia por su apoyo incondicional, su tiempo, dedicación y paciencia para que pudiera desarrollar este trabajo

A mis amigos y compañeros de laboratorio, por acompañarme en las largas jornadas en el laboratorio.

A mis amigos que me acompañaron en este camino, Estefania, Mariano y Abel, por comprender mis ausencias en tantas reuniones.

# ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE CUADROS.....	XI
I. RESUMEN.....	1
II. ABSTRACT .....	2
III. INTRODUCCIÓN.....	3
IV. ANTECEDENTES .....	4
4.1. Etiología de la gastroenteritis aguda.....	4
4.1.1. Rotavirus .....	4
4.1.2. Calicivirus .....	10
V. JUSTIFICACIÓN .....	25
VI. HIPÓTESIS .....	26
VII. OBJETIVOS .....	27
7.1. Objetivo general.....	27
7.2. Objetivos específicos .....	27
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS .....	28
8.1. Tratamiento de las muestras.....	28
8.2. Extracción de material genético .....	29
8.3. Identificación de rotavirus mediante electroforesis en gel de poliacrilamida 30	
8.4. Genotipificación de rotavirus identificados en las muestras de heces ....	30
8.5. Análisis de la variabilidad de la secuencia del gen que codifica para la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) y VP1 de norovirus.....	32
8.6. Análisis de la variabilidad de la secuencia del gen que codifica para las proteínas estructurales VP4 y VP7 de rotavirus .....	32
8.7. Caracterización <i>in silico</i> de las regiones antigénicas de las proteínas RdRP y VP1 de norovirus y las proteínas estructurales VP4 y VP7 de rotavirus 33	
8.7.1. Recuperación de las secuencias.....	33
8.7.2. Determinación del potencial antigénico.....	33

8.7.3.	Determinación de las características fisicoquímicas .....	33
8.7.4.	Predicción de epítomos para células B, MHC-I y MHC-II .....	34
8.7.5.	Determinación de la alergenicidad y toxicidad .....	34
IX.	RESULTADOS .....	35
9.1.	Descripción de la población .....	35
9.2.	Identificación de rotavirus .....	39
9.3.	Genotipificación de rotavirus.....	39
9.4.	Infección por parásitos .....	39
9.5.	Análisis de la variabilidad de la secuencia del gen que codifica para la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) y VP1 de norovirus.....	43
9.6.	Análisis de la variabilidad de la secuencia del gen que codifica para la proteína VP4 y VP7 de rotavirus.....	46
9.7.	Caracterización <i>in silico</i> las regiones antigénicas de las proteínas de norovirus.....	46
9.7.1.	Determinación del potencial inmunogénico.....	46
9.7.2.	Características fisicoquímicas de las proteínas VP1, VP2 y VPg. 52	
9.7.3.	Predicción de epítomos para células B .....	52
9.7.4.	Predicción de epítomos para MHC-I y MHC-II .....	54
9.7.5.	Evaluación de la alergenicidad y toxicidad.....	54
9.8.	Caracterización <i>in silico</i> las regiones antigénicas de las proteínas de rotavirus.....	58
9.8.1.	Determinación del potencial inmunogénico.....	58
9.8.2.	Características fisicoquímicas de las proteínas VP4, VP6 y VP7. 58	
9.8.3.	Predicción de epítomos para células B .....	62
9.8.4.	Predicción de epítomos para MHC-I y MHC-II .....	62
9.8.5.	Evaluación de la alergenicidad y toxicidad.....	62
X.	DISCUSIÓN.....	65
10.1.	Descripción de la población.....	65
10.2.	Identificación de rotavirus.....	66
10.3.	Identificación de parásitos .....	68
10.4.	Caracterización <i>in silico</i> las regiones antigénicas de las proteínas de norovirus y rotavirus .....	69

XI.	CONCLUSIONES.....	73
11.1.	Conclusión general.....	73
11.2.	Conclusiones específicas.....	73
XII.	PERSPECTIVAS DEL PROYECTO.....	74
XIII.	BIBLIOGRAFÍA.....	75
XIV.	ANEXOS.....	85
14.1.	Documentos complementarios.....	85
14.1.1.	Productos de PCR específica para rotavirus.....	85
14.1.2.	Péptidos de norovirus GI.3 para células B.....	86
14.1.3.	Péptidos de norovirus GII.4 para células B.....	87
14.1.4.	Péptidos de norovirus GI.3 para MHC-I.....	88
14.1.5.	Péptidos de norovirus GII.4 para MHC-I.....	89
14.1.6.	Péptidos de norovirus GI.3 para MHC-II.....	90
14.1.7.	Péptidos de norovirus GII.4 para MHC-II.....	92
14.1.8.	Péptidos de norovirus GI.3 para células B.....	94
14.2.	Productos académicos.....	95
XV.	SIGLAS Y ABREVIACIONES.....	99

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Representación esquemática del virión de rotavirus .....	6
2	Estructura del ARN genómico y subgenómico de norovirus humanos.....	13
3	Esquema del ciclo de infección de norovirus.....	20
4	Clasificación de las muestras.....	36
5	Distribución por género de las muestras analizadas.....	37
6	Distribución etaria de los pacientes.....	38
7	Frecuencia de rotavirus en heces de consistencia líquida.....	40
8	Genotipificación de rotavirus.....	41
9	Identificación de parásitos en heces.....	42
10	Parásitos encontrados en heces.....	44
11	Árbol filogenético basado en la secuencias del gen que codifica para la RNA polimerasa de norovirus.....	45
12	Árbol filogenético basado en la secuencia del gen que codifica para la proteína VP1 de norovirus.....	47
13	Árbol filogenético basado en la secuencia del gen que codifica para la proteína VP4 de rotavirus.....	48

<b>14</b>	Árbol filogenético basado en la secuencia del gen que codifica para la proteína VP7 de rotavirus.....	49
-----------	---	----

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Determinación del potencial inmunogénico de las proteínas estructurales y no estructurales de norovirus GI.3.....	50
2	Determinación del potencial inmunogénico de las proteínas estructurales y no estructurales de norovirus GII.....	51
3	Propiedades fisicoquímicas de las proteínas VP1, VP2 y VPg de las cepas de norovirus GI.3 y GII.4.....	53
4	Epítomos seleccionados de las proteínas de norovirus GI.3 para células B, MHC-I Y MHC-II.....	56
5	Epítomos seleccionados de las proteínas de norovirus GII.4 para células B, MHC-I Y MHC-II.....	59
6	Determinación del potencial inmunogénico de las proteínas estructurales y no estructurales de norovirus GII.....	60
7	Propiedades fisicoquímicas de las proteínas VP4, VP7 y VP6 de rotavirus.....	61
8	Epítomos seleccionados de las proteínas de rotavirus para células B, MHC-I Y MHC-II.....	64

## I.RESUMEN

**Introducción.** La gastroenteritis aguda (GA) es un proceso inflamatorio de la mucosa gástrica e intestinal, anualmente se reportan 1.5 billones de episodios y 1.5-2.5 millones de muertes en niños menores de 5 años. Se estima que al menos el 80% de los casos son debido a una infección por rotavirus, siendo norovirus la segunda causa de GA. **Objetivo.** Analizar la variabilidad genética de las proteínas asociadas con la virulencia de cepas de norovirus y rotavirus identificadas en muestras de origen biológico. **Materiales y métodos.** Se realizó un estudio de tipo transversal, descriptivo y observacional, con un muestreo a conveniencia de heces de individuos de Culiacán. Se obtuvo el material genético de las muestras y se realizó la identificación de rotavirus mediante RT-PCR con *primers*. Se obtuvieron cepas previamente reportadas en el *GenBank*, de las proteínas virales estructurales y no estructurales de cepas de norovirus y rotavirus identificadas en México. Se evaluó la antigenicidad de las proteínas utilizando la herramienta en línea *VaxiJen* v.2.0. se realizó la predicción de epítomos contra células B y T utilizando las herramientas *ABCpred* y *HLApred* respectivamente y se evaluó la toxicidad y alergenicidad con las herramientas *ToxinPred* y *AllergenFP* v.1.0, respectivamente **Resultados.** Se encontró una frecuencia de rotavirus del 4%, el análisis de las secuencias reportadas en México evidencia a norovirus GII.P4 y GII.4 como los más frecuente en México, en el caso de rotavirus fueron el genotipo G9 y P[4]. Se identificaron epítomos de norovirus y rotavirus como posibles candidatos para el desarrollo de una vacuna.

**(Palabras clave:** *norovirus, rotavirus, vacunas, México*)

## II.ABSTRACT

**Introduction.** Acute gastroenteritis (AG) is an inflammatory process of the gastric and intestinal mucosa, the main symptom of which is acute diarrhea. Each year 1.5 billion episodes and 1.5-2.5 million deaths are reported in children under 5 years of age. Several studies estimate that at least 80% of cases are due to rotavirus infection, with norovirus being the second cause of GA. **Objective.** To analyze the genetic variability of proteins associated with the virulence of norovirus and rotavirus strains identified in biological samples. **Materials and methods.** A cross-sectional, descriptive, and observational study was conducted, with a convenience sampling of stool from individuals from Culiacán. Genetic material was obtained from the samples and subsequently subjected to RT-PCR with specific primers to detect rotavirus. Strains of the structural and non-structural viral proteins of norovirus and rotavirus strains identified in Mexico, previously reported in GenBank, were obtained, The antigenicity of the proteins was evaluated using the online tool VaxiJen v.2.0. The prediction of epitopes against B and T cells was conducted using the ABCpred and HLApred tools respectively, and toxicity and allergenicity were evaluated with the ToxinPred and AllergenFP v.1.0 tools, respectively. **Results.** A frequency of rotavirus of 4% was found; the analysis of the sequences reported in Mexico shows norovirus GII.P4 and GII.4 as the most frequent in Mexico; in the case of rotavirus, it was genotype G9 and P [4]. Epitopes of norovirus and rotavirus were identified as candidates for developing a vaccine.

**(Keywords:** norovirus, rotavirus, vaccines, Mexico)

### III.INTRODUCCIÓN

La gastroenteritis aguda (GA) es una enfermedad inflamatoria gastrointestinal, que afecta a la población en general; pero especialmente, es una causa importante de hospitalización pediátrica, principalmente en niños menores de 5 años (Diez-Valcarce y col., 2024). En este grupo de edad representa la segunda causa de muerte con un estimado anual de 1.5 millones (Weerasekara y col., 2016).

La GA se caracteriza por un cuadro diarreico (3 o más deposiciones de consistencia líquida o semilíquida al día), que pueden o no acompañarse de vómito, fiebre y dolor abdominal, con una duración no mayor a dos semanas (Yalda Lucero, 2014).

De acuerdo con el informe realizado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2015 las enfermedades diarreicas causaron más de la mitad de las enfermedades de transmisión alimentaria (ETA) en el mundo, aproximadamente 550 millones enferman y 230,000 mueren al año (OMS, 2015). Los principales afectados son los niños, se estima que 220 millones enfermen y alrededor de 96,000 mueren cada año (OMS, 2015). En las Américas se estima que anualmente 31 millones de niños menores de 5 años enferman, de los cuales 2,000 mueren. El origen infeccioso incluye un amplio rango de agentes patógenos, como virus, bacterias y parásitos, reportándose que el 95% de los casos de GA son causados por norovirus, *Campylobacter*, *Salmonella* no tifoidea y *Escherichia coli* (OMS, 2015).

## IV.ANTECEDENTES

### 4.1. Etiología de la gastroenteritis aguda

La gastroenteritis aguda de origen viral es una de las principales causas de muerte en lactantes y niños pequeños, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo (Hijazi y col., 2022). Entre los 10 principales agentes virales que infectan niños con síntomas de gastroenteritis aguda en el sur de Italia se encuentran norovirus en el 19.7% de los pacientes, seguido de adenovirus en el 15.8%, rotavirus en el 10.5% y sapovirus en el 2.6% (Amoroso y col., 2024).

#### 4.1.1. Rotavirus

Rotavirus es un virus de ARN, sin envoltura, miembros de la familia *Reoviridae*. Fue observado por primera vez en 1973 mediante microscopía electrónica de biopsias de la mucosa duodenal de niños con gastroenteritis severa (Yen y Cortese, 2012).

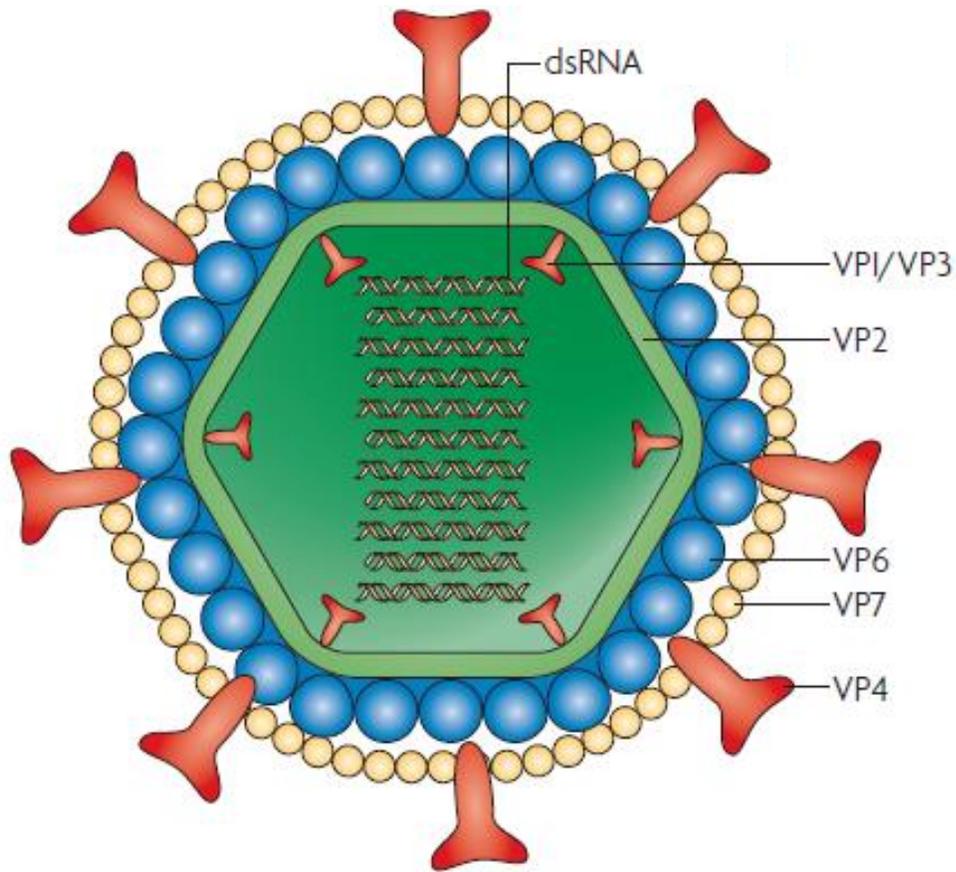
##### 1.1.1.1. Genoma viral

El material genómico de rotavirus consiste en ARN de doble cadena de aproximadamente 18,500 pb, de polaridad positiva, segmentado en 11 genes, cada uno de ellos posee una región corta conservada: 5'-GGC...ACC-3' (Kumar y col., 2022) . La región no traducida (UTR por sus siglas en inglés *untranslated regions*) de los segmentos de ARN son pequeñas, entre 9 y 48 nucleótidos en la región 5' y de 17 a 182 nucleótidos en la región 3' (Liu y col., 2020). Los genes son monocistrónicos, codifican para 6 proteínas estructurales (VP1-VP4, VP6 y VP7) y 6 proteínas no estructurales (NSP1-NSP6), a excepción del segmento 11 que

codifica para dos proteínas no estructurales (NSP5 y NSP6) (Esona & Gautam, 2015). La aparición de algunos signos y síntomas de la enfermedad causada por rotavirus se le atribuye a una proteína no estructural denominada NSP4, que posee actividad de enterotoxina (Desselberger, 2014; Esona y Gautam, 2015).

#### 1.1.1.2. Morfología

Rotavirus posee una cápside icosaédrica de aproximadamente 76.5 nm, que en el caso de la partícula infecciosa se encuentra constituida por 3 capas proteicas (TLP por sus siglas en inglés *triple-layered particle*): la capa interna se encuentra rodeando el genoma viral y está compuesta por 120 copias de la proteína viral VP2 (102 kDa), rodeando la capa interna se encuentra una capa intermedia constituida de 260 trímeros de la proteína VP6 (45 kDa cada monómero), la cual está compuesta de dos dominios, uno distal que consiste en un  $\beta$ -barril tipo *jelly roll*, y uno proximal, de tipo  $\alpha$ -helicoidal, esta proteína interactúa con la proteína VP2 para estabilizar el núcleo y, además, actúa como anclaje para las proteínas de la capa externa, las cuales son fundamentales en la adhesión e ingreso del virus a la célula hospedera (Trask y col., 2012). La capa externa está compuesta de 260 trímeros de la glicoproteína VP7 (37 kDa cada monómero), o proteína tipo G, la proteína VP4 (proteína activada por proteasas o proteína tipo P) se encuentra anclada en esta capa y sobresalen 60 picos triméricos (88 kDa) (Figura 1)(Desselberger, 2014). Las 2 proteínas de membrana poseen antígenos de neutralización, por lo que son clave en la infectividad del virus y su estudio es crítico para el desarrollo de vacunas (Desselberger, 2014; Trask y col., 2012).



**Figura 1. Representación esquemática del virión de rotavirus.** EL virión consiste en 11 segmentos de ARN de doble cadena (dsARN), se encuentra rodeado por una capa proteica interna conformada por las proteínas estructurales VP1 y VP3, una capa intermedia de VP6 y una capa externa de "picos" de proteína VP4 anclados en una cápside de proteína VP7. Modificado de (Angel y col., 2007)

### *1.1.1.3. Replicación viral*

Rotavirus es capaz de infectar a los enterocitos de las microvellosidades del intestino delgado debido a su capacidad para unirse a los antígenos del grupo histo-sanguíneo presentes en la membrana celular, replicándose exclusivamente en el citoplasma de dichas células(Hu y col., 2018). Para que las partículas virales sean capaces de infectar a las células es necesario que los picos de la proteína VP4 sean escindidos proteolíticamente en dos fragmentos, VP8 (28 kDa) y VP5 (60 kDa) por las proteasas tipo tripsina del tracto gastrointestinal del hospedero (Trask y col., 2012). Una vez escindida, la proteína VP8 interactúa con sialoglicanos o los antígenos del grupo sanguíneo presentes en la superficie de la célula, permitiendo el ingreso del virus mediante un endosoma temprano, posteriormente el virus pierde la membrana externa y queda libre en el citosol una partícula de doble capa, donde el RNA de sentido positivo es utilizado para la síntesis de las proteínas virales o como templado para la síntesis de RNA de sentido negativo durante la replicación(Trask y col., 2012). Las proteínas no estructurales NSP2 y NSP5 interactúan para formar el viroplasma que secuestra los componentes requeridos para la replicación del genoma y las partículas virales(Hu y col., 2018; Trask y col., 2012). El genoma es empaquetado en partículas de doble capa, que interactúa con la proteína NPS4 en la cara citosólica del RE permitiendo su paso mientras adquiere una membrana intermediaria la cual posteriormente es desplazada por la proteína VP7, el virión es liberado mediante exocitosis o lisis celular, una vez expuesto en el tracto gastrointestinal por acción

de proteasas tipo tripsina el virión sufre un proceso de maduración escindiendo la proteína VP4 para producir la partícula infecciosa(Trask y col., 2012).

#### *1.1.1.4. Clasificación*

Las diferencias antigénicas en las secuencias y patrones del genoma han permitido clasificar a rotavirus en serogrupos (grupos), subgrupos, serotipos/genotipos y electroferotipos(Tran y col., 2023). Diferencias en la proteína VP6 han permitido clasificarlos en al menos 8 grupos designados con las letras de la A-H; sin embargo, solo los genotipos A, B, C y H son capaces de causar la enfermedad en seres humanos, siendo el grupo A el responsable de alrededor del 90% de todas las infecciones en el ser humano y se encuentra dividido en 4 subgrupos (SGI, SGII, SGI+II y SG non I-non II) (Tran y col., 2023). Los serotipos/genotipos se basan en los antígenos de VP7 (G) y VP4 (P), el término serotipo y genotipo depende del método de detección, si se encuentra basado en la detección de antígenos se denominan serotipos, o basados en la detección de ácidos nucleicos se denominan genotipos (Esona y Gautam, 2015; Tran y col., 2023).

#### *1.1.1.5. Profilaxis*

Existen dos vacunas comerciales que brindan protección contra rotavirus, una vacuna monovalente (Rotarix®, GlaxoSmithKline Biologicals Inc), que consiste en la cepa atenuada RIX4414 de rotavirus humano G1P8 y una pentavalente (RV5, RotaTaq®, Merck & Co, Inc)(Raboni y col., 2014). A diferencia de Rotarix®, la vacuna Rotarix® es obtenida por recombinación de la cepa WC3 de rotavirus bovino y cepas de rotavirus humano que expresan la proteína VP7 de los tipos G1,

G2, G3, G4 y la proteína VP4 del genotipo P [8], ambas asociadas con la estimulación de la respuesta inmune (Mans y col., 2016; Steele y col., 2019)

Se ha demostrado que en México hubo una reducción de la mortalidad en México en un rango de 52.6 hasta 66.9% en niños menores de 5 años, después de la implementación de la vacunación durante 2007 (Guzman-Holst y col., 2021). Diversas investigaciones reportan que la efectividad de la vacuna monovalente es de aproximadamente del 57% en países con bajo desarrollo y de la vacuna pentavalente es de 45%, mientras que en países desarrollados se reporta un 80% y 95%, respectivamente (Guzman-Holst y col., 2021; Comité CAV-AEP, 2024).

La baja efectividad de ambas vacunas en países en vías de desarrollo comparado con países desarrollados puede estar relacionada con la distribución de los genotipos identificados en nuestra región, por lo que es importante la realización de estudios epidemiológicos que nos permitan la identificación de regiones conservadas entre los genotipos frecuentes en el país que pudieran ser utilizadas para el desarrollo de una vacuna más eficaz.

Un estudio realizado por Raboni y col., en 2014 reportó que la vacunación contra rotavirus redujo en un 44% el número de hospitalizaciones por gastroenteritis en niños menores de 12 meses (Raboni y col., 2014). Con la implementación de vacunas contra rotavirus, la infección por norovirus se ha convertido en un llamado de atención, debido a que el número de casos de diarrea por este virus va en aumento, convirtiéndolo en la segunda causa de diarrea en niños en el mundo, por lo que es importante conocer el comportamiento y distribución de estos virus como agentes causales de GA (Siqueira y col., 2017)

#### 4.1.2. Calicivirus

La familia *Caliciviridae*, comprenden diversos virus que infectan tanto a animales como a seres humanos. Está compuesta por cinco géneros: *Norovirus*, *Sapovirus*, *Lagovirus*, *Vesivirus* y *Beco/Nebovirus*. Los géneros de importancia médica son *Norovirus* y *Sapovirus*, debido a que se han reportado como agentes causales de gastroenteritis en seres humanos (Gutiérrez-Escolano, 2014).

