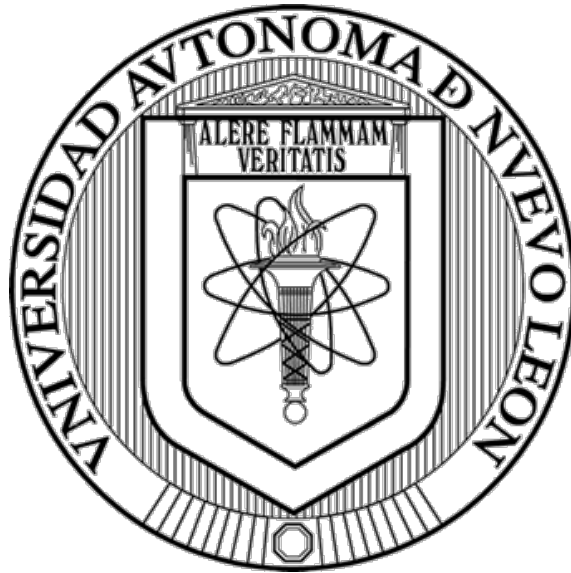


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y MEDICINA MOLECULAR**



**“Estudio de cepas circulantes de Norovirus humano para establecer relaciones filogenéticas, genes relacionados con patogénesis y elucidar mecanismos moleculares de patogenicidad.”**

**PRESENTA:**

**M.C. MAGDA ELIZABETH VERA GARCÍA.**

**Como requisito parcial para obtener el grado en Doctorado en Ciencias con Orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética.**

**MARZO 2022**

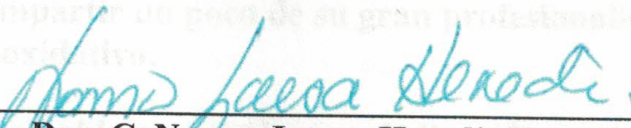
**“Estudio de cepas circulantes de Norovirus humano para establecer relaciones filogenéticas, genes relacionados con patogénesis y elucidar mecanismos moleculares de patogenicidad.”**

**Aprobación de la Tesis:**



---

**Dra. C. Ana María G. Rivas Estilla**  
**Directora de Tesis**



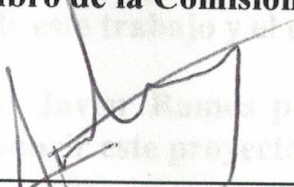
---

**Dra. C. Norma Laura Heredia Rojas**  
**Co-Directora de la Comisión de Tesis**



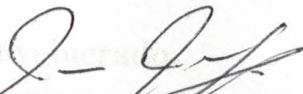
---

**Dr. C. Carlos Córdova Fletes**  
**Miembro de la Comisión de Tesis**



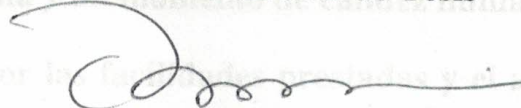
---

**Dr. C. José Ángel Merino Mascorro**  
**Miembro de la Comisión de Tesis**



---

**Dr. med. Javier Ramos Jiménez**  
**Miembro de la Comisión de Tesis**



---

**Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez**  
**Subdirector de Estudios de Posgrado**

## **AGRADECIMIENTOS**

**A Sara, eres mi motor de vida y un factor clave para realizar este objetivo profesional, un sueño antes inconcluso, y permitírnos seguir abriendo la brecha para un futuro más equitativo y digno para nosotras las mujeres.**

**A mi familia, son un soporte para mis metas personales y profesionales, sin su apoyo sería muy difícil obtener este logro.**

**A Sergio por apoyarme en los momentos más complicados.**

**A mis compañeros y amigos Mayra, Tanya, Sonia, Natalia, Kame y Diana por darme fortaleza a través de sus consejos y apoyo incondicional.**

**A la Dra. Sonia por compartir un poco de su gran profesionalismo y experiencia en la investigación de estrés oxidativo.**

**Al Dr. Kame por su invaluable conocimiento y dedicación en el área de secuenciación y bioinformática.**

**A la Dra. Ana María Rivas por brindarme la oportunidad y el espacio en su laboratorio, dando siempre un ejemplo de trabajo y perseverancia en las ciencias.**

**A la Dra. Norma Heredia y el Dr. Ángel Merino por proporcionar herramientas fundamentales en la estrategia de este trabajo y el consejo oportuno en este proyecto.**

**Al Dr. Carlos Córdova y el Dr. Javier Ramos por ofrecer una acertada opinión y plataformas de trabajo para conducir este proyecto.**

**Al Dr. Gerardo Padilla por compartir su experiencia en el análisis estadístico de este trabajo.**

**A todo el equipo de trabajo involucrado.**

**Al personal del Departamento de Bioquímica y mis compañeros, por proporcionar siempre una atención oportuna y un momento de calidez humana.**

**A la Dra. Gloria González por las facilidades prestadas y el apoyo para obtener este grado.**

**A CONACYT por proporcionar los medios necesarios para realizar este trabajo de tesis.**

**A todas las personas, circunstancias y sucesos que intervinieron en la obtención de este grado: ¡GRACIAS! ¡GRACIAS! ¡GRACIAS!**

# TABLA DE CONTENIDO

ABREVIATURAS .....	6
RESUMEN .....	7
PRESENTA: M.C. MAGDA ELIZABETH VERA GARCÍA .....	7
I. INTRODUCCIÓN.....	8
1. GASTROENTERITIS.....	8
2. NOROVIRUS.....	9
2.1 <i>CALICIVIRIDAE</i> .....	9
2.2 SINTOMATOLOGÍA, VÍA DE TRANSMISIÓN Y PREVENCIÓN.....	10
2.3 INCIDENCIA.....	12
2.4 DESCRIPCIÓN MOLECULAR.....	12
2.5 MODELOS DE REPLICACIÓN DE NOROVIRUS.....	16
2.6 MECANISMOS MOLECULARES DE PATOGENIA Y ESTRÉS OXIDATIVO .....	17
2.7 DIAGNÓSTICO MOLECULAR .....	19
2.8 CLASIFICACIÓN FILOGENÉTICA DE NOROVIRUS.....	22
2.9 BROTES EPIDEMIOLÓGICOS.....	27
2.10 NOROVIRUS EN MÉXICO .....	29
3. JUSTIFICACIÓN.....	32
4. HIPÓTESIS.....	33
5. OBJETIVO.....	34
6. ESTRATEGIA GENERAL .....	35
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
7.1 LÍNEA CELULAR.....	36
7.2 REACTIVOS PARA CULTIVO CELULAR.....	36
7.3 VIRUS.....	36
7.4 EQUIPOS Y OTROS REACTIVOS.....	36
7.5 RECEPCIÓN DE MUESTRA FECAL .....	38
7.6 MANIPULACIÓN DE MUESTRAS FECALES.....	39
7.7 OBTENCIÓN DE RNA Y CDNA .....	39
7.8 ESTANDARIZACIÓN DE QPCR DÚPLEX PARA DETECCIÓN DE NVH GI Y GII.....	40
7.9 SECUENCIACIÓN DEL GENOMA COMPLETO .....	41
7.10 ANÁLISIS METAGENÓMICO Y FILOGENÉTICO VIRAL .....	42
7.11 CULTIVO CELULAR.....	43
7.12 PROPAGACIÓN VIRAL .....	43
7.13 TITULACIÓN VIRAL.....	44
7.14 PREPARACIÓN DE AGAROSA DE BAJO PUNTO DE FUSIÓN Y VISUALIZACIÓN CON TINCIÓN DE AZUL DE NAFTOL .....	46

<b>7.15 ENSAYO DE VIABILIDAD DE CÉLULAS RAW264.7 INFECTADAS CON MNV.....</b>	<b>46</b>
<b>7.16 DETERMINACIÓN DE PERÓXIDOS TOTALES.....</b>	<b>47</b>
<b>7.17 DETERMINACIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO MITOCONDRIAL.....</b>	<b>47</b>
<b>7.18 EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE SISTEMAS ANTIOXIDANTES.....</b>	<b>48</b>
<b>7.19 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>	<b>48</b>
<b>8. RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>
<b>9. DISCUSIÓN.....</b>	<b>71</b>
<b>10. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>76</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>78</b>
<b>FIGURAS Y TABLAS.....</b>	<b>84</b>

## ABREVIATURAS

μL	microlitro
ng	nanogramo
Cat	Catalasa
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CVH	Calicivirus humanos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAds	Ácido desoxirribonucleico de doble hebra
GEA	Gastroenteritis aguda
GI	Genogrupo I
GII	Genogrupo II
mL	Mililitro
MNV	Norovirus Murino
NV	Norovirus
NVH	Norovirus Humano
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SOD-1	Superóxido dismutasa 1
SOD-2	Superóxido dismutasa 2
Trx	Tiorredoxina

## RESUMEN

**Presenta:** M.C. Magda Elizabeth Vera García

**Fecha de graduación:** 2022

**Título de Tesis:** Estudio de cepas circulantes de Norovirus humano para establecer relaciones filogenéticas, genes relacionados con patogénesis y elucidar mecanismos moleculares de patogenicidad.

**Introducción:** Norovirus (NV) es el principal agente patógeno viral causante de la gastroenteritis aguda (GEA) a nivel mundial en brotes y casos esporádicos afectando principalmente a niños, ancianos y sujetos inmunosuprimidos. La caracterización de los mecanismos moleculares de patogénesis de este virus ha sido limitada debido a las dificultades de la replicación *in vitro*; sin embargo, el norovirus murino (MNV) ofrece un modelo de cultivo robusto. Además, las infecciones de RNA virus de polaridad positiva se caracterizan por la explotación de membranas de retículo endoplásmico rugoso que puede derivar en la inducción del estrés oxidativo celular.

**Objetivo:** Identificar y secuenciar el genoma completo de cepas circulantes de NVH en pacientes infectados en México y estudiar la relación del estrés oxidativo con los mecanismos de patogénesis de NV.

**Métodos:** Se obtuvieron 42 muestras de pacientes con GEA en el Hospital Universitario de la UANL, las cuales fueron evaluadas mediante qPCR dúplex seleccionando las muestras positivas a NV GI y GII por qPCR dúplex. Posteriormente se sintetizó el DNAs a partir del RNA viral, el material genético fue analizado mediante secuenciación por puenteo a través de la plataforma Illumina; se realizó el análisis bioinformático metagenómico y filogenético de las secuencias obtenidas. Así mismo se implementó un modelo de replicación *in vitro* de MNV en células Raw264.7 para la evaluación de peróxidos totales, anión superóxido mitocondrial, así como la evaluación de la expresión génica de sistemas celulares antioxidantes tales como SOD-1, SOD-2, Cat y Trx mediante qPCR.

**Resultados:** En este trabajo se identificó NVH en el 19% de las muestras de pacientes de todas las edades; de manera interesante se detectó NVH en el 27% de los pacientes de 0 a 10 años. Además, el análisis bioinformático permitió la identificación de dos genotipos circulantes de NV GII.4/GII.P16 y el genotipo de la polimerasa GI.P4, así mismo se determinó la presencia de bacteriófagos en todas las muestras. La evaluación de los indicadores de estrés oxidativo durante la infección de MNV mostró un incremento de los peróxidos totales a las 12h, así como un incremento del anión superóxido a las 36h, mientras que la expresión génica relativa a nivel transcripcional de los genes SOD-1, SOD-2, Cat y Trx mostró un incremento a las 12h y un decremento a las 36h.

**Conclusiones:** En este proyecto se encontró un 19% de NVH identificando en población mexicana de todas las edades, caracterizando los genotipos GII.4/GII.P16 y GI.P4. Además, los ensayos *in vitro* con el MNV mostraron un posible desbalance del estrés oxidativo celular relacionado a la infección, permaneciendo como perspectiva la identificación de la participación de las proteínas virales en la alteración de este mecanismo celular.

# I. INTRODUCCIÓN

## 1. Gastroenteritis

El término gastroenteritis aguda (GEA) se define como la inflamación de las membranas mucosas del tracto intestinal y se caracteriza por episodios de diarrea y vómito. Esta enfermedad ataca a personas de todas las edades; sin embargo, afecta principalmente a niños, reportándose de 3,000 a 5,000 millones de infecciones a nivel mundial por año y entre 1.5 a 2.5 millones de muertes por año en niños menores a 5 años (1). Los agentes etiológicos de esta enfermedad generalmente son del tipo bacteriano como: *Salmonella sp.*, *Campylobacter sp.*, *Shigella sp.* y *Yersina sp.*; y viral como: rotavirus (RV) y norovirus (NV) (2). Los patógenos virales son una de las principales preocupaciones en el sector salud debido a la alta frecuencia y pobre caracterización de estos patógenos, así como a la falta de tratamiento específico; la sintomatología comúnmente es tratada con hidratación y paliativos durante el tiempo que permanece la fase aguda de la infección en el paciente.

Por una parte, el RV se considera uno de los principales patógenos virales en el desarrollo de GEA, sin embargo, en el año 1996 fue evaluada por la FDA como la primera vacuna contra RV fabricada a partir de virus vivos atenuados (3); esta vacuna ha sido mejorada y existen varias opciones en el mercado como Rotarix y RotaTeq. Este método profiláctico ha sido adoptado en el sistema de vacunación de al menos 75 países, entre ellos Brasil (2006), El Salvador (2006), Estados Unidos de América (1998), México (2006), Nicaragua (2006), Panamá (2006) y Venezuela (2006). De acuerdo con la CDC (Center for Disease Control and Prevention) la implementación de esta terapia ha comenzado a cambiar los patrones epidemiológicos. En un estudio realizado con niños al norte de Brasil en del año 2006 al 2013 en población vacunada contra RV (562/1,432) se detectó un decremento en la incidencia de



RV mientras que reflejan un incremento significativo en la incidencia de NV; por lo que se prevé que el NV tomará el puesto número uno como agente etiológico de GEA (4).

## **2. Norovirus**

El NV es un agente patológico, conocido como la enfermedad del vomito del invierno por su traducción del inglés “Winter vomiting disease”, que fue identificado como un agente viral en el año 1968 después de un brote del NV genogrupo I (GI) en una escuela primaria en Norwalk, Ohio, EUA (5). Esto derivó en su posterior identificación por microscopía electrónica en el año 1972 y su nombramiento como “virus Norwalk”; dicho genotipo es conocido como cepa prototipo de calicivirus humano. En el año 2002 la ICTV, por sus siglas del inglés “International Committee on Taxonomy of Virology”, asignó este virus a la familia *Caliciviridae* y lo nombró oficialmente como Norovirus.