##### 4.1.2.1. *Norovirus humano*

Norovirus humano (HuNVs por sus siglas en inglés *Human norovirus*) es la principal causa de brotes de gastroenteritis no bacteriana en el mundo que afecta tanto a adultos como a infantes menores de 5 años, particularmente en esta población, son la segunda causa de morbi-mortalidad (Rouhani y col., 2016).

Los brotes de norovirus ocurren en lugares cerrados, tales como: cruceros, escuelas, hospitales y casas de asistencia, debido a características propias del virus, ya que poseen un periodo de incubación corto (1.2 días), alta virulencia y baja dosis infectiva (17 viriones son suficientes para que se desarrolle la infección), son extremadamente estables en el medio ambiente, (persistente en superficies sólidas y en agua) de fácil transmisión de persona a persona (69%), mediante aerosoles, por contacto directo o vía oral al consumir alimentos o agua contaminados (23%); además, diversos estudios han demostrado que las superficies del entorno en espacios compartidos juegan un papel importante en la transmisión del virus (Atmar y col., 2008; Weerasekara y col., 2016). En un estudio realizado con muestras obtenidas de 751 establecimientos de comida se encontró que el 1.5% (61) de las superficies evaluadas resultaron positivas para norovirus

humano (29 GI y 32 GII). De las 61 muestras positivas, 30 fueron del asiento del inodoro, 13 de la palanca del inodoro, 11 de la manija interna de la puerta y 7 de la manija del lavabo. Dichos resultados confirman que los viriones encontrados en las diversas superficies son capaces de infectar a aquellos individuos que tengan contacto con las mismas, representando un importante foco de infección (Leone et al., 2018).

La aparición de los síntomas en individuos sanos se presenta de 10-51 horas posterior a la exposición. La enfermedad se caracteriza por la presencia de náuseas, vómito, diarrea acuosa, fiebre, dolor de estómago y cabeza. Sin embargo, individuos inmunocomprometidos, niños y/o ancianos es posible que experimenten síntomas más severos y/o duración prolongada de la enfermedad, incluso diarrea crónica(Mans y col., 2016).

Se ha reportado que un individuo infectado, a pesar de la desaparición de los síntomas, continúa excretando partículas virales en las heces por un periodo entre 1-2 meses, convirtiéndose en portador asintomático de la infección, siendo capaz de propagar la enfermedad(Kaufman et al., 2014; Wingfield et al., 2010).

Diversos estudios han reportado que la infección por HuNVs, además de la gastroenteritis aguda, está asociada con el desarrollo de enterocolitis necrotizante en niños prematuros, síndrome de colon irritable, y diarrea sanguinolenta en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal(Karst y col., 2015). También se encuentran asociados con patologías neurológicas como convulsiones benignas infantiles, encefalopatía y coagulación intravascular diseminada, esto debido a la propagación extraintestinal del virus (Karst y col., 2015)

#### 4.1.2.2. *Morfología*

HuNVs presentan una forma esférica, simetría icosaédrica y carecen de envoltura, los viriones contienen 180 copias, o 90 dímeros de VP1 que se ensamblan en partículas icosaédricas que exhiben simetría T=3 (compuesto de 12 capsómeros pentaméricos y 20 hexaméricos, para un total de 180 proteínas de la cápside)(Karst, 2010). Sin embargo, cada virión únicamente contiene de 1-2 copias en su genoma, algunos estudios sugieren que esta proteína puede participar en la encapsidación del genoma viral (Gutiérrez-Escolano, 2014; Karst, 2010). La cápside viral posee dos dominios: un dominio Shell (S) y un dominio sobresaliente (P), unidos por una bisagra flexible. El dominio S está compuesto por 225 residuos de la proteína de la cápside y forma el núcleo estructural de la cápside, mientras que el dominio P se extiende de la superficie, además se encuentra dividido en 2 subdominios, P1 y un dominio P2 hipervariable, que sobresale de la cápside y posee sitios putativos de unión a receptor (Donaldson y col., 2010).

#### 4.1.2.3. *Genoma viral*

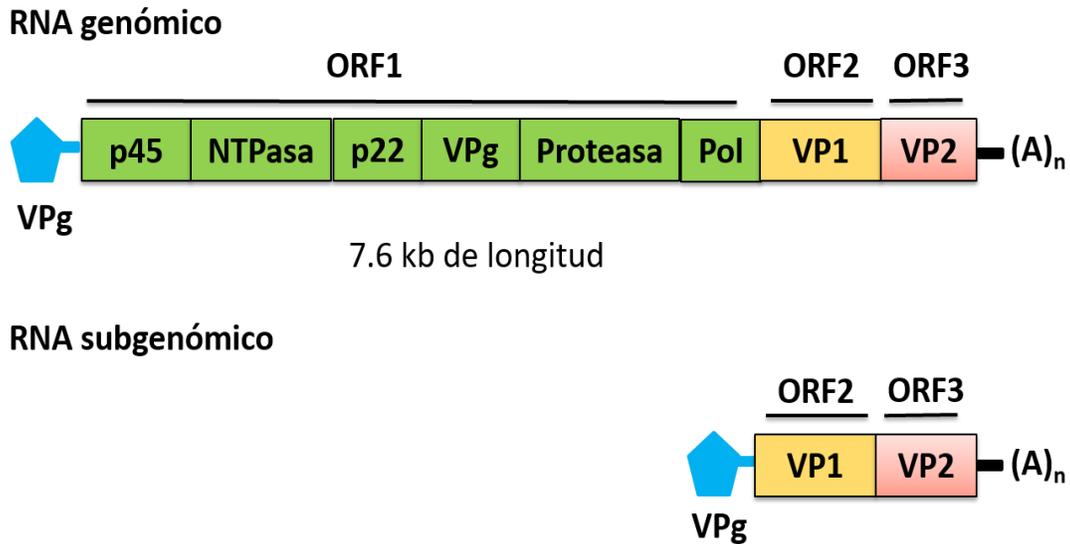
Poseen un genoma de ARN lineal, monocatenario de polaridad positiva, de 7.4-7.7 kb, la región 5'-UTR del genoma está asociado covalentemente a una proteína codificada por el virus conocida como VPg y la región 3'-UTR se encuentra poliadenilado. Se encuentra dividido en tres marcos de lectura abierta (ORFs): el ORF1 codifica para una poliproteína, que posteriormente es escindida por una proteasa codificada por el mismo virus (NS6), en al menos siete proteínas no estructurales (NS) maduras (NS1-NS7) (Gutiérrez-Escolano, 2014; Teng-Feng

y col., 2018). Los ORF2 y ORF3 son traducidos de un ARN subgenómico y codifican para la proteína estructural mayoritaria (VP1) y minoritaria (VP2), respectivamente (Figura 2). El ARN subgenómico es idéntico a las últimas 2.4 Kb del ARN genómico y también se encuentra asociado a una VPg y posee una cola de poli (A) (Gutiérrez-Escolano, 2014; Teng-Feng y col., 2018; Thorne y Goodfellow, 2014).

Debido a que actualmente no se ha establecido un modelo celular para el estudio de HuNVs, es poca la información que se conoce acerca de las funciones de las proteínas no estructurales; sin embargo, utilizando modelo de norovirus murino se ha definido la actividad para algunas de ellas (Teng-Feng y col., 2018; Thorne y Goodfellow, 2014).

#### *4.1.2.4. Clasificación*

Con base en el análisis de la secuencia completa de aminoácidos de la proteína de la cápside, norovirus se clasifica en siete genogrupos (GI-GVII) (Donaldson y col., 2010). GI, GII y GIV se encuentran asociados a la infección en seres humanos y dentro de cada grupo hay múltiples genotipos (Rouhani y col., 2016). Es un virus ARN que presentan gran diversidad genética, existen al menos 25 genotipos, principalmente del genogrupo I (GI) y genogrupo II (GII), los cuales son los responsables de la enfermedad en seres humanos (Donaldson y col., 2010; Rouhani y col., 2016). Las cepas en un genotipo comparten entre 69-97% de similitud nucleotídica, a nivel genómico, mientras que cepas de diversos genogrupos tienen entre 51 y 56% de similitud genómica (Donaldson., 2010; Rouhaniy col., 2016).



**Figura 2. Estructura del ARN genómico y subgenómico de norovirus humanos.** La región 5' proximal codifica todas las proteínas no estructurales en un único marco de lectura abierta (ORF1), mientras que la región 3' proximal, que se transcribe en un mensaje subgenómico, codifica las proteínas de la cápside mayor (VP1) y menor (VP2) en dos ORFs separados (ORF2 y ORF3) Modificado de (Karst, 2010)

Por otro parte, las proteínas estructurales entre cepas del mismo genotipo difieren >40% en la secuencia aminoacídica de la cápside y en el caso de cepas de diferentes genotipos difieren en >50% (Donaldson y col., 2010; Rouhani y col., 2016).

Los HuNVs se caracterizan por una alta diversidad genética y recombinación; sin embargo, el genotipo 4 del genogrupo II (GII.4) se ha encontrado involucrado en >80% de los brotes de gastroenteritis durante los últimos 20 años (Mans y col., 2016).

La elevada prevalencia de este genotipo se debe a factores intrínsecos tanto del hospedero como del virus. Entre los factores propios del virus destacan los siguientes: 1) los virus GII.4 son capaces de unirse a los antígenos de todos los grupos sanguíneos, afectando la infectividad viral, 2) posee alta capacidad de alterar sus blancos de unión a carbohidratos, permitiéndole evadir la respuesta inmune, 3) este genotipo posee mayor tasa de mutación y evolución que otros NoVs y 4) tienen en promedio 1.7 veces mayor tasa de evolución dentro de la secuencia de la cápside, lo cual les permite persistir durante más tiempo (Raboni y col., 2014).

En la actualidad, no se ha reportado transmisión zoonótica de norovirus; sin embargo, algunos grupos de investigación han reportado su potencial de transmisión, y se ha encontrado evidencia serológica de HuNVs en cerdos (Farkas y col., 2005); además, se ha logrado infectar cerdos gnotobióticos con HuNVs; no obstante, no todos los cerdos inoculados presentaron la enfermedad, por lo que al igual que en seres humanos la variabilidad genética podría jugar un papel

importante en la susceptibilidad a la infección (Cheetham y col., 2006) . Es necesario la realización de más estudios que permitan esclarecer el potencial zoonótico de norovirus y confirmar si los animales representan un reservorio para la emergencia de nuevas cepas (Thorne y Goodfellow, 2014).

#### 4.1.2.5. *Ciclo viral*

El proceso de infección inicia con la unión de las partículas virales a los receptores de la célula hospedera, seguido de la interacción con moléculas adicionales, que facilitan la entrada del virus mediante cambios conformacionales en la cápside viral, activación de la señalización celular o promoviendo la endocitosis(Bartnicki y col., 2017). El virus interactúa con el complejo terminal de carbohidratos o lípidos y cadenas de glicanos asociados a proteínas y con los antígenos del grupo histo-sanguíneo (HBGAs)(Bartnicki y col., 2017; Donaldson y col., 2010) . El dímero P de HuNVs posee 4 sitios de unión, de los cuales dos se unen mediante enlace  $\alpha 1, 2$  a la fucosa en HBGAs, por acción de la  $\alpha(1,2)$  fucosiltransferasa (FUT2), que es responsable de la generación de los antígenos H1 y H3, que se encuentran presentes en la superficie de la mucosa y son capaces de unirse a VLPs (del inglés *Virus-like particle*) de norovirus GI.1(Bartnicki y col., 2017; Donaldson y col., 2010; Weerasekara y col., 2016). Aquellos individuos que poseen una enzima funcional se denominan secretores y los que no poseen una enzima funcional como no secretores, aumentando la susceptibilidad de los primeros a la infección por HuNVs. Análisis experimentales utilizando VLPs de NV GI.1 han demostrado ser capaces de unirse a células epiteliales gastroduodenales de individuos secretores (Bartnicki y col., 2017;

Donaldson y col., 2010; Weerasekara y col., 2016). Existen estudios que demuestran que los individuos que poseen el grupo sanguíneo O son más susceptibles a la infección de NV GI.1, otros estudios reportan que individuos con grupo sanguíneo B poseen menor incidencia de infección con NV GI, dichos estudios sugieren que las cepas de norovirus se unen con diferente afinidad a los HBGA. Además de los HBGA el virión puede interactuar con motivos de ácido siálico, glicolípidos y heparán sulfato mediante el subdominio P2 de la proteína VP1 del virus e ingresar a la célula mediante endocitosis no mediada por clatrina y caveolina, independiente de pH y dependiente de dinamina-2 y colesterol (Bartnicki y col., 2017; Donaldson y col., 2010; Weerasekara y col., 2016).

Una vez en el citoplasma el ARN asociado a VPg es descubierto y utilizado como mARN para la traducción del genoma viral, para que esto ocurra es necesario que el ARN viral sea reconocido por factores iniciadores de la traducción y ser traducido a proteínas por el equipo de traducción (Thorne y Goodfellow, 2014). La proteína asociada al genoma (VPg) actúa como caperuza (cap) e interactúa con los componentes del factor de inicio de la traducción eIF4F, específicamente, con eIF4F, proteínas de unión a cap y eIF3, el cual es reclutado al complejo e interviene en el reclutamiento del complejo de 43S de pre-iniciación (Weerasekara y col., 2016)

El ORF1 es traducido en una poliproteína, que es escindida por una proteasa propia del virus en 6 proteínas no estructurales p48, NTPasa, p22, VPG, Pro y RdRp, listas para la formación del complejo de replicación y sus precursores (Thorne y Goodfellow, 2014; Weerasekara y col., 2016). Posteriormente se inicia

la replicación del genoma viral en el complejo de replicación (RC), el cual está formado por el reclutamiento de la membrana del retículo endoplásmico, sistema de Golgi, endosomas y las proteínas no estructurales p48 y p22 (Thorne y Goodfellow, 2014; Weerasekara y col., 2016). El ARN de sentido positivo se utiliza para la síntesis de la hebra de ARN de sentido negativo por acción de la ARNpolimerasa dependiente de ARN, la nueva cadena es utilizada como templado para la síntesis de nuevo ARN genómico y subgenómico (Thorne y Goodfellow, 2014; Weerasekara y col., 2016)

Simultáneamente, el ARN subgenómico es traducido a las proteínas VP1 y VP2, para formar las cápsides de los nuevos viriones. Debido a que el ARN subgenómico es policistrónico la traducción de VP2 ocurre por un mecanismo de terminación-reiniciación, es decir, una vez que concluye la traducción del ORF2 (VP1) los ribosomas permanecen asociados al ARN para reiniciar al inicio del ORF3 (VP2), esto es debido a un traslape de los codones de paro e inicio del ORF2 y ORF3, respectivamente (Naphthine y col., 2009)

La replicación del ARN genómico; así como, el subgenómico son generados por acción de la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp o NS7) mediante dos mecanismos de síntesis de ARN: iniciación *de novo* e iniciación dependiente de VPg (Thorne y Goodfellow, 2014). La iniciación *de novo* es utilizada para la síntesis del ARN genómico y subgenómico de sentido negativo, permitiendo la generación de la forma replicativa (RF por sus siglas en inglés *replicative form*) de doble cadena que es indispensable para la síntesis del ARN genómico y subgenómico de sentido positivo, este proceso es dependiente de VPg, ya que

esta proteína es utilizada por la RdRp como *primer* para la síntesis del ARN (Thorne y Goodfellow, 2014). Una vez ensambladas las proteínas estructurales y empaquetado el material genético del virus, el virión maduro es liberado de las células (Figura 3).

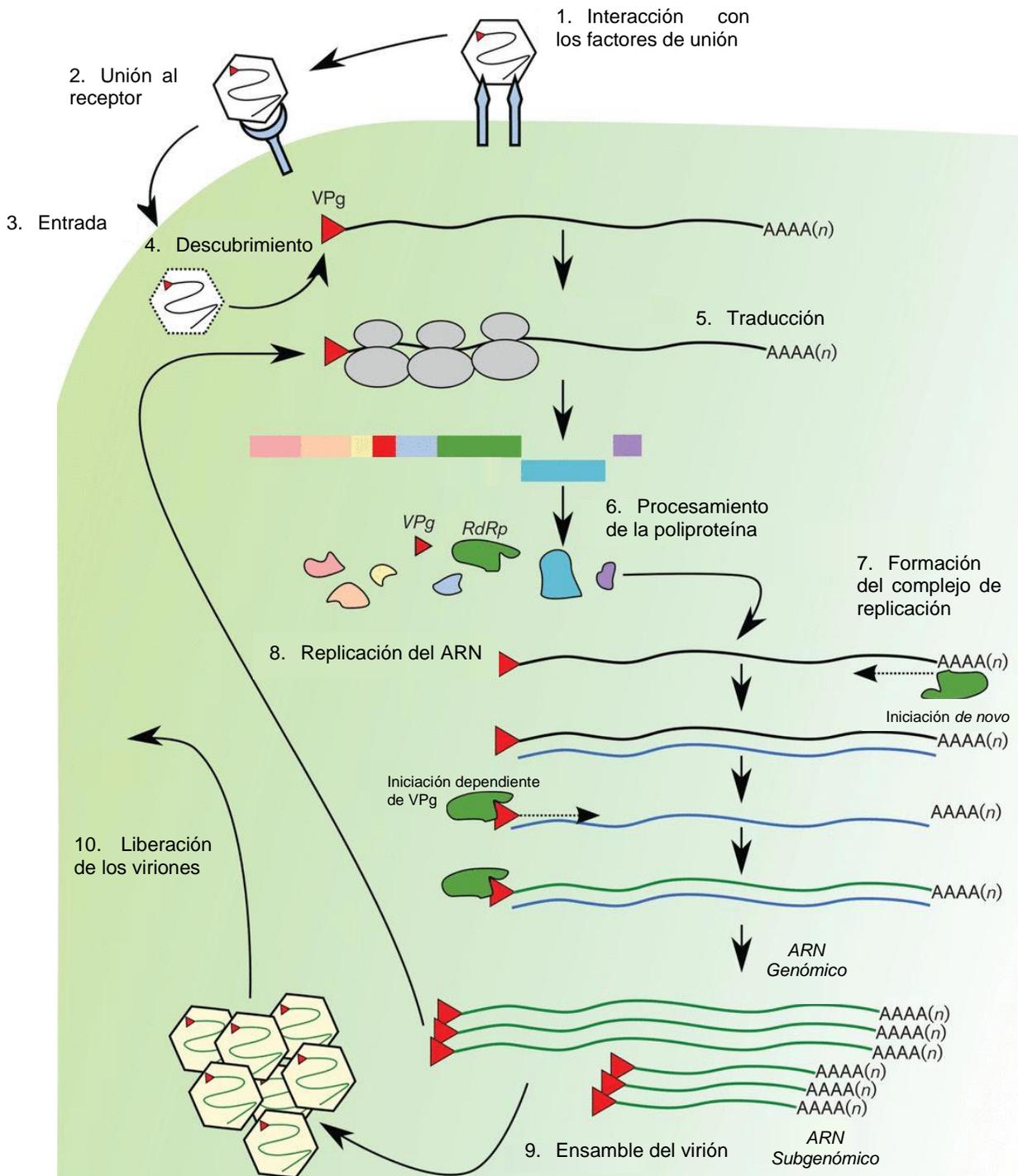
#### 4.1.2.6. *Patogénesis*

Durante la infección por norovirus se desarrollan cambios histopatológicos en el intestino delgado, tales como, ensanchamiento y aplanamiento de las microvellosidades (Karst y col., 2015). Además, se presenta mala absorción transitoria de D-xilosa, grasa y lactosa, que podría estar relacionado con el acortamiento de las microvellosidades y la disminución de la actividad de las enzimas presentes en la membrana del borde en cepillo de las células epiteliales del intestino delgado (Karst y col., 2015).

Actualmente, el conocimiento acerca de la patogénesis y el tropismo celular de HuNVs es limitado; sin embargo, diversos grupos de investigación se han esforzado en dilucidar esta información, Grau y col., en 2017 reportaron que los blancos celulares de norovirus murino inoculados de manera oral en ratones inmunocompetentes eran macrófagos, células dendríticas, linfocitos B y linfocitos T en el tejido linfoide asociado al intestino (Grau y col., 2017).

#### 4.1.2.7. *Epidemiología*

En una revisión de la literatura de enero de 1990 a febrero de 2008 se estimó que el 12% de todos los casos de gastroenteritis aguda esporádica eran provocados por una infección con HuNVs (Ahmed y col., 2014).



**Figura 3. Esquema del ciclo de infección de norovirus.** La entrada del virus es mediada por receptores, pierde la cápside y deja libre el ARN que se traduce en una poliproteína que es escindida. En el complejo de replicación se sintetiza el ARN nuevo, el cual es empaquetado en las cápsides y los viriones son liberados.

En 2014 estimó que HuNVs era responsable del 18% (intervalo de confianza del 95% (IC) 15-20) de gastroenteritis en niños <5 años, con lo cual se podría inferir que los casos de gastroenteritis ocasionada por HuNVs aumenta con el paso del tiempo, esto puede ser debido al desarrollo de técnicas moleculares para la detección de HuNVs (Page y col, 2017).

Se estima que solamente en Estados Unidos ocurren aproximadamente 23 millones de infecciones por norovirus cada año, causando 50 mil hospitalizaciones y 300 muertes. En el ámbito clínico, se estima que causa más de un millón de hospitalizaciones y 200,000 muertes de niños pequeños en los países en desarrollo cada año. Las elevadas tasas de infecciones se deben a la alta capacidad para transmitirse, además de que pueden propagarse a través de la exposición a las fuentes de alimentos o agua contaminados, contacto de persona a persona, partículas de vómito y fómites (Karst, 2010).

Existen estudios que describen altas tasas de infección vírica entérica aguda en individuos VIH-positivos, se reporta que existe un sinergismo directo entre el VIH y norovirus sobre el aplanamiento de las vellosidades del intestino, además que aquellos individuos inmunocomprometidos excretan norovirus durante más tiempo, comparados con aquellos que son inmunocompetentes (Wingfield y col., 2010)

Los brotes de norovirus frecuentemente ocurren en lugares semi-cerrados, tales como, hogares de ancianos, instalaciones militares, escuelas, hospitales, cruceros, entre otros. Durante 2002-2007 surgieron nuevas variantes del virus GII.4 y se han encontrado en brotes de muchos países; sin embargo, una nueva

variante del NoV GII.4 emerge cada pocos años, reemplazando rápidamente a la cepa dominante en circulación, dificultando la aprobación de una vacuna eficaz que brinde protección contra las cepas nuevas (Ahmed et al., 2014; Mans et al., 2016).