### **2.1 *Caliciviridae***

La familia *Caliciviridae* aún no está asignada a algún orden taxonómico; su nombre deriva del latín “calix”, que significa cáliz en español, debido a la forma de copa que presenta la estructura de estos virus. Esta familia se encuentra conformada por 5 géneros Lagovirus, Nebovirus, Norovirus, Sapovirus y Visivirus (6). Los calicivirus se caracterizan por ser virus de RNA de cadena positiva, no envueltos y con una simetría icosaédrica de aproximadamente 27 a 35nm de diámetro; también producen una sola poliproteína. Estos virus inducen lesiones al tracto respiratorio y mucocutáneo en muchas especies animales incluyendo bovinos, caninos, felinos, porcinos, pinnípedos y humanos. Algunos de ellos han sido cultivados,

purificados y caracterizados. El calicivirus humano más conocido es el NV ya que se posiciona como la principal causa de GEA epidémica no bacteriana en niños y adultos (7).

## **2.2 Sintomatología, vía de transmisión y prevención.**

La sintomatología asociada a la infección por NV es un cuadro clásico de diarrea aguda y/o vomito en niños y adultos. Tiene un comienzo abrupto acompañado de diferentes combinaciones de signos y síntomas incluyendo cólicos abdominales, mialgias, malestar, dolor de cabeza, náusea y fiebre leve. La enfermedad comúnmente se resuelve espontáneamente en el transcurso de 24 a 48 horas, pero puede prolongarse en niños, adultos de la tercera edad y pacientes inmunocomprometidos (8). Si bien las fatalidades son muy raras en países de primer mundo y confinadas a personas de la tercera edad o individuos debilitados, el impacto económico estimado en EUA es de 2 billones de dólares de pérdidas ocasionadas por aproximadamente 21 millones de casos por año (9).

Las principales vías de transmisión de este virus son de persona a persona y la vía fecal-oral, a través del contacto con materia fecal, vómito, aerosoles, agua, alimentos o fómites contaminados. Se ha observado frecuentemente la aparición de brotes epidemiológicos ocasionada por NV en poblaciones en condiciones de hacinamiento como lo son cruceros, hoteles, hospitales, refugios y zonas de desastre (10). Los principales factores involucrados en el éxito del contagio de NV son su baja dosis infecciosa media de 18 partículas virales y su alta resistencia a condiciones medioambientales (11).

En cuanto a su resistencia, el NV no se inactiva por los métodos tradicionales de preservación y almacenamiento como lo son el congelamiento, la acidificación y tratamientos moderados

con temperatura (pasteurización). Bajo condiciones de refrigeración y congelación, el virus se mantiene intacto y viable por muchos años. Mientras tanto también resiste ácidos gástricos a pH 3-4; el virus mantiene su infectividad después de la exposición a pH 2.7 por 3 horas a temperatura ambiente y se cree que es sensible a pH mayor 9.0. Basado en información de otros virus entéricos e indicadores virales, es probable que NV persista en agua por extensos periodos de tiempo posiblemente semanas o meses; NV ha causado muchos brotes originados en agua y es detectado frecuentemente en aguas medioambientales. NV es también resistente al secado; se ha detectado NV infeccioso en superficies como tapetes después de 12 días del inicio de un brote. Respecto al tratamiento por calor NV se mantiene infeccioso después de un calentamiento de 60°C por 30 minutos, además la pasteurización no es suficiente para eliminar el virus. Se ha demostrado la inactivación del virus a 70°C por lo que las preparaciones alimentarias como cocción, horneado y rostizado son suficientes para mantener la inocuidad alimentaria (12).

Actualmente las normativas de salubridad de México, EUA y otros países se limitan a la recomendación de buenas prácticas de manufactura de alimentos, sin embargo, el análisis molecular de este virus como practica rutinaria no es reglamentaria por lo que la liberación al mercado de productos contaminados por NV se mantiene latente. La FSIS (Food Service and Inspection Service) de EUA recomienda no permitir trabajar a empleados enfermos o que tengan menos de 2 días después de su convalecencia y usar guantes en el manejo de comida (13).

### **2.3 Incidencia.**

NV es la causa principal de GEA asociada a brotes epidémicos a nivel mundial, causando 50% de todos los casos y más del 90% de GEA no bacteriana. En estudios de metaanálisis realizados a nivel mundial y en países de Latinoamérica se encontró una prevalencia del 18% de GEA causada por NV. Recientes estudios en Finlandia, EUA y Nicaragua han demostrado el incremento de la prevalencia de NV después de la introducción de la vacunación contra RV en dichos países (14). En países de Latinoamérica no se ha encontrado un patrón de incremento en la prevalencia de NV en las localidades con vacunación contra RV, sin embargo, tanto el periodo de colección de muestras, así como la cobertura de la campaña de vacunación pueden afectar el impacto de la vacuna en la prevalencia de la infección con NV en Latinoamérica. Por otra parte, la incidencia de GEA ocasionada por NV en niños menores a 5 años fue de 17 a 23 casos por cada 100 personas; esto concuerda con lo estimado por Reino Unido de 21 a 100 personas en el mismo grupo de edad. Las infecciones asintomáticas de NV son comunes en niños de Latinoamérica, se estima que la prevalencia de infecciones asintomáticas de NV es del 8% (15).

### **2.4 Descripción Molecular**

El género NV es conformado por un grupo de virus no envueltos de RNA de cadena positiva simple cuyas partículas virales tienen un diámetro de 27 a 40 nm. El genoma de NV posee una longitud de 7.5 a 7.7 kb que contiene tres marcos abiertos de lectura, ORF (por sus siglas del inglés Open Reading Frame), ORF1, ORF2 y ORF3 (16) (Figura 1).

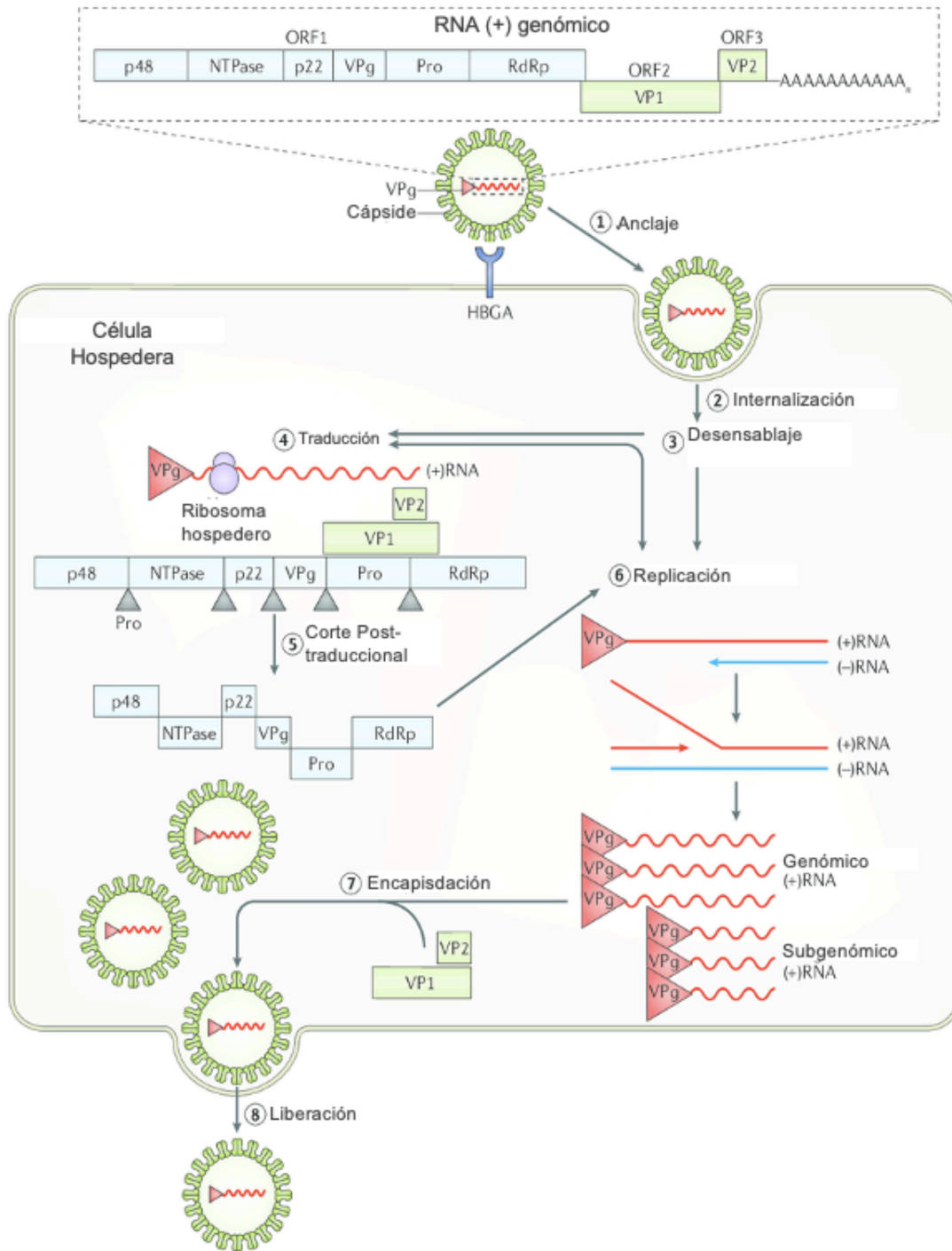
El ORF1 proximal a 5' codifica una poliproteína de 200kDa la cual es escindida en la post-traducción, por la proteasa viral tipo 3C de 20kDa llamada NS6 o Pro, en 6 proteínas no

estructurales necesarias para la replicación viral. La poliproteína presenta 5 sitios de corte bien conservados que son procesados en un orden muy específico. Los sitios tempranos de corte (NS1/2-3 y NS3-4) son escindidos rápidamente mientras que los tardíos (NS4-5, NS5-6, y NS6-7) son procesados subsecuentemente de manera menos eficiente. El procesamiento de la poliproteína deriva en la producción de 6 proteínas: NS1/2, NS3, NS4, NS5, NS6 y NS7. NS5 o VpG, funciona como una proteína-primer para la síntesis de RNA y a la vez permite la traducción del genoma viral a través de interacciones con el complejo de traducción del hospedero. Por otra parte, el corte del precursor NS6-NS7 (también conocido como Pro-Pol o 3CD) es esencial para la viabilidad del NV; NS6 o 3CLpro y NS7 o RdRp, codifican la proteasa tipo 3C y la polimerasa dependiente de RNA, respectivamente. Las 3 proteínas N-terminal se encuentran menos caracterizadas, pero se localizan en las membranas citoplasmáticas. NS1/2 o p48, se ubica en el retículo endoplásmico y está implicado en la persistencia viral. NS3 tiene actividad de NTPasa y RNA helicasa, además recientemente se demostró que interactúa con membranas ricas en colesterol y proteínas del citoesqueleto. NS4 o p22 tipo-3A, se localiza en endosomas (17, 18).

Adicionalmente, ORF2 codifica la proteína estructural mayor VP1 de 60kDa; esta proteína de cápside se organiza en dos dominios proteicos bien conservados el dominio interno S, del inglés “shell”, y el dominio de protrusión P, del inglés “protruding”. El dominio S se encarga de rodear el RNA genómico mientras que el P se une al dominio S a través de una bisagra flexible y es la región C-terminal de VP1. El dominio P está conformado por los subdominios P1, correspondiente al tallo proteico, y P2 que es la región hipervariable. Esta última posee la secuencia más divergente del genoma de NV y alberga las características de reconocimiento del sistema inmune e interacciones celulares como lo es el caso de su

interacción con los grupos sanguíneos de Lewis (HBGA por sus siglas en inglés). Por lo tanto, se cree que la proteína de cápside no solo proporciona una estructura de protección para el virus, sino que también contiene sitios de unión a receptores y determinantes del genotipo o serotipo viral (5, 19).

ORF3 codifica una proteína estructural pequeña llamada VP2 la cual se localiza al interior de la cápside y está probablemente involucrada en el ensamblaje de la estructura y encapsidación viral. Las proteínas estructurales VP1 y VP2 son traducidas a partir de un RNA subgenómico. Los extremos 5' de los RNA genómicos y subgenómicos están covalentemente ligados a una pequeña proteína viral conocida como VPg, mientras que sus extremos 3' están poliadenilados. Posterior a la traducción VP1 despliega una configuración de 90 dímeros que conforman la cápside viral, en la que también se encuentran algunas copias de VP2. La función de VP2 se asocia con la regulación río arriba de la expresión de VP1 en cis y la estabilización de VP1 en la estructura viral (20). Actualmente se conoce que los NV murinos (NVM) cuentan con un cuarto ORF el cual codifica para un factor de virulencia VF1 (virulence factor 1) (21, 22, 23).



**Figura 1. Composición y ciclo replicativo de NV.** En la parte superior de la figura se muestra la composición genómica de NV conformada por tres marcos abiertos de lectura los cuales codifican una poliproteína conformada por 6 proteínas no estructurales, y las proteínas de cápside VP1 y VP2. El genoma es encapsulado en una cápside conformada por VP1 y VP2. La cápside se ancla a la célula a través de interacciones entre VP1 y los grupos de antígeno HBGA (Etapa 1), se internaliza y desensambla en el interior de la célula para ser traducido en el citoplasma del hospedero (Etapa 2 y 3). El RNA (+) es transcrito y traducido en el citoplasma de hospedero. Esta traducción es mediada por la maquinaria de traducción celular reclutada

por la VPg viral, la cual a su vez se une covalentemente al extremo 5' del RNA viral de polaridad negativa (Etapa 4). La poliproteína codificada por el ORF1 es escindida post-traduccionalmente por la proteasa viral (NS6) en las proteínas p48, NTPasa, p22, VPg, Pro y RdRp. Durante la replicación genómica el RNA (+) es transcrito en RNA (-) el cual es utilizado como templado para la síntesis del nuevo RNA genómico y subgenómico (Etapa 6). Durante la encapsidación (Etapa 7) el genoma es empaquetado en nuevos viriones, los cuales son liberados de la célula infectada (Etapa 8). Imagen adaptada de “Human norovirus transmission and evolution in a changing world” (24).