En un estudio de cohorte realizado por Rouhani y colaboradores en 2016, destacan la importante incidencia de norovirus en 8 países, ya que norovirus fue el tercer patógeno más prevalente en 7077 muestras diarreicas recolectadas de 1457 niños. Más de la mitad de los 199 niños en la cohorte longitudinal experimentaron al menos 1 episodio de infección por norovirus GI y más del 80% experimentaron al menos un episodio de infección por norovirus GII en los primeros 2 años de vida. Esto se suma a la creciente evidencia de la alta prevalencia de norovirus en la comunidad entre los niños que viven en condición de pobreza.

Mans y colaboradores reportaron en 2008 la presencia de norovirus en 14.3% (35/245) de muestras de niños hospitalizados con gastroenteritis en Pretoria, Sudáfrica. Además, se identificó la presencia de 3 genotipos de GI y 8 de GII.

En un reporte de distribución de NVs de muestras recolectadas entre 2005 y 2009 en diversos estados de Brasil demostraron que los virus GII.4 son predominantes (78%), seguido de GII.6 (7.8%), GII.12 (6.2%), GII.17 (3.1%), GII.7 (1.5%) y GII.16 (1.5%) (Siqueira et al., 2017).

En 2014, se detectó una nueva variante emergente GII.P17/GII.17 en China, la cual rápidamente se esparció a otros países de Asia y para el 2015 la variante

se detectó en Europa y América Latina. La evolución rápida, la extensión y la prevalencia de esta variante se pueden comparar con las tendencias epidemiológicas de GII.4 a lo largo de los años (Andrade et al., 2017).

En México, son escasos los estudios relacionados con la epidemiología molecular de norovirus, un estudio publicado en 20 por Gutiérrez Escolano y colaboradores reporta una frecuencia de calicivirus humano (HuCVs) de 5.6% (22/396) en muestras de niños hospitalizados en diferentes Centros Médicos de la Ciudad de México durante 1998 y 2000. Además, se realizó la genotipificación de dichas muestras, obteniendo que 11/19 muestras se agruparon como GII/4.

#### 4.1.2.8. *Tratamiento*

El desarrollo de fármacos para combatir la infección de norovirus humano se ha visto comprometido debido a que los sistemas de cultivo celular propuestos no han permitido confirmar los mecanismos patogénicos de los HuNVs (Kaufman et al., 2014).

Se ha utilizado norovirus murino (MNV por sus siglas en inglés *Murine norovirus*) como modelo de estudio para HuNVs, sin embargo, algunos estudios han reportado que existen diferencias en las cápsides de estos virus por lo que MNV podría ser un modelo imperfecto de estudio. Con la finalidad de obtener información clara acerca de la patogénesis del virus; así como el desarrollo de terapias antivirales, se ha trabajado en el desarrollo de diversos modelos. Actualmente se han utilizado cerdos gnobióticos para estudiar la patogénesis del virus, así como para evaluar antivirales, debido a que éstos poseen anatomía gastrointestinal, fisiología y respuesta inmune similar al ser humano. Además,

recientemente se han utilizado con éxito células B inmortalizadas y ratones inmunocomprometidos para replicar HuNVs. El desarrollo de dichos modelos podrían proporcionar las bases para el entendimiento del ciclo de replicación del virus, permitiendo la elaboración y evaluación de tratamientos y vacunas efectivos (Weerasekara et al., 2016).

#### *4.1.2.9. Profilaxis*

La gran diversidad genética y antigénica de los HuNVs impide el desarrollo de vacunas eficaces que brinden protección cruzada contra las diferentes cepas circulantes. Sin embargo, se han realizado diversos estudios que han permitido el desarrollo de una vacuna bivalente, basada en el genotipo GI.1 y VLPs recombinantes, para la cual se utilizaron secuencias consenso de tres variantes de GII.4, con algunas mutaciones puntuales. Las VPLs induce la respuesta de los anticuerpos que reconocen una gran cantidad de variantes GII.4, por lo que podrían tener potencial para el desarrollo de una vacuna (Venkataram Prasad et al., 2016).

## **V.JUSTIFICACIÓN**

En México en 2019 se reportaron 5,666,478 de casos de infecciones intestinales de las cuales 5,248,788 se reportaron como mal definidas; sin embargo, se conoce que norovirus y rotavirus son los principales agentes etiológicos, y se ha evidenciado que la diversidad genética se relaciona con las características clínicas de la enfermedad, ya que eventualmente la infección puede ser asintomática. En México y particularmente en Sinaloa, se carece de reportes sobre la frecuencia y distribución de los genotipos virales y debido a que modificaciones en la secuencia del genoma viral pueden ocasionar mayor afinidad por la célula hospedera, así como, la evasión de la respuesta inmune, es necesario realizar estudios epidemiológicos que contribuyan al establecimiento de la dinámica evolutiva de norovirus y rotavirus.

## **VI.HIPÓTESIS**

Se encontrará diversidad genética en la secuencia en los genes que codifican para la ARN polimerasa dependiente de ARN viral (RdRp) y las proteínas estructurales asociadas con la virulencia y patogenicidad viral de norovirus (VP1) y rotavirus (VP4 y VP7) de cepas identificadas en muestras de origen biológico del municipio de Culiacán.

## VII.OBJETIVOS

### 7.1. Objetivo general

Analizar la variabilidad genética de las proteínas asociadas con la virulencia de cepas de norovirus y rotavirus identificadas en muestras de origen biológico del municipio de Culiacán.

### 7.2. Objetivos específicos

7.2.1. Identificar la presencia de rotavirus en muestras biológicas del municipio de Culiacán.

7.2.2. Determinar los genotipos de rotavirus encontrados en las muestras biológicas.

7.2.3. Analizar la variabilidad de la secuencia del gen de la ARN polimerasa y VP1 de norovirus.

7.2.4. Analizar la variabilidad de la secuencia del gen VP4 y VP7 de rotavirus.

7.2.5. Caracterizar *in silico* las regiones antigénicas de la proteína VP1 de las cepas encontradas de norovirus, VP4 y VP7 de rotavirus.

## **VIII.MATERIALES Y MÉTODOS**

Se realizó un estudio de tipo descriptivo, transversal, observacional y comparativo, el muestreo será a conveniencia. Las muestras procesadas fueron donadas por laboratorios de análisis clínicos del municipio de Culiacán. Se obtuvieron datos de identificación del paciente; así como, edad y género.

### **Criterios de inclusión**

Para las muestras de origen biológico, se incluyeron heces de individuos que acudieron a los laboratorios de análisis clínicos del municipio de Culiacán, las cuales serán organizadas en dos grupos; Grupo A: heces diarreicas, Grupo B: heces no diarreicas.

### **Criterios de exclusión**

Serán excluidas las muestras biológicas de aquellos individuos que no se cuente con la información completa.

### **Criterios de eliminación**

Serán descartadas aquellas muestras que sean recolectadas en recipientes inadecuado, que sea insuficiente para el procesamiento adecuado o cuyo control de reacción resulte negativo.

#### **8.1. Tratamiento de las muestras**

Las muestras de heces fueron recolectadas con ayuda de un aplicador de madera y depositada en tubos estériles. Posteriormente, fueron transportadas en hielo al Laboratorio de Microscopía, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa y congeladas a -20°C hasta su análisis.

Se preparó una suspensión de heces al 10% con agua estéril y se realizaron alícuotas de 200 µl para la extracción del material genético. Las alícuotas que no fueron utilizadas se almacenaron a -70 °C para análisis posteriores (Tolentino-Ruiz y col., 2012)

## **8.2. Extracción de material genético**

Se realizó una suspensión de las heces al 10% con agua tratada con DEPC (dietilpirocarbonato), de la cual se utilizaron 250 µl para la extracción de ARN viral utilizando TRIzol (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, con algunas modificaciones (Farkas y col., 2004).

Se agregaron 750 µl de TRIzol por cada 250 µl de muestra y fueron mezcladas por vórtex durante 30 segundos. Después se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos para permitir la disociación completa del complejo de nucleoproteínas. A continuación, se agregaron 200 µl de cloroformo, se mezclaron por vórtex durante 30 segundos y fueron incubadas durante 3 minutos a temperatura ambiente; luego se centrifugaron por 5 minutos a 12 000 rpm a 4°C. La fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo, se le añadieron 900 µl de isopropanol frío, se homogenizó por inversión y las muestras fueron incubadas por 20 minutos a -20°C. Posteriormente, se centrifugó durante 15 minutos a 12 000 rpm a 4°C, se decantó el isopropanol (sobrenadante), el precipitado de ARN total forma un sedimento blanco similar a un gel en la parte inferior del tubo.

Se realizaron dos lavados al *pellet* de ARN con 1 mL de etanol al 75% y se centrifugó durante 5 minutos a 7 500 rpm. Finalmente, se decantó el sobrenadante

y se dejó secar al aire por 15-20 minutos. El ARN fue resuspendido en 30 µl de tratada con DEPC, y almacenado a -20°C hasta su uso.

### **8.3. Identificación de rotavirus mediante electroforesis en gel de poliacrilamida**

La identificación de rotavirus se realizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y tinción de plata realizando algunas modificaciones a lo descrito por Dubal y col., 2015. El patrón electroforético se comparó contra un control positivo para rotavirus (Dubal et al., 2015).

### **8.4. Genotipificación de rotavirus identificados en las muestras de heces**

Se confirmó la presencia de rotavirus en las muestras y se determinó el genotipo viral siguiendo la metodología descrita por Iturriza-Gómara, 2004. Para determinar el genotipo G de rotavirus, se amplificó un fragmento de 881 pb del gen que codifica para la proteína VP7, y la determinación del genotipo P, con *primers* específicos que amplificaron un fragmento de 876 pb del gen que codifica para la proteína VP4, se ha reportado que dichas proteínas sufren mutaciones puntuales, originando la circulación de una gran variedad de genotipos. Las secuencias de los *primers* utilizados son las siguientes:

VP7- F GTATGGTATTGAATATACCAC

VP7-R ACTTGCCACCATTTTTTCCAA

VP4-F TGGCTTCGCCATTTTATAGACA

VP4-R ATTTCCGGACCATTTATAACC

Se realizó la retrotranscripción del ARN obtenido previamente, utilizando el *primer reverse* específico para VP4 y VP7, en reacciones de retrotranscripción independientes. El cDNA fue utilizado como templado PCR punto final utilizando las siguientes condiciones de reacción para VP4, 5 µl de *Buffer* de reacción 5X, 2.5 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1.0 µl de dNTP's, 1.0 µl de cada *primer* (10 µM cada uno), 1.0 µl de Taq polimerasa, la mezcla de reacción se llevó a un volumen de 20 µl con agua inyectable, se utilizaron 5 µl de cDNA obteniendo un volumen final de reacción de 25 µl, la mezcla de reacción para la amplificación de VP7 fue la siguiente: 4 µl de *Buffer* de reacción 5X, 0.8 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0.25 µl de dNTP's, 1.0 µl de cada *primer* (10 µM cada uno), 1.0 µl de Taq polimerasa, la mezcla de reacción se llevó a un volumen de 20 µl con agua inyectable, se utilizaron 5 µl de cDNA obteniendo un volumen final de reacción de 25 µl. Los productos de amplificación fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 2%, utilizando *gel red* como agente intercalante y visualizado con ayuda de un transiluminador U.V

Para la determinación del genotipo, se utilizó el producto obtenido para realizar una PCR semi anidada con *primers* específicos para cada genotipo. El producto de PCR fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 2% y fue visualizado con ayuda de un transiluminador UV, el genotipo fue determinado dependiendo el tamaño desde las 179 hasta 682 pb para el genotipo G y de 312 hasta 583 pb para el genotipo P.

### **8.5. Análisis de la variabilidad de la secuencia del gen que codifica para la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) y VP1 de norovirus**

Se realizó una búsqueda sistemática en la base de datos del *GenBank*, de secuencias del gen que codifica para la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) y el gen que codifica para la proteína estructural VP1 de norovirus identificadas en México. Una vez generado el banco de secuencias se determinaron los genotipos mediante la herramienta en línea *Norovirus Typing Tool* versión 2.0.

Con ayuda del programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA) versión 10.1.7 se realizó un alineamiento múltiple y se determinó el árbol filogenético correspondiente, utilizando un método de inferencia filogenética de *Neighbor joining*, un modelo de sustitución de Kimura de dos parámetros y un valor de *bootstrap* (1000 réplicas) >70% (Andrade y col., 2017). La edición de los árboles se realizó utilizando la herramienta en línea *Interactive Tree Of Life*.

### **8.6. Análisis de la variabilidad de la secuencia del gen que codifica para las proteínas estructurales VP4 y VP7 de rotavirus**

Se realizó una búsqueda sistemática en la base de datos del *GenBank*, de secuencias del gen que codifica para las proteínas estructurales VP4 y VP7 de rotavirus identificadas en México. Se siguió la metodología descrita anteriormente para norovirus, los genotipos fueron determinados utilizando la herramienta en línea *Rotavirus A Genotyping Tool* Versión 0.1.

## **8.7. Caracterización *in silico* de las regiones antigénicas de las proteínas RdRP y VP1 de norovirus y las proteínas estructurales VP4 y VP7 de rotavirus**

### **8.7.1. Recuperación de las secuencias**

Se realizó la búsqueda sistemática de las secuencias aminoacídicas de las proteínas estructurales VP1 y VP2 y de las proteínas no estructurales p45, NTPasa, proteína tipo 3A o p22, proteína asociada al genoma viral o VPg, proteasa y RNA polimerasa dependiente de RNA de norovirus humano de la base de datos *Virus Pathogen Database and Analysis Resource* y que fueron reportadas en México. Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante la herramienta BLASTp para confirmar su identidad. En el mismo sentido, se realizó la búsqueda de secuencias de las proteínas estructurales VP4, VP6 y VP7 y la proteína no estructural NSP4 de rotavirus.

### **8.7.2. Determinación del potencial antigénico**

Las secuencias obtenidas fueron ingresadas a la herramienta en línea *VaxiJen* versión 2.0, los parámetros ingresados fueron los siguientes: se seleccionó como organismo blanco virus y el valor de corte de 0.4 (Buan y col., 2022).

### **8.7.3. Determinación de las características fisicoquímicas**

Mediante la plataforma *ProtParam*, se determinó el peso molecular, punto isoeléctrico teórico (pI), tiempo de vida medio *in vitro*, índice de inestabilidad,

índice alifático, índice de hidropaticidad (GRAVY) de las proteínas de norovirus humano (Mahmoodi y col., 2023).

#### **8.7.4. Predicción de epítomos para células B, MHC-I y MHC-II**

Se realizó la identificación de epítomos para células B haciendo uso del servidor BCepred se seleccionó una longitud de 20 aminoácidos y para el resto de los parámetros se utilizaron los valores predeterminados por la plataforma. La interacción con moléculas del MHC-I se evaluó mediante la herramienta en línea HLApred donde se utilizaron los parámetros predeterminados, con un valor de corte de 3%, y el método de información mediante implementación de matrices cuantitativas. Fueron seleccionados los epítomos que interactuaron con los alelos HLA más comunes en la población mestizo-mexicana, y se evaluó que carecieran de homología con el genoma de *Homo sapiens*.

#### **8.7.5. Determinación de la alergenicidad y toxicidad**

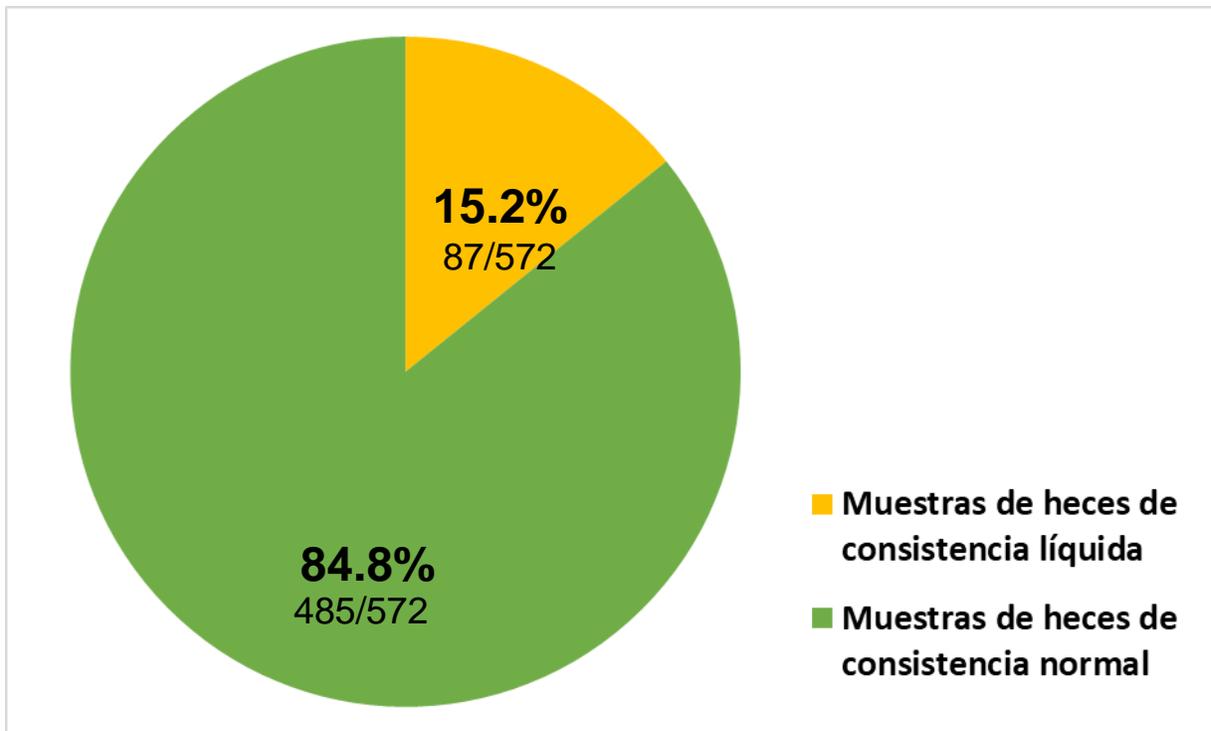
Se utilizó la herramienta en línea *AllergenFP* v.1.0 para establecer la antigenicidad de los epítomos, se clasificaron como alergenicos aquellos que tuvieran el mayor coeficiente de Tanimoto. Para determinar la toxicidad en seres humanos se utilizó la herramienta *Toxin pred* con los parámetros preestablecidos por el servidor. Los péptidos que resultaron no ser alergenicos ni tóxicos para el ser humano fueron sometidos nuevamente para determinar el potencial inmunogénico (Hoque y cols., 2021).

## IX.RESULTADOS

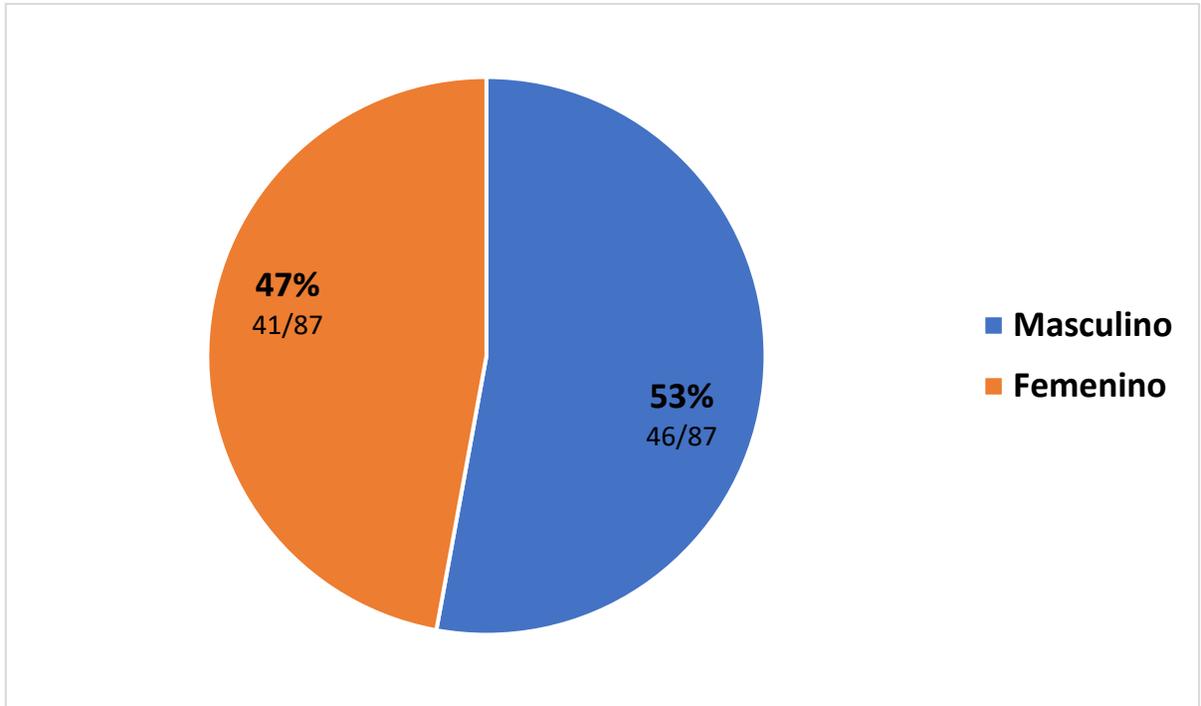
### 9.1. Descripción de la población

Se recolectaron 572 muestras de heces durante el periodo comprendido de octubre de 2020 a abril de 2021. De acuerdo con la consistencia de las heces, se dividieron en dos grupos A: heces de consistencia líquida (diarrea) y B: heces de consistencia sólida (normales) (Figura 4).