## 2.5 Modelos de replicación de Norovirus

La investigación de los virus frecuentemente está asociada al uso de un modelo de cultivo *in vitro* el cual proporcione las herramientas moleculares que el virus necesita para su replicación, facilitando de esta forma el análisis de sus interacciones con las células hospederas. A lo largo de la historia se han realizado numerosas investigaciones centradas en el desarrollo de un sistema de replicación para este virus. Si bien aún no se logra obtener un modelo comercial robusto de replicación de NV en células de origen humano, los esfuerzos de muchos científicos han dado frutos.

Actualmente es bien conocido el tropismo que tiene NV por células dendríticas y macrófagos. En un estudio epidemiológico realizado a pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) se observó una marcada disminución en la carga viral obtenida de pacientes infectados en comparación con personas no infectadas con VIH L (25). Por otro lado, en el año 2004 se identificó la replicación del norovirus murino (MNV por sus siglas en inglés) en líneas celulares de macrófagos RAW 264.7 y J774A.1 (26). Recientemente fue reportada la replicación de NVH en enteroides humanos, esto a partir de biopsias de yeyuno cultivadas en una matriz de Matrigel y adicionadas con medio de diferenciación, así como con bilis de diferentes especies; esta investigación también reveló



la replicación de NV en enterocitos (27). A pesar de ser un hallazgo altamente relevante en el campo de estudio de NV, al momento continúa siendo una estrategia costosa e impráctica.

## **2.6 Mecanismos Moleculares de Patogenia y Estrés Oxidativo**

Debido a las dificultades antes descritas en lo referente al modelo de cultivo y estudio de los NV, las características patogénicas propias de este virus actualmente se encuentran pobremente descritas. Por otra parte, algunas alteraciones celulares relacionadas con la patogénesis de otros RNA virus son llevadas a cabo en vías celulares tales como el estrés oxidativo, lo cual deriva en gran parte por la explotación de la membrana del RE rugoso para generar el complejo de replicación viral como es el caso del NV (28).

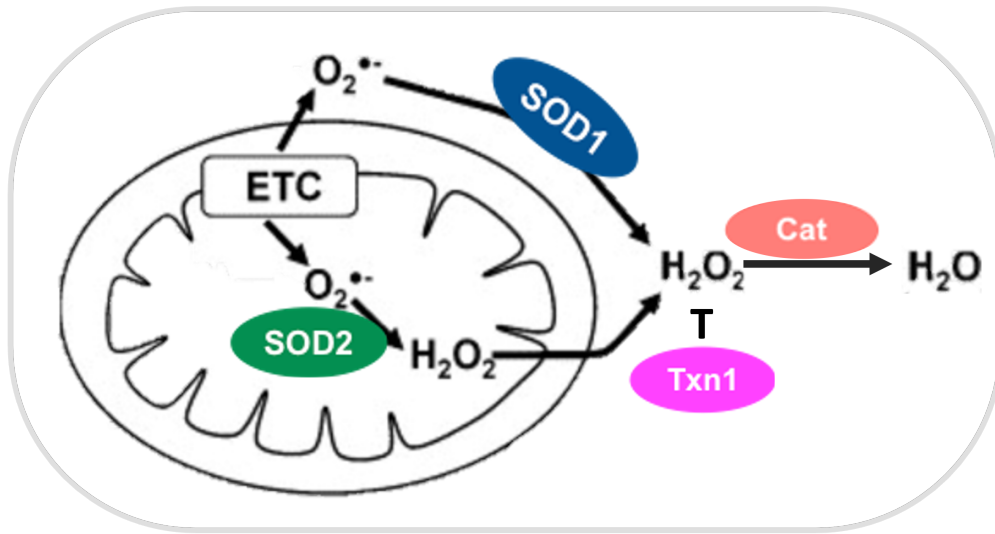
El estrés oxidativo es causado por un desbalance en el estado de óxido- reducción de las células ocasionado por radicales libres conformados por oxígeno también llamados especies reactivas de oxígeno (ROS). El oxígeno molecular tiene la habilidad de formar radicales libres los cuales son especies reactivas de oxígeno que tienen electrones disponibles en su capa externa. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) incluyen el anión superóxido ( $O_2^-$ ) que es transformado a peróxido ( $H_2O_2$ ) a través de la reacción catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD-1, SOD-2); a su vez el  $H_2O_2$  podría interactuar con metales de transición tales como el hierro y el cobre para formar radicales hidroxilo (OH $\cdot$ ). Por otra parte, el sistema tiorredoxina participa en la reducción de grupos tiol (29) (Figura 2).

Las ROS son normalmente generadas por el metabolismo celular y a concentraciones bajas o moderadas juegan papeles fisiológicos incluyendo la respuesta celular a agentes infecciosos, señalización celular, inducción de la respuesta mitogénica, neurotransmisión,

regulación de la presión sanguínea, relajación del músculo liso y regulación del sistema inmune. El estrés oxidativo ocurre cuando la producción de ROS y otras especies reactivas sobrepasan la capacidad de las defensas celulares antioxidantes para desintoxicar estas especies potencialmente dañinas. Este desbalance redox puede ser producido a través de un incremento en la generación de ROS y decremento en moléculas antioxidantes.

En consecuencia, los efectos dañinos de este desbalance son representados por el daño oxidativo a proteínas, lípidos y DNA. Por otra parte, una excesiva cantidad de ROS puede estar ligada a la patogénesis del cáncer, enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis, hipertensión, isquemia, diabetes mellitus, enfermedades neurodegenerativas, artritis reumatoide, enfermedades pulmonares y envejecimiento (30). Además, se sugiere que el estrés oxidativo está involucrado en la patogénesis de enfermedades infecciosas causadas por virus, en donde existen evidencias de que algunos patógenos virales fomentan un incremento en el estrés oxidativo, el estrés de retículo endoplásmico (RE) e inflamación mediante el incremento de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) llevando a la acumulación tóxica de ROS dentro del RE y la mitocondria (31).

En el caso de NV la participación del estrés oxidativo en los mecanismos de patogénesis virales no se encuentran descritos por lo que su estudio podría proporcionar información valiosa para el desarrollo de novedosas estrategias terapéuticas con el objetivo de interferir en la infección viral.



**Figura 2. Sistemas antioxidantes intracelulares.**

## 2.7 Diagnóstico Molecular

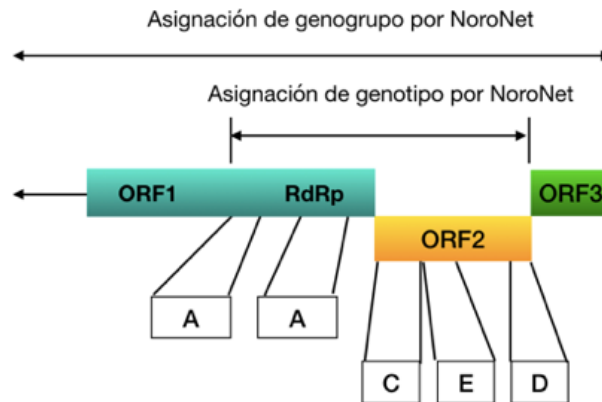
El diagnóstico y clasificación oportuna de NV es de gran importancia ya que su naturaleza infecciosa lo convierte en un potencial iniciador de brotes epidémicos por lo que su identificación representa un papel clave en el refuerzo de medidas sanitarias. Algunos de los principales métodos de diagnóstico utilizados actualmente se describen en la Tabla 1.