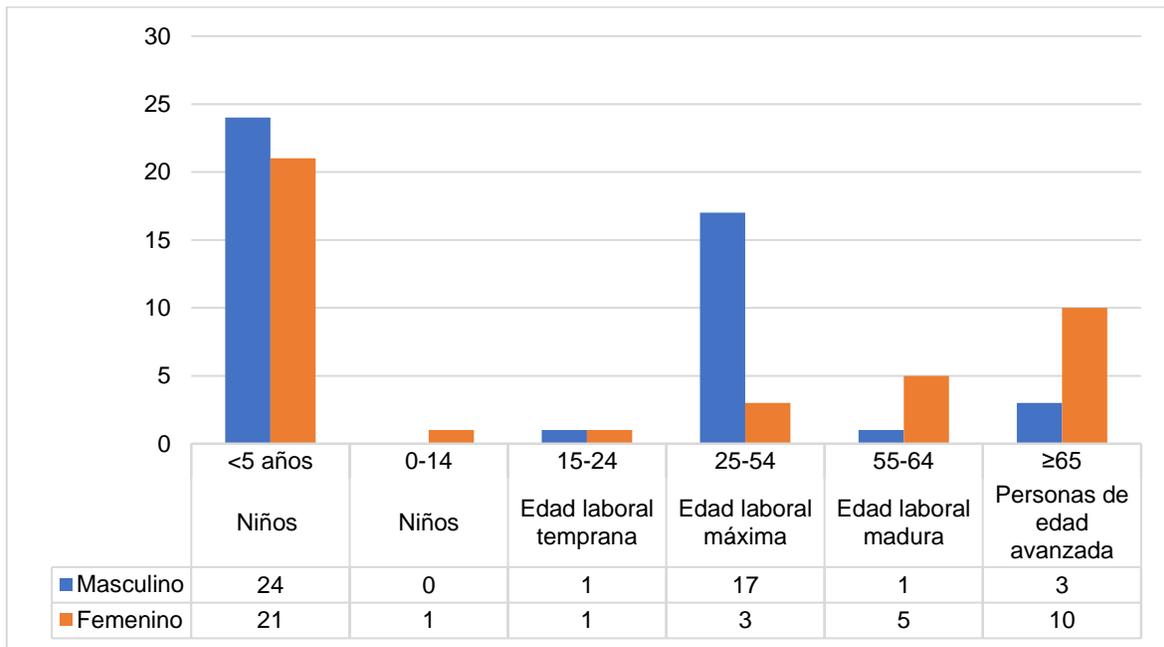
Se realizó el análisis de la población correspondiente al grupo A; se incluyeron 87 pacientes: 41 del género femenino y 46 del género masculino (Figura 5), la edad media fue de 27 años, con un rango desde 1 mes a 88 años. Se procedió a agrupar por edad en 6 categorías (Figura 6), se incluyeron 45 niños menores de 5 años, 24 niños y 21 niñas; 1 niña de 6 a 14 años; 2 individuos de 15 a 24 años, 1 hombre y 1 mujer; 20 individuos de 25 a 54 años, 17 hombres y 3 mujeres; 6 individuos de 55 a 64 años, 1 hombre y 5 mujeres; 13 personas de edad avanzada mayores de 65, 3 hombres y 10 mujeres. El grupo de edad más frecuente fueron niños menores de 5 años con el 51.72% (45/87), de los cuales el 64.44% (29/45) tienen menos de 1 año; el siguiente grupo fueron adultos en edad laboral máxima (25-54 años) representando el 23% (20/87) de las muestras.



**Figura 4. Clasificación de las muestras.** Se incluyeron 572 muestras obtenidas durante el periodo de octubre de 2020 a abril de 2021. De acuerdo con la consistencia se formaron 2 grupos de individuos: grupo A, se incluyeron 87 muestras de consistencia líquida o diarreicas, que representan el 15.2% de muestras y en el grupo B se incluyeron 485 muestras de consistencia sólida o normales.



**Figura 5. Distribución por género de las muestras analizadas.** De las 87 muestras analizadas el 53% (46/87) de las muestras correspondían a individuos del género masculino y el 47% (41/87) correspondieron el género femenino.



**Figura 6. Distribución etaria de los pacientes.** Se incluyeron muestras de pacientes desde 1 mes de edad hasta los 88 años. El 51.72% (45/87) de los pacientes con heces de consistencia líquida pertenecían al grupo de niños menores de 5 años, el cual consistió en 24 niños y 21 niñas.

## **9.2. Identificación de rotavirus**

Todas las muestras fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida y posteriormente teñidos con nitrato de plata (rotaforesis). Se encontraron 4 muestras positivas lo cual corresponde al 4.6% (4/87) (Figura 7), el 50% (2/4) de las muestras correspondía al grupo menor de 5, el resto correspondía a un niño de 6-14 años y un adulto mayor de 65 años.

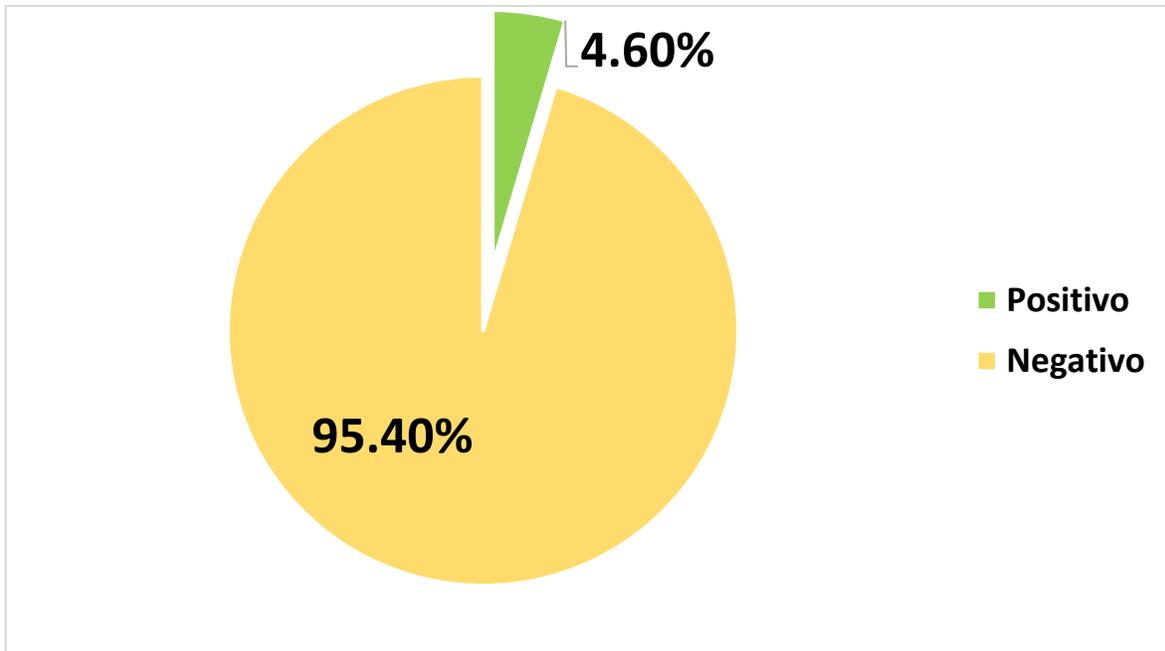
## **9.3. Genotipificación de rotavirus**

Las muestras positivas mediante rotaforesis fueron confirmadas mediante PCR punto final. Posteriormente, se realizó la genotipificación de las muestras positivas y encontramos el genotipo G2 y el genotipo 10 coinfectando en el 75 % (3/4) de las muestras (Figura 8).

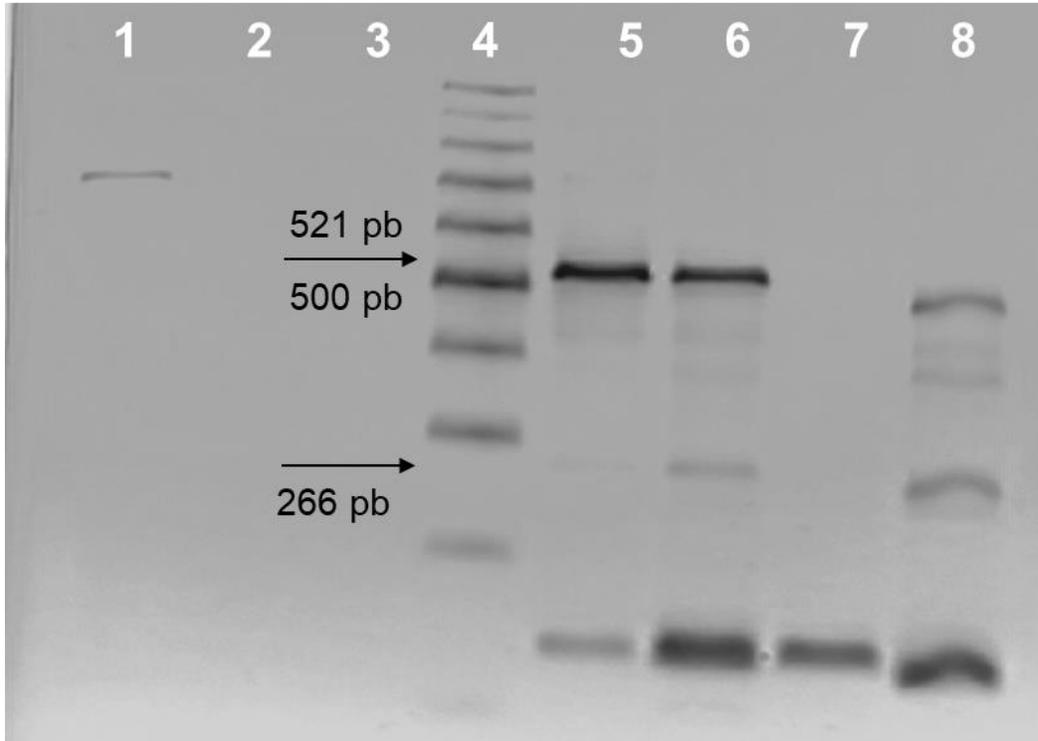
## **9.4. Infección por parásitos**

A las muestras incluidas en el presente estudio se le realizaron estudios coproparasitológicos para determinar la presencia de parásitos que pudieran estar ocasionando una infección y el probable desarrollo de un cuadro diarreico.

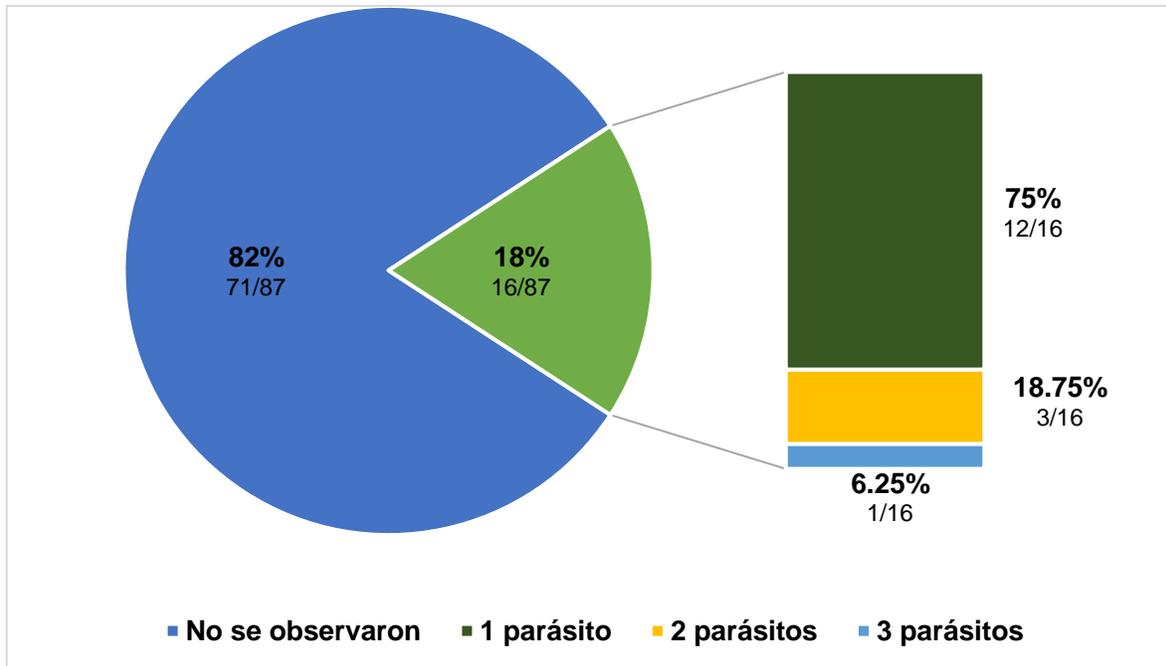
En el 82% (71/87) de las muestras de consistencia líquida analizadas no se observó presencia de parásitos, el resto (18%) fue positivo a la presencia de algún parásito. De las muestras positivas el 75% (12/16) fue positivo para un parásito, el 18.75% (3/16) tenía una infección con dos parásitos y el 6.25% (1/16) con tres parásitos (Figura 9).



**Figura 7. Frecuencia de rotavirus en heces de consistencia líquida.** Se encontró rotavirus en el 4.6% (4/87) de las muestras analizadas.



**Figura 8. Genotipificación de rotavirus.** En el carril 1 se muestra un control positivo de reacción; carril 2, control negativo; carril 3 espacio vacío; carril 4 marcador de 100 pb; carril 5-8 muestra positivas para rotavirus.



**Figura 9. Identificación de parásitos en heces.** Se encontraron parásitos en el 18.4% (16/87) de las muestras; en el 75% (12/16) se encontró solo un parásito, en el 18.75% (3/16) se encontraron 2 parásitos y en el 6.25% (1/16) se encontraron 3 parásitos.

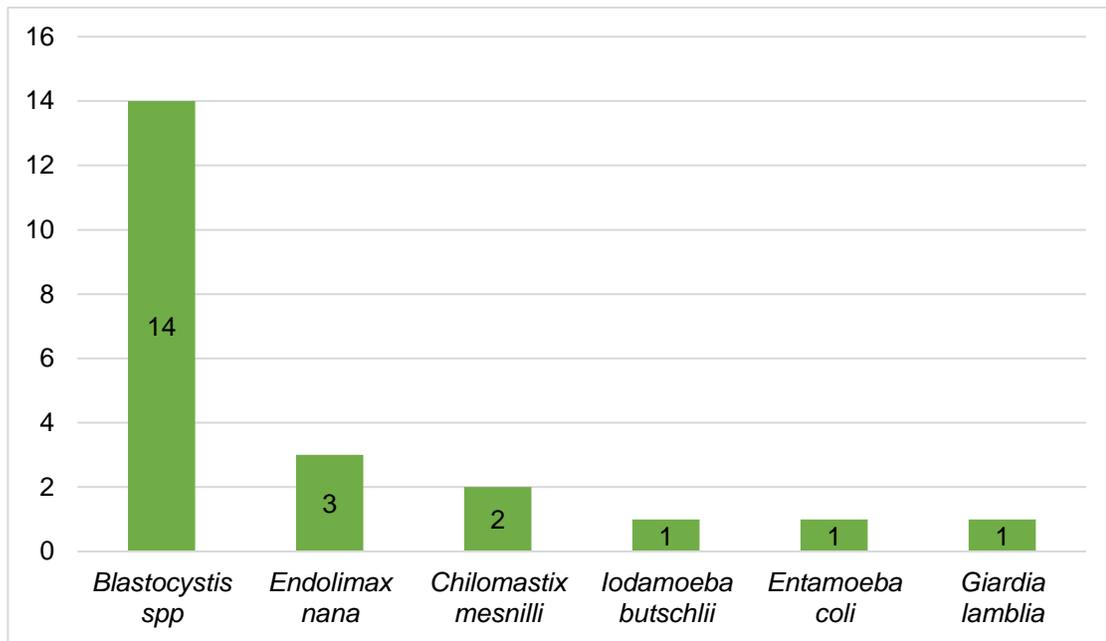
El parásito más frecuente fue *Blastocystis spp.*, se encontró en el 87.5% (14/16) de las muestras positivas, seguido de *Endolimax nana* en el 18.75% (3/16), *Chilomastix mesnilli* en el 12.5% (2/16), *Iodamoeba butschlii*, *Entamoeba coli* y *Giardia lamblia* en el 6.25% (1/16) cada una (Figura 10).

#### **9.5. Análisis de la variabilidad de la secuencia del gen que codifica para la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) y VP1 de norovirus**

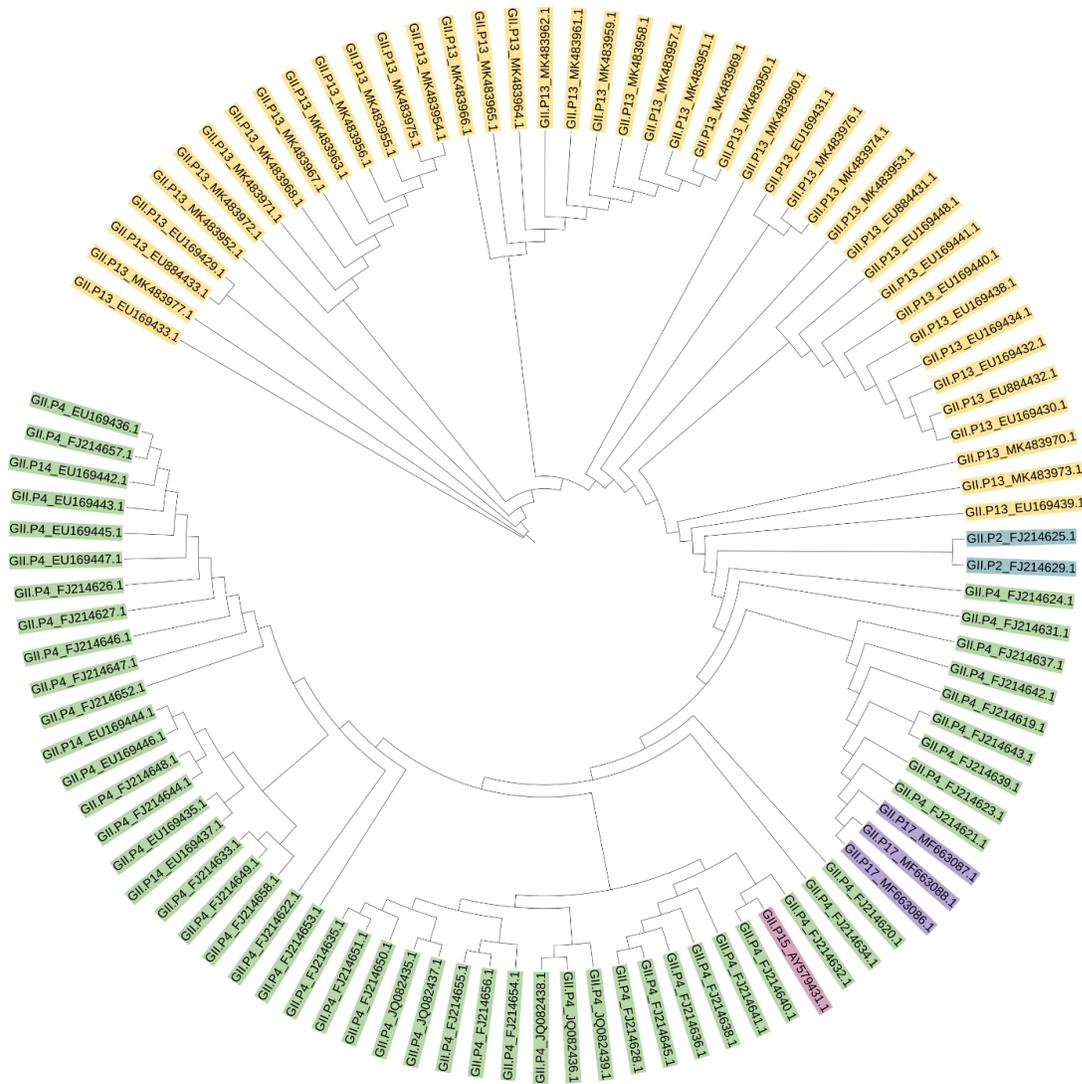
Se realizó una búsqueda en la base de datos GenBank del NCBI de secuencias correspondientes al gen que codifica para la RNA polimerasa dependiente de RNA de norovirus, se seleccionaron aquellas secuencias que contaran con más de 289 pb, para tratar que la longitud de la secuencia a analizar fuera lo más homogénea posible, y que cuyo origen fuera México.

Se seleccionaron 99 secuencias provenientes de Sinaloa, Chihuahua, Tamaulipas, Quintana Roo, Campeche y Chiapas, todas correspondían a norovirus GII. El genotipo más frecuente fue el GII.P4 con 51.52% (51/99), seguido del genotipo GII.P13 con 42.42% (42/99) y GII.P17, GII.P2, GII.P15 con 3.03% (3/99), 2.02% (2/99) y 1.01% (1/99), respectivamente (Figura 11).

Para el análisis del gen que codifica para la proteína VP1 se seleccionaron 93 secuencias provenientes de Chihuahua, Tamaulipas, Quintana Roo, Campeche y Chiapas. El 87.1% (81/93) de las secuencias correspondían a norovirus GII y 12.9% (12/93) a norovirus GI.



**Figura 10. Parásitos encontrados en heces.** El parásito *Blastocystis spp* fue el más frecuente y se encontró en el 87.5% (14/16) de las muestras. Además, se encontró *Endolimax nana* en el 18.75% (3/16) de las muestras, *Chilomastix mesnilli* en el 12.5% (1/16) y en el 6.25% (1/16) *Iodamoeba butschlii*, *Entamoeba coli* y *Giardia lamblia*.



**Figura 11. Árbol filogenético basado en la secuencia del gen que codifica para la RNA polimerasa de norovirus.** Mediante el cladograma podemos observar que existe variabilidad en las secuencias por lo que se encuentran agrupadas en diferentes clados. El genotipo más frecuente fue el GII.P4 con 51.52% (51/99), seguido del genotipo GII.P13 con 42.42% (42/99) y GII.P17, GII.P2, GII.P15 con 3.03% (3/99), 2.02% (2/99) y 1.01% (1/99), respectivamente.

El genotipo más frecuente fue GII.4 con 70.97% (66/93), seguido del genotipo GI.8 con 9.7% (9/93); GII.3 con 4.3% (4/93); GII.2 con 3.22% (3/93); GII.5, GII.7 y GII.8 con 2.15% (2/93) cada uno y GI.1, GI.3, GI.5, GII.6 y GII.9 con 1.08 % (1/93) cada uno (Figura 12).