Prueba de laboratorio	Ventaja	Desventaja	Tiempo	Liberado por FDA	Mercado
<b>Microscopía electrónica</b>	Detecta múltiples patógenos	Equipo costoso y entrenamiento; bajo rendimiento; insensibilidad	15 min		Laboratorios de referencia
<b>Inmunológicos</b>					
Inmunoensayo enzimático	Alta especificidad y rendimiento	57-76% sensibilidad	60-90min	R-Biopharm	Salud pública, laboratorios clínicos
Inmunocromatográfico	Alta especificidad, no requiere equipo especializado. Una sola muestra	35-52% sensibilidad	15min	En proceso	Punto de cuidado
<b>Molecular</b>					

RT-PCR	Los amplicones pueden ser usados para genotipificación	Resultados deben ser confirmados por secuenciación o hibridación	5-6ha		Laboratorios de referencia
qRT-PCR	Alta especificidad, sensibilidad y rendimiento; posibilidad de múltiples blancos	Requiere equipo de PCR; especificidad clínica reducida	3ha		Salud pública, laboratorios clínicos
<b>Patógeno entérico múltiple molecular</b>					
xTAG GPP	Alta sensibilidad, rendimiento; detecta 11 patógenos enteritos	Equipo costoso y kit	5ha	Luminex corporation	Salud pública, laboratorios clínicos
Panel Film array GI; prueba de patógenos entéricos Verigene	Incluye extracción de ácidos nucleicos, detecta 23 (FilmArray) y 9 (Verigene) patógenos entéricos; una sola muestra	Equipo costoso y kit	2h	Biofire Diagnostics Inc.; Nanosphere Inc.; pruebas de otras compañías pendiente de aprobación	Laboratorios clínicos

**Tabla 1. Descripción general de ensayos de laboratorio para detección de NV. Adaptada de “Advances in Laboratory Methods for Detection and Typing of Norovirus” (17).  
a Sin extracción de ácido nucleico.**

El principal método de diagnóstico utilizado actualmente es la RT-PCR o su variante qRT-PCR por su alta especificidad y sensibilidad. Los genes amplificados son RdRp y/o VP1; la secuencia que contiene ambos genes se divide en 4 regiones llamadas región A (gen RdRp localizado en ORF1), región B (región terminal 3' de ORF1), región C (un pequeño tramo cerca de la región 5' de ORF2), región D (ubicada en la región terminal de 3' de ORF2).



**Figura 3. Regiones utilizadas en la identificación de NV. Adaptada de NoroNet (33).**

Por otra parte, el incremento en los brotes por NV aunado a la falta de una metodología oficial de reporte de nuevas cepas ha llevado a la creación de diversas plataformas virtuales como NoroNet y CaliciNet. NoroNet fue lanzada en el 2008 en Holanda por el Instituto Nacional de Salud Pública y Medio Ambiente de Holanda, mientras que CaliciNet fue creada en 2009 por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades de Estados Unidos de América (EUA) (34). Ambas organizaciones ofrecen una vía de comunicación y difusión para profesionales académicos o relacionados a la salud pública y especializados en este virus. Estas plataformas proporcionan una base de datos, reporte de brotes y nomenclatura para clasificar NV, sin embargo, la principal diferencia entre ellas es que CaliciNet está dirigido solo a EUA y tiene laboratorios de referencia certificados y que utilizan protocolos estandarizados.

Los laboratorios integrados a CaliciNet implementan la tipificación dual a través de la amplificación en un solo paso de RdRp y VP1, incluyendo en dicha amplificación el sitio de unión de ambos genes, esto con el fin de demostrar que ambos genes pertenecen a una misma cepa viral ya que dentro de una muestra se puede identificar más de una cepa. Aunado a esto

tanto CaliciNet como NoroNet han implementado la nomenclatura dual para caracterizar por separado los genes RdRp y el VP1, utilizando los amplicones de las regiones antes mencionadas, esto con el fin de identificar nuevas cepas que hayan sufrido recombinación, además de facilitar la identificación de NV en muestras con cepas heterogéneas.

La nomenclatura recomendada por NoroNet debe ser escrita de la siguiente manera:

organismo/	norovirus GI, norovirus GII, etc.
hospedero/	Abreviación de especie, p.ej. Hu, Bo,Po.
Código de país (ISO)/P.ej. FR, DE, US, MX, tec	
Año de muestreo/	
Genogrupo y genotipo/ (ORF1 y VP1)	GII.P4_GII.4; o GII.4 si solo se conoce la secuencia de ORF2
Variante	
Nombre	Ciudad, si es necesario seguida por un numero seriado
Número	

Ejemplos:

Norovirus GII/Hu/FR/2004/GII.Pg\_GII.1/Paris23

Norovirus GII/Hu/GB/2010/GII.P4\_GII.4\_NewOrleans2009/London48

O si solo se conoce la secuencia de cápside:

Norovirus GII/Hu/FR/2004/GII.12/Paris25.

## **2.8 Clasificación filogenética de Norovirus**

La correcta clasificación filogenética proporciona información sobre el comportamiento de un organismo, en el caso de las cepas virales puede ayudar a identificar cambios en sus patrones de replicación y recombinación. Una metodología para el análisis filogenético es la distancia de pares; este tipo de análisis compara dos secuencias alineadas y construye una matriz de posibles pares de secuencias. Durante cada comparación, el número de cambios

son contados y presentados como una proporción de toda la secuencia; esta consideración final de las diferencias entre todas las posibles pares de secuencias es conocida como distancia de pares.

La clasificación filogenética recientemente implementada por CaliciNet parte del método de la distancia de pares sin corregir utilizando la secuencia aminoacídica completa de VP1. Las diferencias de rangos son de 45.0 - 61.4% para genogrupos, 14.3 - 43.8% para agrupamientos genéticos y 0 - 14% para cepas dentro de un agrupamiento. Un nuevo grupo debe tener una diferencia entre 15 - 45% de distancia de pares. Las cepas con distancias por debajo de este rango deben ser incluidas en el mismo grupo. Las cepas con distancias por encima de este rango representan diferentes o nuevos genogrupos.

Por otra parte, la CDC ha definido algunos términos filogenéticos para NV. El término “agrupamiento genético” representa una unidad de clasificación mínima que consiste en cepas que se agrupan juntas de manera reproducible en una rama distinta del árbol filogenético y son suficientemente cercanas en sus secuencias aminoacídicas o nucleotídicas para diferenciar de cepas que no pertenecen a ese grupo. Los agrupamientos son llamados usando la abreviación del genogrupo, seguida por los números consecutivos en el orden de la publicación de la “cepa prototipo” para agrupamientos. El término “cepa de referencia genética” se refiere a la cepa cuya información de la secuencia completa del ORF2 está disponible en el GenBank. La cepa prototipo de un agrupamiento genético se refiere a la primera referencia que fue descrita antes que otras cepas de referencia. Hasta el momento, existen 14 cepas de referencia, de las cuales 8 son conocidas como cepas prototipo. Esta incluye los siguientes virus: Norwalk (NV), Hawái (HV), Snow Mountain (SMV), Jena (JV), Southampton (SOV), Toronto (TV), Desert Shield (DSV) y Bristol (BV) (23).

Año	Primera publicación basada en	Método Molecular
1972	ME o MEI <b>Norwalk virus (NV)</b>	
1977	<b>Hawái virus (HV)</b>	
1982	<b>Snow Mountain Virus (SMV)</b>	
1987	<b>Jena Virus (JV)</b>	
1990		<b>Norwalk virus (NV)</b>
1992	SRSV-KY89/89/Jpn (KY89)	
1992	SRSV-OTH25/89/Jpn (OTH25)	
1993		<b>Southampton virus (SOV)</b>
1994		<b>Toronto virus (TV)</b>
1994		<b>Hawái Virus (HV)</b>
1994		SRSV-KY89/89/Jpn (KY89)
1994		SRSV-OTH25/89/Jpn (OTH25)
1994		<b>Dessert shield virus (DSV)</b>
1994		<b>Bristol virus (BV)</b>
1995		Lordsdale virus (LV)
1995		México virus (MX)
1995		Melksham virus (MK)
1996		Camberwell (CAV)
1997		<b>Snow Mountain Virus (SMV)</b>
1999		<b>Jena Virus (JV)</b>

**Tabla 2. Cepas genéticas de referencia identificadas por microscopía electrónica (ME), inmuno-microscopía electrónica (MEI) o métodos moleculares por año de publicación. NOTA: Las negritas se refieren a 8 cepas conocidas como cepas prototipo que representan agrupamientos individuales. Números de acceso del GenBank: NV, M87661; HV, U07611; SMV, L23831; JV, AJ011099; KY89, L23828; OTH25, L23830; SOV, L07418; TV, U02030; DSV, U04469; BV, X76716; LV, X86557; MXV, U22498, MKV, X81879; CAV, AF145896. SRSV= small round structured virus. Adaptada de “Genetic Classification of “Norwalk-like Viruses” (23).**

Por otra parte, en el año 2013 los investigadores del “Norovirus Classification Working Group” (NCWG) propusieron una nomenclatura universal estandarizada y un sistema de tipificación y genotipificación de GI y GII utilizando el agrupamiento filogenético de las secuencias aminoacídicas completas de VP1 con el fin de unificar la comunicación epidemiológica de NV; sin embargo el incremento del uso de las nuevas tecnologías de secuenciación masiva permitieron una actualización de dicha clasificación en el año 2019. La nueva clasificación se basó en los criterios previamente acordados referentes a la genotipificación dual ORF1 – (RdRp=P-tipo) y ORF2 (genotipo), principalmente debido a que la mayoría de los puntos de recombinación de NV han sido encontrados en estas dos regiones genómicas, basada en la secuencia aminoacídica completa de ORF2, así como la agrupación de las secuencias nucleotídicas de la región parcial de RdRp en polimerasa (P)-grupo y P-tipo independientemente de la clasificación de su



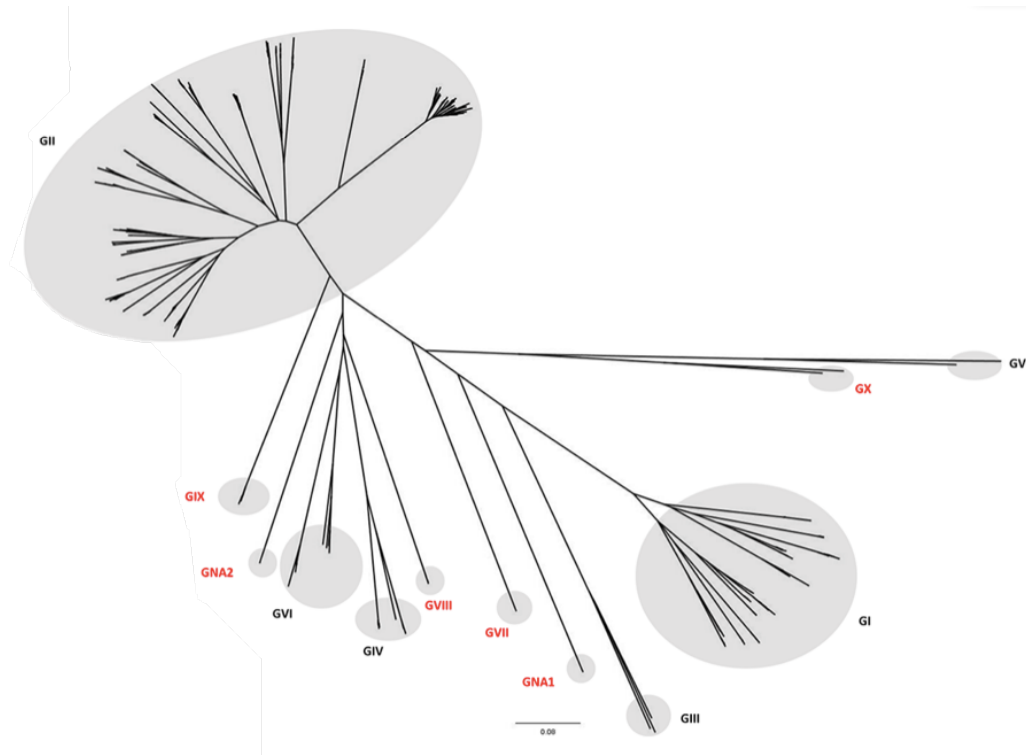
correspondiente genogrupo y genotipo de cápside, esto con el fin de eliminar secuencias huérfanas de ORF1 (35).

En el caso de la clasificación de la VP1 actualmente se han confirmado 10 genogrupos (GI – GX) los cuales han sido identificados en diferentes especies: GI en humano; GII en humano y porcino; GIII en bovino; GIV en humano, felino y canino; GV en murino; GVI en canino,

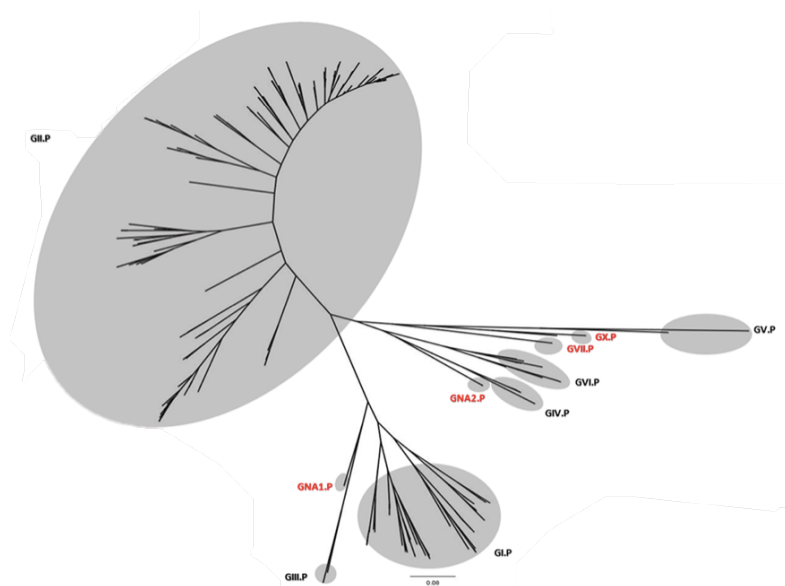
GVII en canino, GVIII en humano GIX en humano (reclasificado de GII.15) y GX (murciélago) y dos nuevos genogrupos tentativos: GNA1 marsopa común y GNA2 león marino. Para obtener la agrupación de secuencias se utilizó un criterio de  $2 \times sd$ , en donde al menos dos secuencias por agrupamiento o cluster fueron requeridas para calcular la desviación estándar para la distancia de agrupamientos (35) (Figura 4).