#### **9.6. Análisis de la variabilidad de la secuencia del gen que codifica para la proteína VP4 y VP7 de rotavirus.**

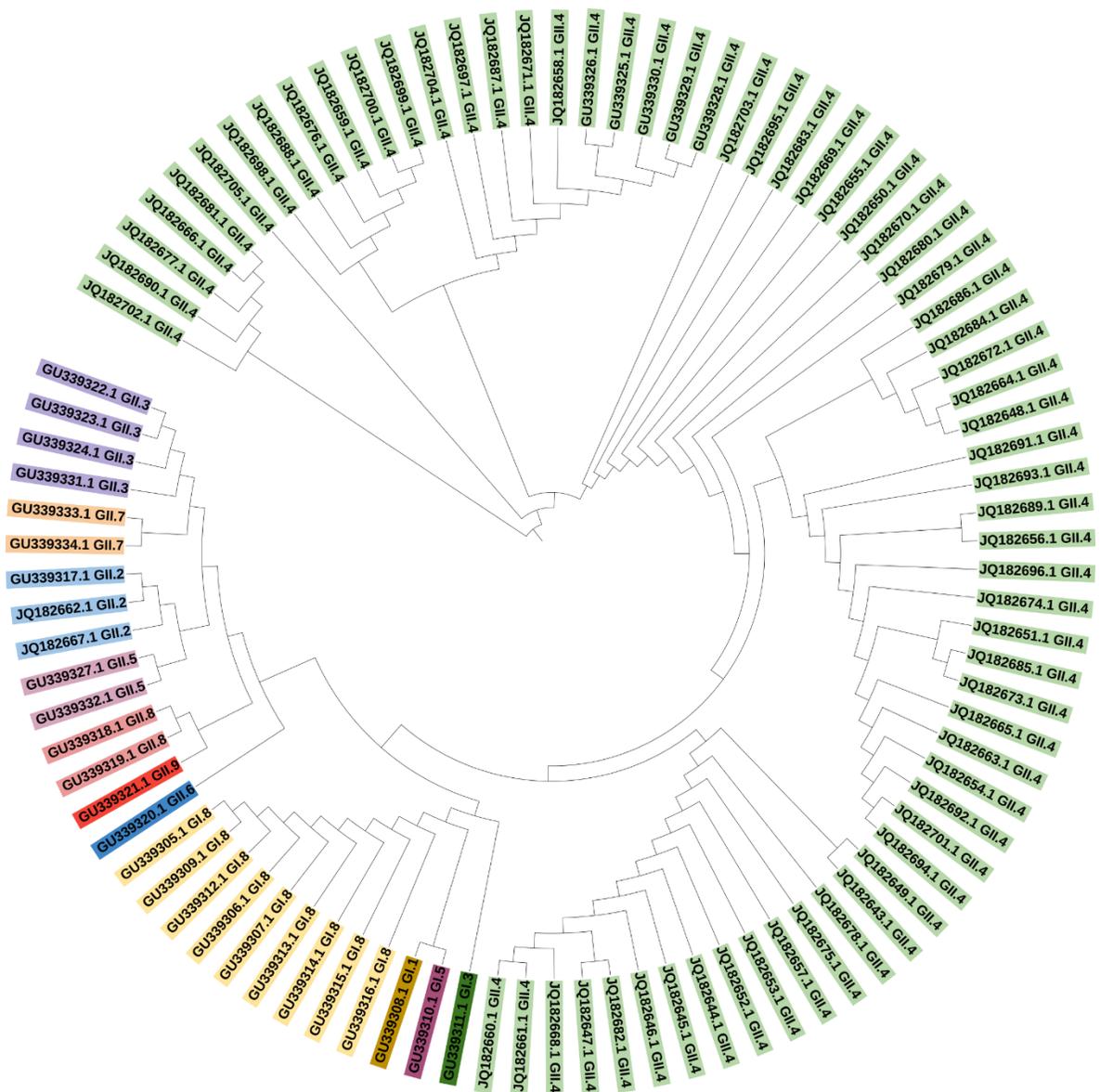
Se obtuvieron 81 secuencias para el análisis del gen que codifica para la proteína VP4 de rotavirus, provenientes de Nuevo León, Chiapas, Querétaro, Hidalgo, Morelos, Sonora y Oaxaca. El 56.8% (46/81) de las secuencias correspondía a rotavirus P [4] Y EL 43.2% (35/81) a rotavirus P [8] (Figura 13).

Para el gen que codifica para la proteína VP7 se utilizaron 48 secuencias. El genotipo más frecuente fue G9 con 79.2% (38/48), seguido de G12 con 16.7% (8/48), G3 y G4 con 2.1% (1/48) cada uno (Figura 14).

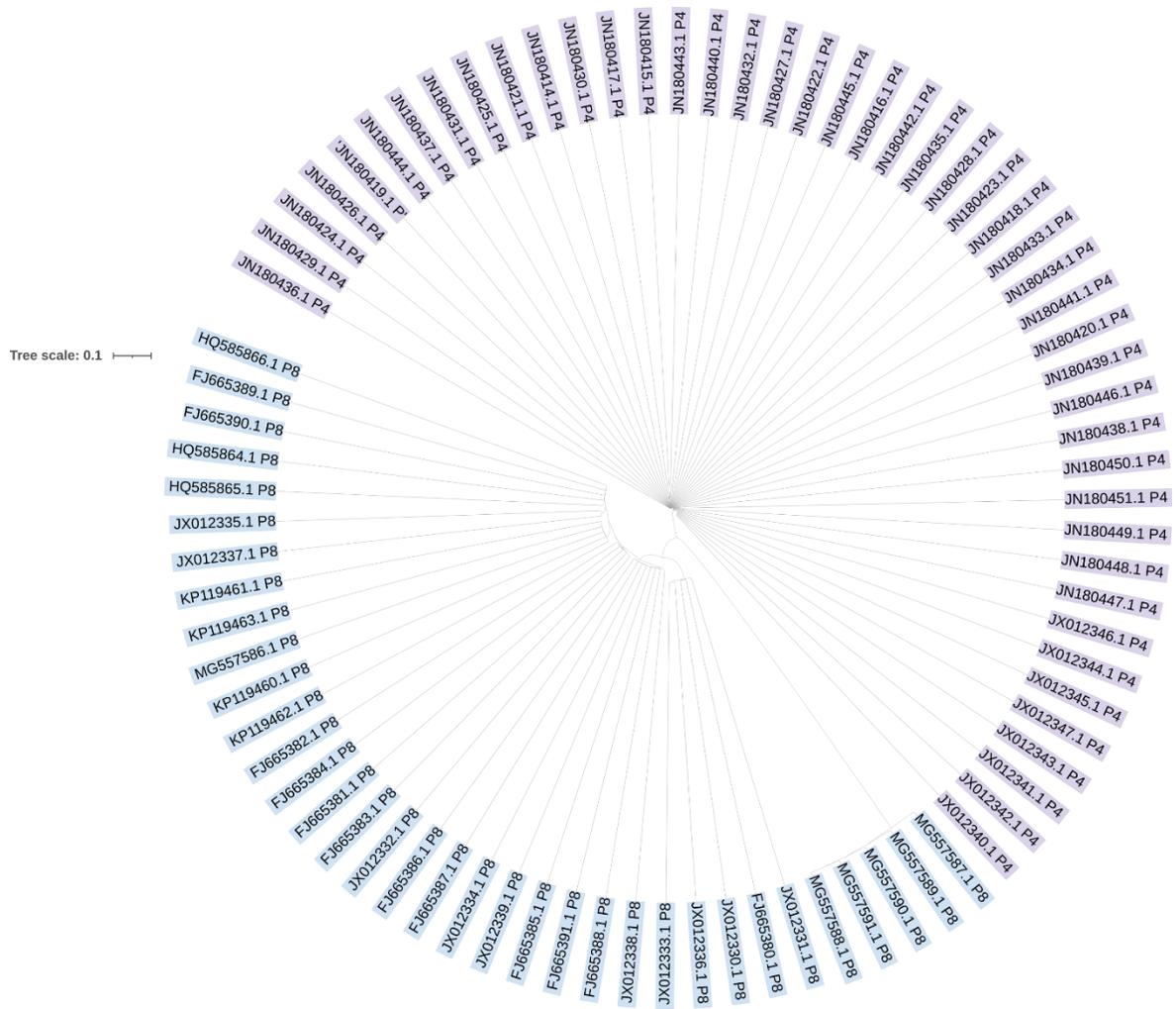
#### **9.7. Caracterización *in silico* las regiones antigénicas de las proteínas de norovirus**

##### **9.7.1. Determinación del potencial inmunogénico**

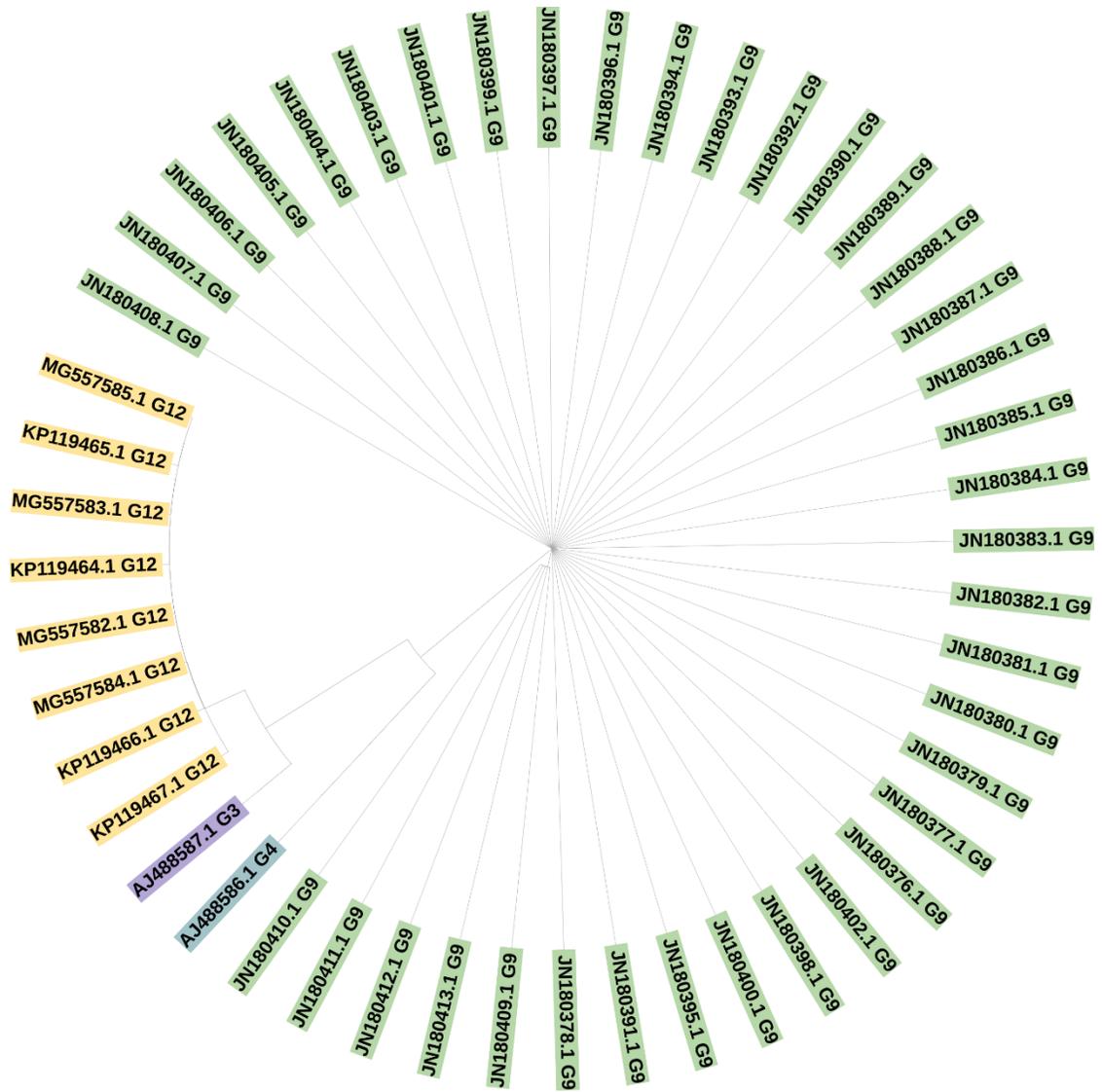
Se obtuvieron las secuencias de las proteínas estructurales: VP1 y VP2 y de las proteínas no estructurales: NTPasa, 2A2-2B-*like* membran protein, p22, VPg, Proteasa y RNA polimerasa dependiente de RNA, de norovirus GI.3 y GII. Se eligieron las proteínas con mayor *score* antigénico, VPg: 0.7275; VP2: 0.5823 y VP1: 0.5053 para la cepa GI.3 y VPg: 0.7042; VP1: 0.4923 y VP2: 0.4760 (Cuadro 1 y 2).



**Figura 12. Árbol filogenético basado en la secuencia del gen que codifica para la proteína VP1 de norovirus. El genotipo más frecuente fue GII.4 con 70.97% (66/93), seguido del genotipo GI.8 con 9.7% (9/93); GII.3 con 4.3% (4/93); GII.2 con 3.22% (3/93); GII.5, GII.7 y GII.8 con 2.15% (2/93) cada uno y GI.1, GI.3, GI.5, GII.6 y GII.9 con 1.08 % (1/93) cada uno.**



**Figura 13. Árbol filogenético basado en la secuencia del gen que codifica para la proteína VP4 de rotavirus. El 56.8% (46/81) de las secuencias correspondía a rotavirus P [4] Y EL 43.2% (35/81) a rotavirus P [8].**



**Figura 14. Árbol filogenético basado en la secuencia del gen que codifica para la proteína VP7 de rotavirus. El genotipo más frecuente fue G9 con 79.2% (38/48), seguido de G12 con 16.7% (8/48), G3 y G4 con 2.1% (1/48) cada uno.**

**Cuadro 1.** Determinación del potencial inmunogénico de las proteínas estructurales y no estructurales de norovirus GI.3

<b>PROTEÍNA</b>	<b>TAMAÑO(aa)</b>	<b>SCORE</b>	<b>ANTIGENICIDAD</b>
<b>VP1</b>	544	0.5053	SI
<b>NTPasa</b>	363	0.5641	SI
<b>2A2-2B-like membrane protein</b>	298	0.4529	SI
<b>p22</b>	200	0.3621	NO
<b>VPg</b>	140	0.7275	SI
<b>Chymotrypsin-like cysteine proteinase</b>	181	0.4844	SI
<b>Polimerasa</b>	510	0.3997	NO
<b>VP2</b>	200	0.5823	SI

**Cuadro 2.** Determinación del potencial inmunogénico de las proteínas estructurales y no estructurales de norovirus GII.

<b>PROTEÍNA</b>	<b>TAMAÑO(aa)</b>	<b>SCORE</b>	<b>ANTIGENICIDAD</b>
<b>VP1</b>	540	0.4923	SI
<b>NTPasa</b>	366	0.4636	SI
<b>2A2-2B-like membrane protein</b>	330	0.4341	SI
<b>p22</b>	177	0.2594	NO ANTIGÉNICO
<b>VPg</b>	133	0.7042	SI
<b>Chymotrypsin-like cysteine proteinase</b>	181	0.4439	SI
<b>Polimerasa</b>	510	0.4166	SI
<b>VP2</b>	268	0.476	SI

### **9.7.2. Características fisicoquímicas de las proteínas VP1, VP2 y VPg**

El análisis de las proteínas de la cepa GI.3 mostró que la proteína VP1 está compuesta por 544 aminoácidos, tiene un peso de 58.65 kDa, pI de 5.28, índice de inestabilidad y alifático de 42.01 y 78.51, respectivamente y GRAVY de -0.079; la proteína VP2 está compuesta por 200 aminoácidos con un peso de 20.74 kDa, pI de 10.08, índice de inestabilidad 45.13, índice alifático 72.3 y GRAVY -0.239. La proteína VPg tiene 140 aminoácidos y un peso molecular de 16.46kDa, pI 9.0, índice de inestabilidad 55.95, índice alifático 46.64, GRAVY -1.577. En relación con las proteínas de la cepa GII.4: la proteína VP1 se encuentra constituida por 540 aminoácidos, tiene un peso molecular de 59.20 kDa, pI 5.47, índice de inestabilidad 46.43, índice alifático 76.33, GRAVY -0.212; la proteína VP2 tiene 268 aminoácidos y un peso de 28.69 kDa, pI 10.34, índice de inestabilidad 49.42, índice alifático 60.56 y GRAVY -0.515, la proteína VPg con 133 aminoácidos y tiene un peso molecular de 15.92 kDa, pI 8.54, pI 8.54, índice de inestabilidad 47.63, índice alifático 49.92, GRAVY -1.586 (Cuadro 3).

### **9.7.3. Predicción de epítomos para células B**

Se utilizaron las proteínas estructurales VP1 y VP2; así como, la proteína no estructural VPg de norovirus GI.3 y GII.4 para la búsqueda de epítomos restringidos a células B y se seleccionaron los péptidos con mayor score. Mediante el análisis de las secuencias de la cepa GI.3 se identificaron 15 péptidos para la proteína VP1 con un valor de entre 0.832-0.999; 5 péptidos para la proteína VP2 con valores de 0.901 a 1.0 y 5 para la VPg con valores entre 0.993-1.0.

**Cuadro 3.** Propiedades fisicoquímicas de las proteínas VP1, VP2 y VPg de las cepas de norovirus GI.3 y GII.4

Característica/Proteína	GI.3			GII.4		
	VP1	VP2	VPg	VP1	VP2	VPg
Número de aminoácidos	544	200	140	540	268	133
Peso molecular (kDa)	58.64	20.74	16.43	59.20	28.69	15.92
pI teórico	5.28	10.08	9	5.47	10.34	8.54
Índice de inestabilidad	42.01	45.13	55.95	46.43	49.42	47.63
Índice alifático	78.51	72.3	46.64	76.33	60.56	49.92
GRAVY	-0.079	-0.239	-1.577	-0.212	-0.515	-1.586

Respecto a la cepa GII.4 se identificaron 16 péptidos en la proteína VP1 con el score entre 0.754-0.999; 6 en la proteína VP2 con valores entre 0.793-1.0 y 4 péptidos en la proteína VPg con score entre 0.985-1.0.

#### **9.7.4. Predicción de epítomos para MHC-I y MHC-II**

Para predecir la interacción entre los péptidos seleccionados y el MHC-I, se evaluaron los alelos HLA-A\*0201, presente en el 56.1% de la población mestizo-mexicana; HLA-A\*24 y HLA-A\*2402, reportados en el 24.4% de la población. Se seleccionaron 4 péptidos por alelo, 12 en total por cada proteína de ambas cepas que cumplieran con los criterios establecidos previamente; es decir, que se unen al MHC-I y que carecieran de homología con el genoma de *Homo sapiens*. Respecto al análisis de interacción de los péptidos con el MHC-II, se evaluaron 4 alelos: HLA-DRB1\*0802, HLA-DRB\*0301, HLA-DRB1\*0701, HLA-DRB1\*0813, se eligieron 4 péptidos por alelo para cada proteína y se obtuvieron en total 16 péptidos en ambas cepas virales.

#### **9.7.5. Evaluación de la alergenicidad y toxicidad**

Una vez seleccionados los péptidos correspondientes para cada proteína, fueron analizados *in silico* para descartar que fueran alérgenos o presentaran algún tipo de toxicidad en seres humanos. Los péptidos carentes de alergenicidad y toxicidad fueron evaluados para determinar el potencial inmunogénico. Respecto al análisis de inmunogenicidad de los péptidos en la cepa GI.3 para células B, se identificaron 7 péptidos que cumplieron con los criterios previamente establecidos 5 epítomos de la proteína VP1, 1 de la proteína VP2 y 1 de la proteína VPg.

Por otra parte, en el análisis de la inmunogenicidad de los péptidos para el MHC-I del HLA-A\*0201 se descartaron todos los péptidos de la proteína VP1 y VP2 y se seleccionó 1 para la proteína VPg; mientras que, en el análisis del alelo HLA-A\*24 se obtuvieron 2 epítomos de la proteína VP1, 1 de la proteína VP2 y 2 de la proteína VPg, y finalmente para el HLA-A\*2402 se establecieron 3 epítomos de la proteína VP1, uno de ellos reportados para el alelo HLA-A\*24, 1 de la proteína VP2 y ningún epítomo de la proteína VPg. Los resultados de la predicción de la inmunogenicidad de los péptidos para el MHC-II del alelo HLA-DRB1\*0802 se obtuvieron 2 epítomos de la proteína VP1 y VP2 y 1 de VPg; para el alelo HLA-DRB\*0301 se seleccionaron 2 epítomos de VP1 y 2 de VP2, uno de ellos reportado para el alelo HLA-DRB1\*0802; para el HLA-DRB1\*0701 resultaron 2 epítomos de la proteína VP1, ambos reportados previamente para otros alelos y se seleccionó 1 para VPg y finalmente para el HLA-DRB1\*0813 se obtuvieron 2 epítomos de VP1, 1 de VP2 y 1 de VPg, cabe mencionar que todos los epítomos encontrados para este alelo fueron reportados anteriormente en alguno de los alelos evaluados (Cuadro 4 ).

Respecto a el análisis de las proteínas de la cepa GII.4 permitió identificar para células B, 5 epítomos de la proteína VP1, 1 de la proteína VP2 y 1 de la proteína VPg. Por otra parte, en el análisis de la inmunogenicidad de los péptidos para el MHC-I del HLA-A\*0201, solo se encontraron 2 epítomos en la proteína VPg, los péptidos reportados anteriormente para la proteína VP1 y VP2 fueron descartados, para el HLA-A\*24 se seleccionó un epítomo de cada proteína y finalmente para el HLA-A\*2402 se seleccionaron 3 epítomos de la proteína VP2.

**Cuadro 4.** Epítomos seleccionados de las proteínas de norovirus Gl.3 para células B, MHC- I Y MHC-II

<b>Proteína</b>	<b>Posición</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Score</b>
<b>Células B</b>			
<b>VP1</b>	409	TLTEAAQLAPPIYPPGFGEA	0.4595
	313	PYHAFESPAPIGFDPDIGDSD	0.7777
	219	FLVPPNVEQKTKPFSVPDLP	0.8455
	251	IKFMMVSQDHGQMVQFQNGR	0.6465
	118	FTAGKIIISCIPPGFVSQNI	0.8869
<b>VP2</b>	87	RVVVGAPATRVVDWNGTRVS	0.7419
	10	AATAAGSAVGAGIQAGTEAA	0.6769
	148	SSVSSRVADWVSSQNSSRSS	0.8317
<b>VPg</b>	108	EIRKRKPIDWTPPKNDWSED	0.9237
<b>MHC-I</b>			
<b>VP1</b>			
HLA-A*24	307	TEIDGTPYH	0.6002
	384	LEWLSPPSE	0.4512
HLA-A*2402	155	LEPIEVPLE	0.8417
	384	LEWLSPPSE	0.4512
	307	TEIDGTPYH	0.6002
<b>VP2</b>			
HLA-A*24	90	VGAPATRVV	0.8026
HLA-A*2402	24	AGTEAALQH	0.4723
<b>VPg</b>			
HLA-A*0201	110	RKRKPIDWT	2.7704
HLA-A*24	132	NYDEHISFE	1.4496
	100	QLGLVSGTE	11.02
<b>MHC-II</b>			
<b>VP1</b>			
HLA-DRB1*0802	525	YQLKPVGTT	1.6336
	201	FVIAGRVL	0.7173
HLA-DRB*0301	152	VRVLEPIEV	0.635
	509	LPINGVFTF	0.4218
HLA- DRB1*0701	152	VRVLEPIEV	0.635
	201	FVIAGRVL	0.7173
HLA-DRB1*0813	201	FVIAGRVL	0.7171
	525	YQLKPVGTT	1.6336

Continuación Cuadro 4

<b>VP2</b>			
HLA-DRB1*0802	127	YKGKQQQKA	1.2278
	35	FQDRTLQS	0.4565
HLA-DRB1*0301	35	FQDRTLQS	0.4565
	88	VVVGAPATR	1.0757
HLA-DRB1*0813	127	YKGKQQQKA	1.2277
<b>VPg</b>			
HLA-DRB1*0802	82	VFYKSKSGL	0.5034
HLA-DRB1*0701	101	LGLVSGTEI	1.3057
HLA-DRB1*0813	82	VFYKSKSGL	0.5034

Los resultados de la inmunogenicidad de los péptidos para el MHC-II del alelo HLA-DRB1\*0802 se obtuvieron 2 epítomos de la proteína VPg, para el HLA-DRB1\*0301 se seleccionaron 2 epítomos de la proteína VP1, para el HLA-DRB1\*0701 resultó 1 epítomo de la proteína VP1, compartido con alelo anterior, y un epítomo de la proteína VPg, finalmente para el HLA-DRB1\*0813 se obtuvieron 2 epítomos de la proteína VP1, 2 de la proteína VPg, previamente reportados para el alelo HLA-DRB1\*0802 (Cuadro 5).

## **9.8. Caracterización *in silico* las regiones antigénicas de las proteínas de rotavirus**

### **9.8.1. Determinación del potencial inmunogénico**

Se obtuvieron las secuencias de las proteínas estructurales: VP4, VP6 y VP7 y de las proteínas no estructurales: NSP4 de rotavirus. Solo las proteínas estructurales poseen antigenicidad, los valores obtenidos fueron los siguiente VP4: 0.49; VP6: 0.49 y VP7: 0.5 (Cuadro 6).

### **9.8.2. Características fisicoquímicas de las proteínas VP4, VP6 y VP7**

El análisis de las proteínas mostró que la proteína VP4 está compuesta por 251 aminoácidos y tiene un peso de 28.6 kDa, pI de 5.26, índice de inestabilidad y alifático de 35.25 y 72.55, respectivamente y GRAVY de -0.639; la proteína VP6 está compuesta por 384 aminoácidos con un peso de 43.4 kDa, pI de 5.63, índice de inestabilidad 39.9, índice alifático 85.83 y GRAVY -0.181. La proteína VP6 tiene 326 aminoácidos y un peso molecular de 37.3 kDa, pI 4.56, índice de inestabilidad 55.95, índice alifático 46.64, GRAVY 0.138 (Cuadro 7).

**Cuadro 5.** Epítopos seleccionados de las proteínas de norovirus GII.4 para células B, MHC-I Y MHC-II

<b>Proteína</b>	<b>Posición</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Score</b>
<b>Células B</b>			
<b>VP1</b>	17	NLVPEVNNEVMALEPVVGAA	0.7253
	376	EANQNTKFTPVGVIQDGSTT	0.9526
	432	LFFRSTMPGCSGYPNMDLDC	0.696
	349	ATVYTGSADFAPKLGRVQFE	0.9803
	156	IPLPDVRNNFYHYNQSNDS	0.696
<b>VP2</b>	171	NQTVSTRLGSTAGSGTSVSS	0.6233
<b>VPg</b>	99	GSEIRKRNPDDFKPKGKGLWA	1.0017
<b>MHC-I</b>			
<b>VP1</b>			
HLA-A*24	524	FYTLAPMGN	0.4636
HLA-A*2402	484	RVLFECKLH	0.7703
	24	NEVMALEPV	0.9207
	421	AVAPTFPGE	0.5267
<b>VP2</b>			
HLA-A*24	64	LQAQIEATK	0.6481
<b>VPg</b>			
HLA-A*0201	12	KKHTAFSSK	1.5038
	84	RKQRKEERA	0.8246
HLA-A*24	56	ELAIKATE	0.6034
<b>MHC-II</b>			
<b>VP1</b>			
HLA-DRB1*0301	144	IIVDVRQLE	1.214
	148	VRQLEPVLII	1.1828
HLA-DRB1*0701	148	VRQLEPVLII	1.1828
HLA-DRB1*0813	166	YHYNQSNDS	0.4915
	308	WNNYDPTEE	1.0301
<b>VP2</b>			
HLA-DRB1*0301	212	MARGAHNISF	1.2212
<b>VPg</b>			
HLA-DRB1*0802	110	FKPKGKGLWA	0.7182
	80	FRPTRKQRK	1.5321
HLA-DRB1*0701	94	LGLVTGSEI	1.0516
HLA-DRB1*0813	110	FKPKGKGLWA	0.7182
	80	FRPTRKQRK	1.5321

**Cuadro 6.** Determinación del potencial inmunogénico de las proteínas estructurales y no estructurales de norovirus GII.

<b>PROTEÍNA</b>	<b>TAMAÑO(aa)</b>	<b>SCORE</b>	<b>ANTIGENICIDAD</b>
<b>VP4</b>	251	0.49	SI
<b>VP6</b>	384	0.49	SI
<b>VP7</b>	326	0.5	SI
<b>NSP4</b>	175	0.32	NO

**Cuadro 7.** Propiedades fisicoquímicas de las proteínas VP4, VP7 y VP6 de rotavirus

<b>Característica/Proteína</b>			
	VP4	VP6	VP7
Número de aminoácidos	251	384	326
Peso molecular (kDa)	28.6	43.4	37.3
pI teórico	5.26	5.63	4.56
Índice de inestabilidad	35.25	39.9	33.78
Índice alifático	72.55	85.83	103.07
GRAVY	-0.639	-0.181	0.138

### **9.8.3. Predicción de epítomos para células B**

Se utilizaron las proteínas estructurales VP4 y VP7; así como, la proteína no estructural VP6 de rotavirus para la búsqueda de epítomos restringidos a células B y se seleccionaron los péptidos con mayor score. Mediante el análisis de las secuencias se identificaron 5 péptidos para la proteína VP4 con un valor de entre 0.945-0.999; 8 péptidos para la proteína VP7 con valores de 0.860 a 0.997 y 7 para la VP6 con valores entre 0.795-0.998.

### **9.8.4. Predicción de epítomos para MHC-I y MHC-II**

Para predecir la interacción entre los péptidos seleccionados y el MHC-I, se evaluaron los alelos HLA-A\*0201, HLA-A\*24 y HLA-A\*2402, Se seleccionaron 4 péptidos por alelo, 12 en total por cada proteína de ambas cepas que cumplieran con los criterios establecidos previamente; es decir, que se unen al MHC-I y que carecieran de homología con el genoma de *Homo sapiens*. Respecto al análisis de interacción de los péptidos con el MHC-II, se evaluaron 4 alelos: HLA-DRB1\*0802, HLA-DRB\*0301, HLA-DRB1\*0701, HLA-DRB1\*0813, se eligieron 4 péptidos por alelo para cada proteína y se obtuvieron en total 16 péptidos en ambas cepas virales.

### **9.8.5. Evaluación de la alergenicidad y toxicidad**

Una vez seleccionados los péptidos correspondientes para cada proteína, fueron analizados *in silico* para descartar que fueran alérgenos o presentaran algún tipo de toxicidad en seres humanos. Los péptidos carentes de alergenicidad y toxicidad fueron evaluados para determinar el potencial inmunogénico. Respecto

al análisis de inmunogenicidad de los péptidos para células B, se identificó 1 péptido en VP4 que cumplieron con los criterios previamente establecidos, 2 de la proteína VP6 y 3 de la proteína VP7.

Por otra parte, en el análisis de la inmunogenicidad de los péptidos para el MHC-I del HLA-A\*0201 se descartaron los posibles candidatos; si bien, hubo epítomos que no presentaban alergenicidad ni toxicidad al evaluar la antigenicidad carecían de ella; mientras que, en el análisis del alelo HLA-A\*24 se descartaron todos los péptidos para la proteína VP7, se encontró uno para la proteína VP4 y uno para la proteína VP6 y finalmente para el HLA-A\*2402 se identificó un epítomo de la proteína VP4 y todos los péptidos de la proteína VP6 y VP7 fueron descartados. En relación con la predicción de la inmunogenicidad de los péptidos para el MHC-II, del alelo HLA-DRB1\*0802 ninguno de los péptidos evaluados de las 3 proteínas poseía potencial inmunogénico; mismo caso para el HLA-DRB1\*0701 y HLA-DRB1\*0813, solo se encontró un péptido en la proteína VP7 para el alelo HLA-DRB1\*0301 (Cuadro 8).

**Cuadro 8.** Epítomos seleccionados de las proteínas de rotavirus para células B, MHC-I Y MHC-II

<b>Proteína</b>	<b>Posición</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Score</b>
<b>Células B</b>			
<b>VP4</b>	24	QIGSEKTQNVTVNPGPFAQT	1.1078
<b>VP7</b>	195	VCPLNTQTLGIGCTTTDVTT	1.2396
	107	LTKGWVPVNSVYFKSYADISS	0.4942
	173	YYYQQTDEANKWISMGESCT	0.9985
<b>VP6</b>	115	NFDNSSEYIENWNLQNRQR	0.818
<b>MHC-I</b>			
<b>VP4</b>			
HLA-A*24	229	TRNVVPLSL	1.3186
HLA-A*2402	47	PVNWGHGEI	1.9937
<b>VP6</b>			
HLA-A*24	233	TWYFNPVIL	1.1298
<b>MCH-II</b>			
<b>VP7</b>			
HLA-DRB1*0301	221	LVITDVVDG	0.729

## X.DISCUSIÓN

### 10.1. Descripción de la población

Datos reportados por la Secretaría de Salud indican que hasta la semana 21 del año en curso, en México se han producido 1,229,585 casos en enfermedades infecciosas intestinales, un elevado porcentaje no se encuentra definido su origen.

En Sinaloa, durante 2019, las infecciones intestinales por organismos no reportados en el boletín epidemiológico y las mal definidas, representaron la segunda causa de enfermedad en Sinaloa, se reportaron 146,860 casos, siendo más frecuente en niños menores de 5 años, con un total de 32,831 casos, durante esta etapa de la vida los niños son más propensos al desarrollo de diversas enfermedad, en el caso de la gastroenteritis aguda, podría estar asociado con la falta de prácticas de higiene en los niños, ya que el mecanismo de contacto de los agentes infecciosos es por la vía fecal oral. El segundo grupo etario con mayor incidencia fue de 25-44 años con 26,786 casos, algunas de las causas pueden ser debido a que durante esta etapa de la vida, en edad laboral, se consume de manera rutinaria alimentos preparados fuera de casa, que pueden estar elaborados con higiene insuficiente, además viajar se convierte en una práctica común principalmente a destinos turísticos como playas, en dónde se consumen alimentos crudos (mariscos), que se han reportado como un foco importante de transmisión de virus entéricos como rotavirus y norovirus. En Sinaloa, se encontró una frecuencia de norovirus de 57.3% en ostras recolectadas de las playas, por lo que es muy probables que este virus esté causando infección en nuestra población.

Se estima que los casos de gastroenteritis aguda son causados por virus en 50-70%, por bacterias del 15-20% y por parásitos del 10-15% (Luo y col., 2019), en el caso de las muestras diarreicas el 29% resultó positiva para algún parásito; sin embargo, en el grupo de heces no diarreicas el porcentaje fue similar, 27%, esto puede ser debido a que el parásito encontrado con mayor frecuencia fue *Blastocystis spp*, que es la causa más común de parásitos identificados en heces, diversos estudios reportan un rango de 0.5% hasta 80%, incluyendo una elevada proporción en pacientes asintomáticos, por lo tanto, si bien algunos casos de diarrea podrían estar asociados a la infección por este parásito, es necesario confirmar la presencia de virus y bacterias presentes en las heces, además de verificar si existe asociación estadísticamente significativa que asocia la presencia de *Blastocystis spp* con el desarrollo de gastroenteritis aguda.

## **10.2. Identificación de rotavirus**

Se encontraron 4 muestras positivas lo cual corresponde al 4.6% (4/87), el 50% (2/4) de las muestras correspondía al grupo menor de 5. Los datos obtenidos concuerdan con lo reportado por Crawford y col., en su trabajo publicado en 2017 mencionan que la gastroenteritis asociada a rotavirus es causante de diarrea severa o deshidratante principalmente en niños menores de 5 años.

El porcentaje es bajo comparado con el reportado por Lestari y col., en 2020, quienes evaluaron la infección por rotavirus en niños del sudeste asiático en un periodo de 2008-2018 encontrando que rotavirus fue responsable del 40.78% de todas las enfermedades diarreicas en niños, la diferencia entre las frecuencias puede ser debido a la implementación en los programas de vacunación ya que la

mayoría de los países del sudeste asiático aún no cuentan con programas de vacunación contra rotavirus, a excepción de Filipinas y Tailandia, donde se han introducido las vacunas de forma limitadas, en México, posterior a la introducción de la vacuna monovalente en la Cartilla Nacional de Vacunación en 2006, durante los siguientes 3 años se observó una disminución del 35% en la mortalidad y un 40% de hospitalizaciones por esta causa, de manera independiente el estado socioeconómico de los pacientes (Lestari y col., 2020).

Además, de acuerdo con datos reportados por la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud los casos continúan disminuyendo, en 2014 se reportaron 2 495 casos para el año 2019 hubo una disminución del 32% de los casos reportándose 802 casos (Xochihua y col., 2019).

En el presente estudio se encontró evidencia de rotavirus en heces líquidas de adultos; si bien, la frecuencia reportada en este grupo de edad es baja, existen reporte de transmisión en padres y cuidadores de niños infectados tal es el caso de Grimwood y cols, quienes en 1983 reportaron una frecuencia de 33% de adultos infectados al estar en contacto con niños enfermos en su núcleo familiar (Grimwood y col., 1983).

En el mismo sentido Anderson y col., reportaron en 2011 rotavirus en el 2.9% de las muestras analizadas y Shen y cols., en 2013 reportaron una frecuencia de 9.3% en Shanghai, China, como podemos observar la prevalencia de rotavirus en adultos es variada dependiendo la región, además, reportaron en 2020 que la frecuencia es más alta en la temporada de invierno donde reportan positividad del 17.7% en las muestras evaluadas durante 2017-2018,

considerablemente mayor a la encontrada en verano que oscila entre 2.8% y 4.5% (Chansaenroj y col., 2020).

El papel que juega rotavirus en la infección por adultos no se encuentra del todo esclarecida, se sugiere que la inmunidad desarrollada al tener contacto con rotavirus durante la niñez es capaz de brindar protección durante la adultez, por lo que un adulto puede resultar positivo para la presencia de rotavirus y permanecer asintomático (Anderson y Weber, 2004).

### **10.3. Identificación de parásitos**

De acuerdo con lo reportado por Graves en 2013, los parásitos son responsables de entre el 10-15% de los casos de diarrea, principalmente Giardia, amebas y *Cryptosporidium*; sin embargo, del 50-70% de los casos son de origen viral; además de rotavirus, norovirus, adenovirus entéricos, astrovirus, coronavirus y algunos picornavirus se asociación con un gran número de casos de cuadros diarreicos agudos, por lo que podríamos pensar que algunos de los casos de heces líquidas podrían estar asociados con la presencia de alguno de estos agentes virales. En el mundo, se ha reportado que el principal agente viral responsable de casos esporádicos de gastroenteritis aguda es norovirus, debido a su fácil transmisión y resistencia a desinfectantes de uso común es asociado con brotes de diarrea en lugares cerrado y semicerrados como hospitales y estancias infantiles (Rouhani y col., 2016).

En Estados Unidos anualmente se reportan aproximadamente 23 millones de infecciones por norovirus, causando 50 mil hospitalizaciones (Karst., 2021). En México se reporta una frecuencia de alrededor del 28.6 al 32% (Gómez-Santiago y

cols., 2021; Casillas-Vega; 2020); además mediante un estudio preliminar realizado por Benitez-Bueno reportó en una tesis de maestría (datos sin publicar) una frecuencia del 26.32% en niños en edad preescolar, por lo que podríamos esperar que algunas de las muestras analizadas deban su consistencia líquida a una infección por norovirus.

#### **10.4. Caracterización *in silico* las regiones antigénicas de las proteínas de norovirus y rotavirus**

Actualmente se encuentran en ensayo clínico 4 vacunas contra norovirus 3 basadas en la producción de VLP's y una basada en vectores virales (ClinicalTrials.gov). La vacuna con más avance en el campo se encuentra en fase 3 y consiste una vacuna bivalente recombinante con las cepas GI.1 y GII.4, la evaluación de esta vacuna mostró una disminución del 47% en la incidencia de la gastroenteritis y disminuyó la severidad de los síntomas como vómito y diarrea (Bernstein et al., 2015). Sin embargo; debido a la diferencia entre las cepas circulantes en diversas regiones es posible que en población mexicana la vacuna evaluada tenga menor eficacia, para ello es necesario el monitoreo constante de las cepas asociadas a brotes de GA en nuestro país y realizar los estudios pertinentes para el desarrollo de una vacuna contra las mismas.

Las herramientas bioinformáticas nos permiten predecir péptidos inmunogénicos de diversos patógeno; así como, evaluar su interacción con componentes del sistema inmune. En este estudio se analizó la inmunogenicidad de las proteínas estructurales y no estructurales de dos cepas de norovirus reportadas como responsables de GA en México, GI.3 y GII.4, las proteínas que

presentaron mayor inmunogenicidad fueron VP2 con un score de 0.5823, VP1 0.5053 y VPg 0.7275 para GI.3, VP1 0.4923, VP2 0.4760 y VPg ,0.7042 para GII.4. El análisis *in silico* es una importante herramienta para la búsqueda de sitios antigénicos (variables o conservados) que pudieran ser utilizados como blanco para el diseño de una vacuna. Gao et al., evaluaron partículas P de 7 genotipos de norovirus GI y 16 de GII: encontraron reactividad cruzada entre los sueros de cepas homologas; sin embargo, el 73.9% no presentó reactividad con genotipos heterólogos. Realizaron el alineamiento de 23 secuencias del dominio P de la VP1 de norovirus, y se encontraron 58 sitios conservados y alta variabilidad en los sitios antigénicos A/B/C/D, producto probable de la acumulación de mutaciones y probables responsables de la evasión del sistema inmune. La predicción de los sitios antigénicos reveló diferencias antigénicas entre los genotipos de norovirus desde 52 hasta 162 aminoácidos; encontraron tres sitios antigénicos conservados en la región P1-P2 de la proteína VP1 (aminoácidos en la posición 423-431, 462-474 y 517-531), que podrían ser responsables de la reacción inmunológica cruzada, por lo que se sustenta que el desarrollo de vacunas multivalentes sería más eficaz para prevenir infecciones por genotipos heterólogos de norovirus. Aquí se identificaron 26 epítomos de las proteínas de norovirus GI.3, 12 en la proteína VP1, 8 en la proteína VP2 y 6 en la proteína VPg; además, se identificaron 23 epítomos en las proteínas de norovirus GII.4, 13 de la proteína estructural VP1, 3 en la proteína estructural VP2 y 7 en la proteína VPg de norovirus GII.4 . Establecer el panorama epidemiológico de norovirus en México contribuye de manera directa en la búsqueda de vacunas eficientes basadas en secuencias

reportadas en la región para la prevención control de la GA por norovirus en regiones endémicas.

Además de la disminución de tiempo y costo en la elaboración de vacunas utilizando diversas herramientas bioinformáticas, otra de las ventajas que tienen las vacunas basadas en péptidos, es la combinación de múltiples epítomos con finalidad de aumentar la respuesta inmune generada en el individuo y obtener inmunidad cruzada, en el caso de virus, entre los diferentes genotipos circulantes en la población (Nandy y Basak, 2019). Los péptidos reportados pueden ser utilizado para el desarrollo de una vacuna multiepitope utilizando diversas plataformas como el desarrollo de partículas tipo virus (VLP) que permiten la producción de quimeras que evocan la respuesta inmune contra antígenos heterólogos, existen vacunas aprobadas para su uso en humanos basadas en VLP que brindan protección contra 3 infecciones virales, virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis E y virus del papiloma humano. En el caso de las vacunas contra la hepatitis B, Engerix-B y Recombivax HB ofrecen, además de protección con el VHB protección cruzada contra el genotipo A y C y se ha evidenciado que en algunos individuos los anticuerpos duran hasta 30 años(Kheirvari y col., 2023), es importante considerar estas características durante el desarrollo de una vacuna con la finalidad de obtener mayor eficacia en la población vacunada.

La falta de un modelo celular para el estudio de norovirus humano ha limitado el avance en relación con el entendimiento de la biología y patogenicidad del virus; así como, la aprobación de una vacuna para su uso en seres humanos,

los recientes avances en el desarrollo de un sistema de cultivo *in vitro* para evaluar la inmunogenicidad de los candidatos a vacunas podrían contribuir a la mejora en la eficacia de esta (Sion y col., 2023)

## XI. CONCLUSIONES

### 11.1. Conclusión general

Debido a la amplia variedad antigénica que presentan las diversas cepas circulantes de norovirus y rotavirus, es necesario la evaluación de éstas y la búsqueda de péptidos con características inmunogénicas que permitan la estimulación de la inmunidad humoral y celular para la generación de vacunas basadas en secuencias reportadas en diferentes zonas geográficas para prevenir y controlar la GA causada por norovirus, es por ello que se seleccionaron secuencias identificadas en México con la finalidad de contribuir con el desarrollo de vacunas de elevada eficacia en nuestra población.

### 11.2. Conclusiones específicas

- La edad más común de desarrollar un cuadro diarreico son niños de 0-14 años, principalmente menores de 5 años y adultos en edad laboral máxima de 22-54 años.
- Se encontró la presencia de rotavirus en el 4% de las muestras evaluadas
- Se evidenció la presencia de rotavirus en adultos mayores
- Se encontraron rotavirus G2 y G10 coinfectando en un mismo individuo
- Se encontraron parásitos en el 18% de las muestras analizadas
- El parásito más frecuente fue *Blastocystis spp*; sin embargo, es común encontrarlo en pacientes asintomáticos.
- Se establecieron epítomos potenciales para el desarrollo de vacunas múltiepitope de norovirus y rotavirus

## **XII.PERSPECTIVAS DEL PROYECTO**

1. Realizar el monitoreo estacional de norovirus y rotavirus
2. Realizar un constructo de vacuna multiepitope con los epitopes encontrados
3. Realizar la evaluación de la vacuna en modelos animales

### XIII.BIBLIOGRAFÍA

Ahmed, S. M., Hall, A. J., Robinson, A. E., Verhoef, L., Premkumar, P., Parashar, U. D., Koopmans, M., & Lopman, B. A. (2014). Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: A systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 14(8), 725–730.

Amoroso, M. G., Pucciarelli, A., Serra, F., Ianiro, G., Iafusco, M., Fiorito, F., Polverino, M. G., Dimatteo, M., Monini, M., Ferrara, D., Martemucci, L., Di Bartolo, I., De Carlo, E., & Fusco, G. (2024). Ten different viral agents infecting and co-infecting children with acute gastroenteritis in Southern Italy: Role of known pathogens and emerging viruses during and after COVID-19 pandemic. *Journal of Medical Virology*, 96(5), <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jmv.29679>

Anderson, E. J., & Weber, S. G. (2004). Rotavirus infection in adults. *The Lancet Infectious Diseases*, 4(2), 91–99. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(04\)00928-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(04)00928-4)

Angel, J., Franco, M. A., & Greenberg, H. B. (2007). Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations. *Nature Reviews Microbiology*, 5(7), 529–539. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1692>

Atmar, R. L., Opekun, A. R., Gilger, M. A., Estes, M. K., Crawford, S. E., Neill, F. H., & Graham, D. Y. (2008). Norwalk Virus Shedding after Experimental

Human Infection. *Emerging Infectious Disease journal*, 14(10), 1553.  
<https://doi.org/10.3201/eid1410.080117>

Bartnicki, E., Cunha, J. B., Kolawole, A. O., & Wobus, C. E. (2017). Recent advances in understanding noroviruses. *Research*, 6.  
<https://doi.org/10.12688/f1000research.10081.1>

Buan, A. K. G., Reyes, N. A. L., Pineda, R. N. B., & Medina, P. M. B. (2022). In silico design and evaluation of a multi-epitope and multi-antigenic African swine fever vaccine. *Immunoinformatics*, 8.  
<https://doi.org/10.1016/j.immuno.2022.100019>

Chansaenroj, J., Chuchaona, W., Lestari, F. B., Pasittungkul, S., Klinfueng, S., Wanlapakorn, N., Vongpunsawad, S., Chirathaworn, C., & Poovorawan, Y. (2020). High prevalence of DS-1-like rotavirus infection in Thai adults between 2016 and 2019. *PLOS ONE*, 15(6).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235280>

Cheetham, S., Souza, M., Meulia, T., Grimes, S., Han, M. G., & Saif, L. J. (2006). Pathogenesis of a Genogroup II Human Norovirus in Gnotobiotic Pigs. *Journal of Virology*, 80(21), 10372–10381. <https://doi.org/10.1128/jvi.00809-06>

Comité Asesor de vacunas e Inmunizaciones (CAV-AEP). (2024). *Rotavirus. Manual de inmunizaciones en línea de la AEP*.  
<https://vacunasaep.org/documentos/manual/cap-35#5>

Desselberger, U. (2014). Rotaviruses. *Virus Research*, 190, 75–96.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.06.016>

Diez-Valcarce, M., Cannon, J. L., Browne, H., Nguyen, K., Harrison, C. J., Moffatt, M. E., Weltmer, K., Lee, B. R., Hassan, F., Dhar, D., Wikswo, M. E., Payne, D. C., Curns, A. T., Selvarangan, R., & Vinjé, J. (2024). Prevalence and Genetic Diversity of Adenovirus 40/41, Astrovirus, and Sapovirus in Children with Acute Gastroenteritis in Kansas City 2011-2016. *The Journal of Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiae251>

Donaldson, E. F., Lindesmith, L. C., Lobue, A. D., & Baric, R. S. (2010). Viral shape-shifting: Norovirus evasion of the human immune system. En *Nature Reviews Microbiology*, 8(3), 231–241. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2296>

Dubal, Z. B., Mawlong, M., Susngi, B., Sanjukta, R., Puro, K., Ghatak, S., Sen, A., Shakuntala, I., Barbuddhe, S. B., Ahuja, A., & Bhattacharjee, U. (2015). Comparison of agarose gel electrophoresis and RNA-PAGE for rapid detection of rotavirus from faecal samples. *Journal of Applied Animal Research*, 43(1), 77–82. <https://doi.org/10.1080/09712119.2014.896262>

Esona, M. D., & Gautam, R. (2015). Rotavirus. *Clinics in Laboratory Medicine*, 35(2), 363–391. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cll.2015.02.012>

Farkas, T., Nakajima, S., Sugieda, M., Deng, X., Zhong, W., & Jiang, X. (2005). Seroprevalence of noroviruses in swine. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(2), 657–661. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.2.657-661.2005>

Grau, K. R., Roth, A. N., Zhu, S., Hernandez, A., Colliou, N., DiVita, B. B., Philip, D. T., Riffe, C., Giasson, B., Wallet, S. M., Mohamadzadeh, M., & Karst, S. M. (2017). The major targets of acute norovirus infection are immune cells in the gut-associated lymphoid tissue. *Nature Microbiology*, 2(12), 1586–1591. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0057-7>

Grimwood, K., Abbott, G. D., Fergusson, D. M., Jennings, L. C., & Allan, J. M. (1983). Spread of rotavirus within families: a community based study. *British Medical Journal*, 287(6392), 575. <https://doi.org/10.1136/bmj.287.6392.575>

Gutiérrez-Escolano, A. L. (2014). Host-cell factors involved in the calicivirus replicative cycle. En *Future Virology*, 9(2), 147–160. Future Medicine Ltd. <https://doi.org/10.2217/fvl.13.125>

Guzman-Holst, A., Ortega-Barria, E., Flores, Á. A., Carreño-Manjarrez, R., Constenla, D., & Cervantes-Apolinar, M. Y. (2021). 15-year experience with rotavirus vaccination in Mexico: a systematic literature review. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 17(10), 3623–3637. <https://doi.org/10.1080/21645515.2021.1936859>

Hijazi, G., Dakroub, F., Khoueiry, P., El-Kurdi, A., Ezzeddine, A., Alkalamouni, H., Alansari, K., Althani, A. A., Mathew, S., AlKhatib, H. A., Yassine, H. M., & Zaraket, H. (2022). Viral metagenomics analysis of stool specimens from children with unresolved gastroenteritis in Qatar. *Infection, Genetics and Evolution*, 105, 105367. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.meegid.2022.105367>

Hoque, H., Islam, R., Ghosh, S., Rahaman, M. M., Jewel, N. A., & Miah, M. A. (2021). Implementation of in silico methods to predict common epitopes for vaccine development against Chikungunya and Mayaro viruses. *Heliyon*, 7(3). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06396>

Hu, L., Sankaran, B., Laucirica, D. R., Patil, K., Salmen, W., Ferreon, A. C. M., Tsoi, P. S., Lasanajak, Y., Smith, D. F., Ramani, S., Atmar, R. L., Estes, M. K., Ferreon, J. C., & Prasad, B. V. V. (2018). Glycan recognition in globally dominant human rotaviruses. *Nature Communications*, 9(1), 2631. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05098-4>

Karst, S. M. (2010). Pathogenesis of noroviruses, emerging RNA viruses. En *Viruses*, 2(3), 748–781). <https://doi.org/10.3390/v2030748>

Karst, S. M., Zhu, S., & Goodfellow, I. G. (2015). The molecular pathology of noroviruses. *Journal of Pathology*, 235(2), 206–216. <https://doi.org/10.1002/path.4463>

Kaufman, S. S., Green, K. Y., & Korba, B. E. (2014). Treatment of norovirus infections: Moving antivirals from the bench to the bedside. *Antiviral Research*, 105, 80–91. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.02.012>

Kheirvari, M., Liu, H., & Tumban, E. (2023). Virus-like Particle Vaccines and Platforms for Vaccine Development. *Viruses*, 15(5) <https://doi.org/10.3390/v15051109>

Kumar, D., Shepherd, F. K., Springer, N. L., Mwangi, W., & Marthaler, D. G. (2022). Rotavirus Infection in Swine: Genotypic Diversity, Immune Responses, and Role of Gut Microbiome in Rotavirus Immunity. *Pathogens*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/pathogens11101078>

Leone, C. M., Dharmasena, M., Tang, C., Dicaprio, E., Ma, Y., Araud, E., Bolinger, H., Rupprom, K., Yeargin, T., Li, J., Schaffner, D., Jiang, X., Sharp, J., Vinjé, J., & Fraser, A. (2018). Prevalence of Human Noroviruses in Commercial Food Establishment Bathrooms. *Journal of Food Protection*, 81(5), 719–728. <https://doi.org/https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-419>

Lestari, F. B., Vongpunsawad, S., Wanlapakorn, N., & Poovorawan, Y. (2020). Rotavirus infection in children in Southeast Asia 2008–2018: disease burden, genotype distribution, seasonality, and vaccination. *Journal of Biomedical Science*, 27(1), 66. <https://doi.org/10.1186/s12929-020-00649-8>

Liu, Y., Zhang, Y., Wang, M., Cheng, A., Yang, Q., Wu, Y., Jia, R., Liu, M., Zhu, D., Chen, S., Zhang, S., Zhao, X., Huang, J., Mao, S., Ou, X., Gao, Q., Wang, Y., Xu, Z., Chen, Z., Chen, X. (2020). Structures and Functions of the 3' Untranslated Regions of Positive-Sense Single-Stranded RNA Viruses Infecting Humans and Animals. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2020.00453>

Luo, L., Gu, Y., Wang, X., Zhang, Y., Zhan, L., Liu, J., Yan, H., Liu, Y., Zhen, S., Chen, X., Tong, R., Song, C., & He, Y. (2019). Epidemiological and clinical differences between sexes and pathogens in a three-year surveillance of acute

infectious gastroenteritis in Shanghai. *Scientific Reports*, 9(1), 9993.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-46480-6>

Mahmoodi, S., Amirzakaria, J. Z., & Ghasemian, A. (2023). In silico design and validation of a novel multiepitope vaccine candidate against structural proteins of Chikungunya virus using comprehensive immunoinformatics analyses. *PLoS ONE*, 18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0285177>

Mans, J., Armah, G. E., Steele, A. D., & Taylor, M. B. (2016). Norovirus epidemiology in Africa: A review. *PLoS ONE*, 11(4).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146280>

Nandy, A., & Basak, S. C. (2019). Bioinformatics in design of antiviral vaccines. *Encyclopedia of Biomedical Engineering*, 1. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.10878-5>

Napthine, S., Lever, R. A., Powell, M. L., Jackson, R. J., Brown, T. D. K., & Brierley, I. (2009). Expression of the VP2 Protein of Murine Norovirus by a Translation Termination-Reinitiation Strategy. *PLOS ONE*, 4(12).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008390>

OMS. (2015). Informe de la OMS señala que los niños menores de 5 años representan casi un tercio de las muertes por enfermedades de transmisión alimentaria.

Page, N. A., Groome, M. J., Nadan, S., Netshikweta, R., Keddy, K. H., Poonsamy, B., Moyes, J., Walaza, S., Kahn, K., Madhi, S. A., Taylor, M. B.,

Mans, J., & Cohen, C. (2017). Norovirus epidemiology in South African children <5 years hospitalised for diarrhoeal illness between 2009 and 2013. *Epidemiology and Infection*, 145(9), 1942–1952. <https://doi.org/10.1017/S0950268817000668>

Raboni, S. M., Damasio, G. A. C., Ferreira, C. E. O., Pereira, L. A., Nogueira, M. B., Vidal, L. R., Cruz, C. R., & Almeida, S. M. (2014). Acute gastroenteritis and enteric viruses in hospitalised children in southern Brazil: Aetiology, seasonality and clinical outcomes. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(4), 428–435. <https://doi.org/10.1590/0074-0276140066>

Rouhani, S., Peñataro Yori, P., Paredes Olortegui, M., Sigwas Salas, M., Rengifo Trigoso, D., Mondal, D., Bodhidatta, L., Platts-Mills, J., Samie, A., Kabir, F., Lima, A. A. M., Babji, S., Mason, C. J., Kalam, A., Bessong, P., Ahmed, T., Mduma, E., Bhutta, Z. A., Lima, I., Nyathi, E. (2016). Norovirus infection and acquired immunity in 8 countries: Results from the MAL-ED study. *Clinical Infectious Diseases*, 62(10), 1210–1217. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw072>

Sion, E., Ab-Rahim, S., & Muhamad, M. (2023). Trends on Human Norovirus Virus-like Particles (HuNoV-VLPs) and Strategies for the Construction of Infectious Viral Clones toward In Vitro Replication. *Life* 13(7). <https://doi.org/10.3390/life13071447>

Siqueira, J. A. M., Júnior, E. C. S., Linhares, A. da C., & Gabbay, Y. B. (2017). Molecular analysis of norovirus in specimens from children enrolled in a 1982-

1986 study in Belém, Brazil: A community-based longitudinal study. *Journal of Medical Virology*, 89(11), 1894–1903.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jmv.24812>

Steele, A. D., Victor, J. C., Carey, M. E., Tate, J. E., Atherly, D. E., Pecenka, C., Diaz, Z., Parashar, U. D., & Kirkwood, C. D. (2019). Experiences with rotavirus vaccines: can we improve rotavirus vaccine impact in developing countries?

*Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 15(6), 1215–1227.

<https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1553593>

Teng-Feng, L., Myra, H., Hella, S., Ting, S., Zhaowei, W., Lei, Y., Stephen, C., G, G. I., & Xi, Z. (2018). Human Norovirus NS3 Has RNA Helicase and Chaperoning Activities. *Journal of Virology*, 92(5).

<https://doi.org/10.1128/jvi.01606-17>

Thorne, L. G., & Goodfellow, I. G. (2014). Norovirus gene expression and replication. En *Journal of General Virology*, 95, 278–291.

<https://doi.org/10.1099/vir.0.059634-0>

Tolentino-Ruiz, R., Montoya-Varela, D., García-Espitia, M., Salas-Benito, M., Gutiérrez-Escolano, A., Gómez-García, C., Figueroa-Arredondo, P., Salas-Benito, J., & De Nova-Ocampo, M. (2012). Development of a multiplex pcr assay to detect gastroenteric pathogens in the feces of Mexican children.

*Current Microbiology*, 65(4), 361–368. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0167-7>

Tran, H., Friendship, R., & Poljak, Z. (2023). Classification of group A rotavirus VP7 and VP4 genotypes using random forest. *Frontiers in Genetics*, 14. <https://www.frontiersin.org/journals/genetics/articles/10.3389/fgene.2023.10291>  
85

Trask, S. D., McDonald, S. M., & Patton, J. T. (2012). Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. *Nature Reviews Microbiology*, 10(3), 165–177. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2673>

Weerasekara, S., Prior, A. M., & Hua, D. H. (2016). Current tools for norovirus drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 11(6), 529–541. <https://doi.org/10.1080/17460441.2016.1178231>

Wingfield, T., Gallimore, C. I., Xerry, J., Gray, J. J., Klapper, P., Guiver, M., & Blanchard, T. J. (2010). Chronic norovirus infection in an HIV-positive patient with persistent diarrhoea: A novel cause. *Journal of Clinical Virology*, 49(3), 219–222. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcv.2010.07.025>

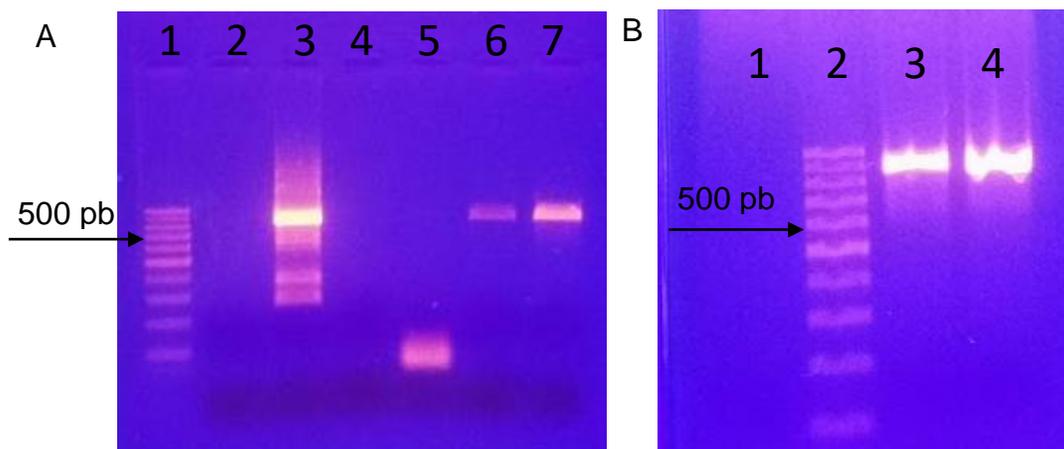
Yalda Lucero, A. (2014). Etiología y manejo de la gastroenteritis aguda infecciosa en niños y adultos. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 25(3), 463–472. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(14\)70063-X](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(14)70063-X)

Yen, C., & Cortese, M. M. (2012). 216 - Rotaviruses. En S. S. Long (Ed.), *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases (Fourth Edition)*, 1094–1097. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-2702-9.00218-X>

## XIV.ANEXOS

### 14.1. Documentos complementarios

#### 14.1.1. Productos de PCR específica para rotavirus



A) productos de amplificación con *primers* consenso para VP4; en el carril 1 se muestra el marcador de 100 pb, carril 2 corresponde al control positivo, carril 4,5 corresponden a muestras de sangre utilizadas como control negativo de RT, carril 6,7 corresponden a muestras positivas por rotaforesis. B) productos de amplificación con *primers* consenso para VP7; en el carril se muestra el control negativo, en el carril 2 el marcador de 100 pb, el carril 3 corresponde al control positivo, y el carril 4 a una muestra positiva por rotaforesis.

### 14.1.2. Péptidos de norovirus GI.3 para células B

Proteína	Posición	Secuencia	Score	Alergeno	Tóxico
<b>VP1</b>	409	TLTEAAQLAPPIYPPGFGEA	0.999	NO	NO
	494	FMTCVPNSSGSGPQTLPING	0.999	NO	NO
	313	PYHAFESPAPIGFPDIGDSD	0.999	NO	NO
	388	SPPSEGTPNKVNPWAIPRYG	0.997	NO	NO
	525	YQLKPVGTTGPVRRLGIRRS	0.996	SI	NO
	61	VQAPQGEFTISPNNTPGDIL	0.995	NO	NO
	164	DVRNVLFHNNNDNTPTMRLVC	0.983	SI	NO
	437	PIANGQDGLRVPCTIPQEFV	0.977	SI	NO
	1	MMMASKDAPTNMDGTSGAGQ	0.961	NO	NO
	185	LYTPLRASGSSSGTDPFVIA	0.928	SI	NO
	219	FLVPPNVEQKTKPFSVPDLP	0.926	NO	NO
	272	TLDGQLQGTTPTSASQLCKM	0.92	NO	NO
	39	AATAAATAGQVNMIDPWIMN	0.911	SI	NO
	251	IKFMMVSQDHGQMVQFQNGR	0.887	NO	NO
	118	FTAGKIIISCIPPGFVSQNI	0.832	NO	NO
<b>VP2</b>	175	ALQTTWVTPPGSSSTSTISS	1	NO	NO
	118	GGFMTIPTLYKGGKQQKAPT	0.984	SI	NO
	87	RVVVGAPATRVVDWNGTRVS	0.979	NO	NO
	10	AATAAGSAVGAGIQAGTEAA	0.901	NO	NO
	148	SSVSSRVADWVSSQNSSRSS	0.901	NO	NO
<b>VPg</b>	57	EEELAEVQAGGDGGIGETEA	1	SI	NO
	1	GKNKGKTKKGRGRKSNFNAF	1	SI	NO
	26	SDEEYEEYKKVREEKGGNYS	1	NO	SI
	82	VFYKSKSGLRKQRQEERRQL	0.994	NO	NO
	108	EIRKRKPIDWTPPKNDWSED	0.993	NO	NO

### 14.1.3. Péptidos de norovirus GII.4 para células B

Proteína	Posición	Secuencia	Score	Alergeno	Tóxico
<b>VP1</b>	305	SNWNNYDPTEEIPAPLGTP	0.999	Si	No
	17	NLVPEVNNEVMALPVGAA	0.991	No	No
	453	LPQEWVQYFYQEAPASDV	0.985	No	No
	409	SGRNTHNVHLAPAVPTFG	0.973	Si	No
	328	GKIQGMLTQTTRTDGSTRGH	0.972	No	No
	376	EANQNTKFTPVGVIQDGSTT	0.968	No	No
	56	FVQAPGGEFTVSPRNAPGEI	0.96	No	No
	521	VNQFYTLAPMGNGTGRRRVV	0.95	No	No
	121	FAAVPPNFPTEGLSPSQVTM	0.945	Si	No
	251	TGPSSAFVVQPQNGRCTTDG	0.924	Si	No
	500	AHTGQHDLVIPPNGYFRFDS	0.864	No	No
	432	LFFRSTMPGCSGYPNMDLDC	0.85	No	No
	284	CTFRGDVTHITGSRNYTMNL	0.814	No	No
	215	LVPPTVESRTKPFSPVLTV	0.797	Si	No
	349	ATVYTGSAADFAPKLRVQFE	0.795	No	No
156	IPLPDVRNNFYHYNQSDST	0.754	No	No	
<b>VP2</b>	148	DAVPARGSSNKSSNSSTATS	1	No	No
	126	YNAGRFSTPQPSGALPGRAN	1	No	No
	171	NQTVSTRLGSTAGSGTSVSS	0.969	No	No
	237	VPKEILDSWTGAFNTRRQPL	0.934	No	No
	61	KEMLQAQIEATKKLQQEMMK	0.921	No	No
	103	APMTKALDWSGTRYWAPDAR	0.793	Si	No
<b>VPg</b>	74	KIRQRIFRPTKQRKEERAT	1	No	No
	1	GKKGKNKTGRGKKHTAFSSK	0.999	Si	No
	23	SDEEYDEYKRIREERNGKYS	0.993	No	Si
	99	GSEIRKRNPDDEFKPKGKLWA	0.985	No	No

#### 14.1.4. Péptidos de norovirus GI.3 para MHC-I

Proteína Alelo	Posición	Secuencia	Score	Predicción	Homología con <i>H. sapiens</i>	Alergénico	Tóxico
<b>VP1</b>							
<b>HLA-A*0201</b>	111	VLLAGNAFT	13.68	UNION	NO	YES	NO
	386	WLSPPSEGT	12.56	UNION	NO	NO	NO
	488	KLYPEGFMT	12.27	UNION	NO	YES	NO
	168	VLFHNDNT	11.98	UNION	NO	YES	NO
<b>HLA-A*24</b>	59	NYVQAPQGE	13.52	UNION	NO	NO	NO
	21	LVPEANTAE	12.19	UNION	NO	NO	NO
	508	TLPINGVFT	11.16	UNION	NO	YES	NO
	307	TEIDGTPYH	10.85	UNION	NO	NO	NO
<b>HLA-A*2402</b>	155	LEPIEVPLE	16.36	UNION	NO	NO	NO
	59	NYVQAPQGE	15.63	UNION	NO	NO	NO
	384	LEWLSPPSE	12.87	UNION	NO	NO	NO
	461	NEQAPTRGE	12.15	UNION	NO	YES	NO
<b>VP2</b>							
<b>HLA-A*0201</b>	62	ALLQNSLNT	13.27	UNION	NO	NO	NO
	129	GKQQKAPT	12.7	UNION	NO	YES	NO
	114	TLRSGGFM	10.65	UNION	NO	YES	NO
	174	SALQTTWVT	7.83	UNION	NO	YES	NO
<b>HLA-A*24</b>	90	VGAPATRVV	10.5	UNION	NO	NO	NO
	122	TIPTLYKGGK	9.82	UNION	NO	YES	NO
	71	RYNMLTNAG	8.88	UNION	NO	YES	NO
	40	TLQSNTFKH	8.58	UNION	NO	YES	NO
<b>HLA-A*2402</b>	126	LYKGGKQQK	13.83	UNION	NO	YES	NO
	24	AGTEAALQH	11.66	UNION	NO	NO	NO
	145	NYGSSVSSR	9.45	UNION	NO	YES	NO
	170	PYHPSALQT	8.12	UNION	NO	YES	NO
<b>VPg</b>							
<b>HLA-A*0201</b>	120	PKNDWSEDT	15.09	UNION	NO	YES	NO
	1	GKNKGKTKK	13.87	UNION	NO	NO	NO
	110	RKRKPIDWT	13.51	UNION	NO	NO	NO
	84	YKSKSGLRK	13.06	UNION	NO	YES	NO
<b>HLA-A*24</b>	132	NYDEHISFE	12.88	UNION	NO	NO	NO
	32	EYKKVREEK	12.58	UNION	NO	NO	NO
	100	QLGLVSGTE	11.02	UNION	NO	NO	NO
	69	GGIGETEAE	10.83	UNION	NO	YES	NO
<b>HLA-A*2402</b>	43	NYSIQEYLE	14.46	UNION	NO	YES	NO
	72	GETEABIRH	14.23	UNION	NO	YES	NO
	27	DEEYEEYKK	13.41	UNION	NO	NO	NO
	31	EYKKVREE	13.02	UNION	NO	YES	NO

### 14.1.5. Péptidos de norovirus GII.4 para MHC-I

Proteína Alelo	Posición	Secuencia	Score	Predicción	Homología con <i>H. sapiens</i>	Alergénico	Tóxico
<b>VP1</b>							
<b>HLA-A*0201</b>	474	LLRFVNPDT	13.8	UNION	NO	YES	NO
	526	TLAPMGNGT	12.65	UNION	NO	YES	NO
	176	IKLIAMLYT	11.82	UNION	NO	YES	NO
	361	KLGRVQFET	11.65	UNION	NO	YES	NO
<b>HLA-A*24</b>	284	CTFRGDVTH	11.81	UNION	NO	YES	NO
	228	SVPVLTVEE	11.68	UNION	NO	YES	NO
	123	AVPPNFPTE	10.92	UNION	NO	NO	NO
	524	FYTLAPMGN	10.86	UNION	NO	NO	NO
<b>HLA-A*2402</b>	123	AVPPNFPTE	11.15	UNION	NO	NO	NO
	484	RVLFECKLH	10.14	UNION	NO	NO	NO
	24	NEVMALEPV	10.13	UNION	NO	NO	NO
	351	VYTGSADFA	9.95	UNION	NO	YES	NO
<b>VP2</b>							
<b>HLA-A*0201</b>	72	KKLQQEMMK	13.33	UNION	NO	YES	NO
	106	TKALDWSGT	13.03	UNION	NO	YES	NO
	238	PKEILDSWT	12.85	UNION	NO	NO	NO
	63	MLQAQIEAT	12.28	UNION	NO	YES	NO
<b>HLA-A*24</b>	99	GAINAPMTK	11.65	UNION	NO	YES	NO
	150	VPARGSSNK	10.81	UNION	NO	NO	NO
	231	QGTVSTVPK	10.26	UNION	NO	YES	NO
	64	LQAQIEATK	9	UNION	NO	NO	NO
<b>HLA-A*2402</b>	61	KEMLQAQIE	12.23	UNION	NO	NO	NO
	65	QAQIEATKK	10.45	UNION	NO	YES	NO
	80	KVKQAMLLE	9.54	UNION	NO	YES	NO
	51	NLQQASFQH	8.9	UNION	NO	YES	NO
<b>VPg</b>							
<b>HLA-A*0201</b>	4	GKNKTGRGK	13.03	UNION	NO	NO	NO
	103	RKRNPDDFK	11.76	UNION	NO	YES	NO
	12	KKHTAFSSK	10.2	UNION	NO	NO	NO
	84	RKQRKEERA	8.71	UNION	NO	NO	NO
<b>HLA-A*24</b>	56	ELAIKATE	13.43	UNION	NO	NO	NO
	53	YYEELAIK	11.81	UNION	NO	YES	NO
	96	LVTGSEIRK	10.9	UNION	NO	YES	NO
	93	TLGLVTGSE	7.61	NO UNION	NO	NO	NO
<b>HLA-A*2402</b>	125	DYNEKLDFE	12.12	UNION	NO	YES	NO
	53	YYEELAIK	11.9	UNION	NO	YES	NO
	64	EEDFCEEEE	10.59	UNION	NO	YES	NO
	28	DEYKRIREE	10.53	UNION	NO	YES	YES

### 14.1.6. Péptidos de norovirus GI.3 para MHC-II

Proteína Alelo	Posición	Secuencia	Score	Predicción	Homología con <i>H. sapiens</i>	Alergeno	Tóxico
<b>VP1</b>							
<b>HLA- DRB1*0802</b>	525	YQLKPVGTT	4	UNION	NO	NO	NO
	536	VRRLGIRRS	3.4	UNION	NO	NO	NO
	57	MNNYVQAPQ	2.7	UNION	NO	SI	NO
	201	FVIAGRVL	2.3	UNION	NO	NO	NO
<b>HLA- DRB1*0301</b>	123	IIISCIPPG	5.1	UNION	NO	SI	NO
	99	MYNGWVGNM	4.3	UNION	NO	NO	NO
	148	VIADVRVLE	4.3	UNION	NO	SI	NO
	152	VRVLEPIEV	3.9	UNION	NO	NO	NO
<b>HLA- DRB1*0701</b>	296	YHASGGQGL	6.2	UNION	NO	SI	NO
	49	VNMIDPWIM	5.2	UNION	NO	SI	SI
	179	MRLVCMLYT	4.9	UNION	NO	SI	NO
	152	VRVLEPIEV	4.8	UNION	NO	NO	NO
<b>HLA- DRB1*0813</b>	455	FVTHFVNEQ	3.5	UNION	NO	NO	NO
	201	FVIAGRVL	3.3	UNION	NO	NO	NO
	525	YQLKPVGTT	3.3	UNION	NO	NO	NO
	536	VRRLGIRRS	3.1	UNION	NO	NO	NO
<b>VP2</b>							
<b>HLA- DRB1*0802</b>	52	MLGLQVGAS	2.3	UNION	NO	SI	NO
	127	YK GKQQQKA	2.1	UNION	NO	NO	NO
	120	FMTIPTLYK	1.6	UNION	NO	SI	NO
	35	FQQDLTLQS	1.4	UNION	NO	NO	NO
<b>HLA- DRB1*0301</b>	35	FQQDLTLQS	4.6	UNION	NO	NO	NO
	88	VVVGAPATR	4.1	UNION	NO	NO	NO
	52	MLGLQVGAS	3.6	UNION	NO	SI	NO
	115	LRSGGFMTI	3.2	UNION	NO	SI	NO
<b>HLA- DRB1*0701</b>	146	YGSSVSSRV	5.2	UNION	NO	SI	NO
	115	LRSGGFMTI	4.7	UNION	NO	SI	NO
	55	LQVGASTAL	4.5	UNION	NO	SI	NO
	72	YNMLTNAGL	4.2	UNION	NO	NO	NO
<b>HLA- DRB1*0813</b>	127	YK GKQQQKA	3.1	UNION	NO	NO	NO
	120	FMTIPTLYK	2.2	UNION	NO	SI	NO
	35	FQQDLTLQS	2	UNION	NO	NO	NO
	168	LGPHYPSAL	2	UNION	NO	SI	NO
<b>VPg</b>							
<b>HLA- DRB1*0802</b>	84	YKSKSGLRK	2.3	UNION	NO	SI	NO
	109	IRKRKPIDW	2.2	UNION	NO	SI	NO
	78	IRHRVFYKS	1.9	UNION	NO	SI	NO
	82	VFYKSKSGL	1.9	UNION	NO	NO	NO

Continuación

<b>HLA- DRB*0301</b>	131	VNYDEHISF	5.1	UNION	NO	SI	NO
	90	LRKQRQEER	2.2	NO- UNION	NO	SI	NO
	82	VFYKSKSGL	1.93	NO- UNION	NO	NO	NO
	103	LVSGTEIRK	1.6	NO- UNION	NO	SI	NO
<b>HLA- DRB1*0701</b>	101	LGLVSGTEI	5.1	UNION	NO	NO	NO
	17	FNAFSRRGL	4	NO- UNION	NO	SI	NO
	109	IRKRKPIDW	2.8	NO- UNION	NO	SI	NO
	131	VNYDEHISF	2.7	NO- UNION	NO	SI	NO
<b>HLA- DRB1*0813</b>	82	VFYKSKSGL	3.7	UNION	NO	NO	NO
	109	IRKRKPIDW	3.08	UNION	NO	SI	NO
	84	YKSKSGLRK	2.9	UNION	NO	SI	NO
	78	IRHRVIFYKS	2.8	UNION	NO	SI	NO

### 14.1.7. Péptidos de norovirus GII.4 para MHC-II

Protein Allele	Position	Sequence	Score	Prediction	Homology with <i>H. sapiens</i>	Allergenic	Toxic
<b>VP1</b>							
<b>HLA-DRB1*0802</b>	326	FVGKIQGML	2.8	UNION	NO	NO0	NO
	220	VESRTKPFS	2.4	UNION	NO	YES	NO
	432	LFFRSTMPG	2.4	UNION	NO	YES	NO
	434	FRSTMPGCS	2.1	UNION	NO	YES	NO
	358	FAPKLGRVQ	1.8	UNION	NO	YES	NO
	457	WVQYFYQEA	1.7	UNION	NO	YES	NO
<b>HLA-DRB1*0301</b>	144	IIVDVRQLE	4.5	UNION	NO	NO	NO
	271	VLLGTTQLS	4.3	UNION	NO	YES	NO
	52	IRNNFVQAP	3.7	UNION	NO	YES	NO
	148	VRQLEPVL	3.5	UNION	NO	NO	NO
	179	IAMLYTPLR	3.4	UNION	NO	NO	NO
	475	LRFVNPDTG	3.3	UNION	NO	YES	NO
<b>HLA-DRB1*0701</b>	148	VRQLEPVL	4.9	UNION	NO	NO	NO
	195	VFTVSCRVL	4.8	UNION	NO	YES	NO
	138	VTMFPHIIV	4.2	UNION	NO	YES	NO
	176	IKLIAMLYT	4	NO UNION	NO	YES	NO
	491	LHKSGYVTV	3.9	NO UNION	NO	NO	NO
	293	ITGSRNYTM	3.8	NO UNION	NO	YES	NO
<b>HLA-DRB1*0813</b>	432	LFFRSTMPG	3.4	UNION	NO	YES	NO
	496	YVTVAHTGQ	3.2	UNION	NO	YES	NO
	166	YHYNQSND	2.9	UNION	NO	NO	NO
	308	WNNYDPTEE	2.7	UNION	NO	NO	NO
	457	WVQYFYQEA	2.7	UNION	NO	YES	NO
	220	VESRTKPFS	2.6	UNION	NO	YES	NO
<b>VP2</b>							
<b>HLA-DRB1*0802</b>	35	FENNRKLQ	2.1	UNION	NO	YES	NO
	79	MKVKQAMLL	1.6	UNION	NO	YES	NO
	46	FQFSSNLQ	0.6	NO UNION	NO	NO	NO
	249	FNTRRQPLF	0.6	NO UNION	NO	YES	NO
<b>HLA-DRB1*0301</b>	9	LASDVLGSG	3.2	UNION	NO	YES	NO
	212	MRGAHNISF	3.1	UNION	NO	NO	NO
	218	ISFVTPSS	2.8	NO UNION	NO	YES	NO
	21	LINAGAGAI	2.3	NO UNION	NO	YES	NO
<b>HLA-DRB1*0701</b>	212	MRGAHNISF	5.3	UNION	NO	NO	NO
	79	MKVKQAMLL	4.5	UNION	NO	YES	NO
	13	VLGSGLGSL	4.2	UNION	NO	NO	NO
	46	FQFSSNLQ	4.2	UNION	NO	NO	NO
<b>HLA-DRB1*0813</b>	35	FENNRKLQ	2.7	UNION	NO	YES	NO
	79	MKVKQAMLL	2.6	UNION	NO	YES	NO
	220	FVTPSSRS	2.2	UNION	NO	NO	NO

Continuación

<b>VPG</b>							
<b>HLA-DRB1*0802</b>	110	FKPKGKLWA	4.7	UNION	NO	NO	NO
	73	IKIRQRIFR	3.1	UNION	NO	NO	NO
	80	FRPTRKQRK	1.3	UNION	NO	NO	NO
	102	IRKRNPDDF	0.6	NO UNION	NO	YES	NO
<b>HLA-DRB1*0301</b>	73	IKIRQRIFR	3.5	UNION	NO	NO	NO
	124	VDYNEKLDF	2.1	NO UNION	NO	YES	NO
	102	IRKRNPDDF	2	NO UNION	NO	YES	NO
	80	FRPTRKQRK	1.5	NO UNION	NO	NO	NO
<b>HLA-DRB1*0701</b>	94	LGLVTGSEI	4.6	UNION	NO	NO	NO
	80	FRPTRKQRK	2.8	NO UNION	NO	NO	NO
	110	FKPKGKLWA	1.2	NO UNION	NO	NO	NO
	57	LAIKATEE	1.2	NO UNION	NO	YES	NO
<b>HLA-DRB1*0813</b>	110	FKPKGKLWA	5.3	UNION	NO	NO	NO
	73	IKIRQRIFR	3.98	UNION	NO	NO	NO
	80	FRPTRKQRK	2.3	UNION	NO	NO	NO
	102	IRKRNPDDF	1.8	NO UNION	NO	YES	NO

### 14.1.8. Péptidos de norovirus GI.3 para células B

Proteína	Posición	Secuencia	Score	Alergeno	Tóxico
<b>VP4</b>	176	FHGETPRATTDSSNTANLNG	0.999	NO	NO
	61	VEPILDGPYQPTTFTPPNDY	0.997	NO	NO
	84	INSNTNGVVYESTNNSDFWT	0.976	SI	NO
	106	IAVEPHVDPVDRQYNVFGEN	0.945	SI	NO
<b>VP7</b>	270	DITADPTTIPQTERMMRINW	0.997	SI	NO
	195	VCPLNTQTLGIGCTTTDVT	0.997	NO	NO
	64	DTAYVNSTQQENFMTSTLCL	0.988	SI	NO
	297	YTVVDYINQIVQVMSKRERS	0.976	SI	NO
	239	ITVNTCTIRNCKKLGPRENV	0.955	NO	NO
	107	LTKGWPVNSVYFKSYADISS	0.918	NO	NO
	86	PSSVTTEITDPDWTNTLSQL	0.887	NO	NO
	173	YYYQQTDEANKWISMGESCT	0.86	NO	NO
<b>VPg</b>	332	NVTSVRQEYAIPVGPVFPPG	0.998	NO	NO
	28	MNGNEFQTGGIGNLPIRNWN	0.954	SI	NO
	231	ATTWYFNPVILRPNNVEVEF	0.94	SI	NO
	83	CMDEMVRRESQRNGIAPQSDS	0.926	SI	NO
	184	CAINAPANTQQFEHIVQLRR	0.918	NO	NO
	115	NFDNSSEYIENWNLQNRQR	0.917	NO	NO
	353	NWTDLITNYSRREDNLQRV	0.795	NO	NO

## 14.2. Productos académicos

La Benemérita Universidad Autónoma de Puebla  
A través de la Facultad de Medicina  
otorga la presente:

# CONSTANCIA

A: **Cristel Samantha Benítez Bueno**

Por su participación en la Exposición Oral, en la Modalidad Investigación Básica; con el título: "Identificación molecular de norovirus y rotavirus en heces de niños en edad preescolar del municipio de Culiacán" en el Marco del **2° Congreso Nacional de Bacteriología y Virología Clínico Molecular**

Realizado del 13 - 15 de noviembre del 2019.

"Pensar bien, para vivir mejor"

H. Puebla de Z; a 15 de noviembre del 2019



M.C. José Luis Gándara Ramirez  
Director de la Facultad de Medicina



M.C. María Guadalupe Guzmán Coli  
Coordinadora Académica



# BUAP



FACULTAD DE  
CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA



SE OTORGA LA PRESENTE

# CONSTANCIA

A:

**BENÍTEZ BUENO CRISTEL SAMANTHA, DURÁN PÉREZ SERGIO  
ALONSO, RENDÓN MALDONADO JOSÉ GUADALUPE**

Por su participación en la presentación del póster científico con el trabajo titulado  
**“CARACTERIZACIÓN IN SILICO DE REGIONES ANTIGÉNICAS DE LAS PROTEÍNAS  
DE NOROVIRUS”** impartida el día 25 de octubre de 2022, en el marco del Simposium  
Internacional, 80 aniversario de QFB.



ATENTAMENTE  
**SURSUS VERSUS**  
CULIACÁN, SINALOA, OCTUBRE 2022

*Eusiel Rubio Castro*

**DR. EUSIEL RUBIO CASTRO**  
DIRECTOR FCQB



DFIE/22/E4/068EA/4/Cg&M/61/241022-271022



# EL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL, LA RED DE BIOTECNOLOGÍA DEL IPN, LA UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA Y LA SOCIEDAD ESTUDIANTIL DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA



Otorgan la presente constancia a:

**Cristel Samantha Benítez Bueno, Sergio Alonso Durán Pérez, Ana Lorena Gutiérrez Escolano, José Guadalupe Rendón Maldonado**

Por su participación como **PONENTE** con la presentación en CARTEL de su trabajo titulado:

**"In silico prediction of protective antigens of the norovirus protein"**

en el **3<sup>er</sup> Biotechnology World Symposium y 4<sup>o</sup> Congreso Estudiantil de Ingeniería Biotecnológica SEIBT.**

**Dra. María Guadalupe Sotelo**  
Directora de UPIBI

**Dra. Norma Leyva**  
Coordinadora de la Red de Biotecnología

**Hannia Sinai Martínez Sánchez**  
Presidenta de la SEIBT

Mazatlán, Sinaloa, México del 24 al 27 de octubre de 2022



# Acta de Examen 2021 / 029



Facultad de Ciencias  
Químico Biológicas  
Culiacán, Sinaloa, Méx.

**DIRECCIÓN**

EXAMEN PRESENTADO  
POR  
JOHANA JUDITH SANTOS  
RAMOS

PARA OBTENER EL  
GRADO DE LICENCIADO  
EN QUÍMICO  
FARMACÉUTICO  
BIÓLOGO

No. DE CUENTA  
1218816-6

SARJ970608MSLNMH01



En cumplimiento del Reglamento Interno de Titulación de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa, siendo las **17:00 horas del día 26 del mes de agosto del año 2021** se reunieron en el Auditorio QFB Ernesto Camacho Sánchez en la ciudad de Culiacán Rosales, Sinaloa, el C. Dr. José Geovanni Romero Quintana, Subdirector Académico así como los ciudadanos Dr. Sergio Alonso Durán Pérez, Dra. María de Jesús Navarro Arias y Dr. Lucio de Jesús Hernández Díaz nombrados para integrar el Jurado Calificador del Examen Profesional de la **C. Johana Judith Santos Ramos** quien presentó un trabajo escrito titulado **Identificación de Rotavirus en muestras de heces humanas de población Sinaloense** ejerciendo como Directores de Tesis Dr. José Guadalupe Rendón Maldonado y MSc Cristel Samantha Benítez Bueno.

Se constituyó el jurado fungiendo como Presidente Dr. Sergio Alonso Durán Pérez, como Secretario Dra. María de Jesús Navarro Arias y como Vocal Dr. Lucio de Jesús Hernández Díaz.

Declarado constituido legalmente el jurado, se procedió a la presentación, interrogación, y réplica del sustentante, y al término de ello, el jurado emite el resultado de: **Aprobado por Unanimidad**

Levantándose para constancia la presente acta que firma el Presidente, el Secretario, el Vocal del Jurado, el Sustentante y el Subdirector Académico que DA FÉ.

PRESIDENTE

SECRETARIO

VOCAL

SUBDIRECTOR ACADÉMICO  
SUSTENTANTE

## XV.SIGLAS Y ABREVIACIONES

ACMR: Análisis de ancestro común más reciente

AIC: Criterio de información de Akaike

ARN : Ácido ribonucleico

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario

dsARN: Ácido desoxirribonucleico de doble cadena

ETA: Enfermedades de transmisión alimentaria

FUT2: Fucosiltransferasa

HBGA: antígeno del grupo histo-sanguíneo

HuNVs: Norovirus humanos

GA: Gastroenteritis aguda

kDa: KiloDalton

MEGA: *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*

MCMC: Método de Montecarlo basado en cadenas de Markov

MNV: Norovirus murino

NoVs: Norovirus

NSP: Proteína no estructural

OMS: Organización Mundial de la Salud

ORF: Marco de lectura abierto

PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida

PB: pares de bases

RdRp: ARN polimerasa dependiente de ARN

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa acoplada con retrotranscripción

UV: Luz ultravioleta

VLPs: Partículas tipo virus

VP: Proteína estructural de la cápside