Por otra parte, la clasificación de las secuencias nucleotídicas de RdRp ofrece ocho genogrupos confirmados (GI.P, GII.P, GIII.P, GIV.P, GV.P, GVI.P, GVII.P y GX.P) P-grupos y dos tentativos (GNA1.P y GNA2.P). Las secuencias de los virus GI pueden ser divididas en 14 P-tipos y 4 tentativos P-tipos con una secuencia disponible o múltiples cepas de la misma ubicación geográfica. A su vez las secuencias de los virus GII pueden ser separadas en 37 P-tipos (GII.P1- GII.P8, GII.P11-GII.P13, GII.P15-GII.P18, GII.P20-GII.P41) y 9 P-tipos tentativos. Los virus GIII se dividen en GIII.P1-P2; GIV en GIV.P1; GV en GV.P1 y GV.P2; GVI en GVI.P1-P2; GVII en GVII.P1 y GX en GX.P1. Las secuencias de RdRp de los virus GVIII y GIX que se agrupaban con GII se asignaron como GII.P28 y GII.P15 (35) (Figura 5).

De manera conjunta actualmente se identifican diez genogrupos de NV por cápside y 49 genotipos basados en la secuencia aminoacídica completa de VP1 y 60 P-tipos confirmados basados en las secuencias nucleotídicas parciales de RdRp (35).



**Figura 4. Clasificación filogenética de NV basada en la secuencia aminoacídica de VP1 en 10 genogrupos y 2 genogrupos no asignados. Imagen obtenida de “Updated classification of norovirus genogroups and genotypes” (35).**



**Figura 5. Árbol filogenético de secuencias parciales (762 nucleótidos de 3'-ORF1) de RdRp de genogrupos de NV. Imagen obtenida de “Updated classification of norovirus genogroups and genotypes” (35)**

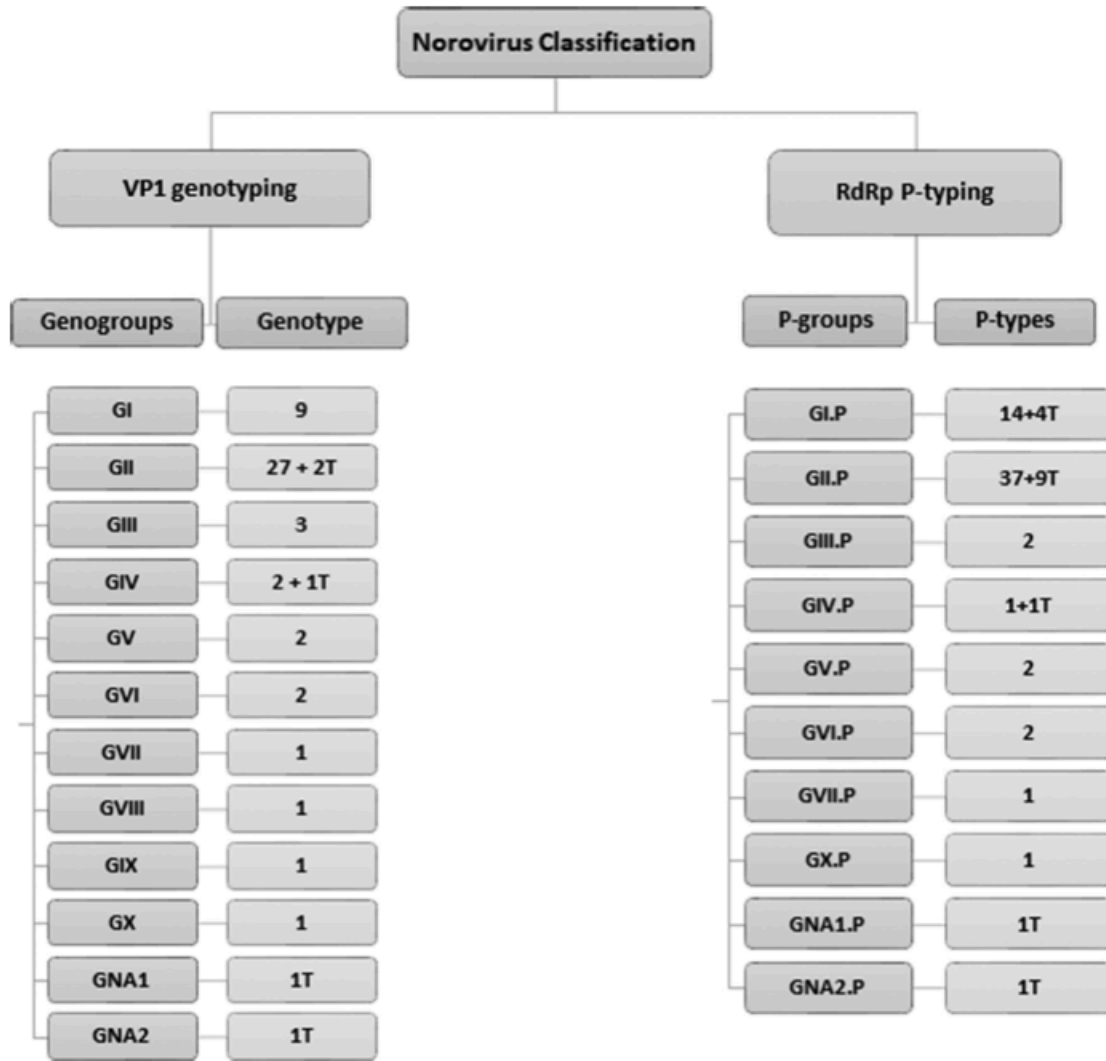
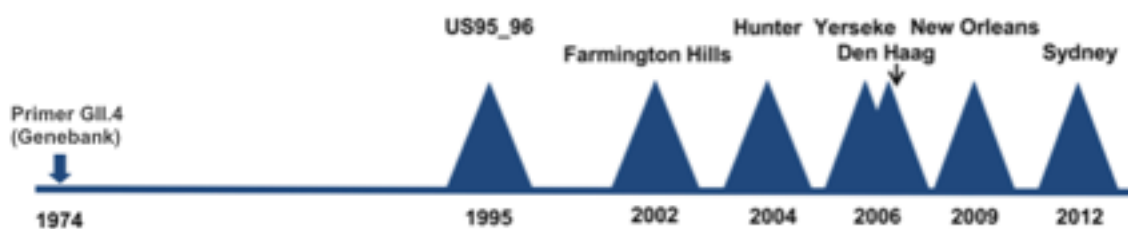


Figura 6. Clasificación actualizada de NV con el número de genogrupos y genotipos basados en los aminoácidos de VP1 y el número de P-grupos y P-tipos basada en la región parcial (762 nucleótidos) de la polimerasa dependiente de RNA (RdRp) en 5' de ORF1. P=P-grupo, T=genotipo tentativo/P-tipo. Imagen obtenida de “Updated classification of norovirus genogroups and genotypes” (35)

## 2.9 Brotes epidemiológicos

A pesar de la extensa diversidad genética entre los NV que infectan humanos GII es el genogrupos mayormente asociado a brotes epidemiológicos tanto en Latinoamérica como a nivel mundial encontrándose en más del 75% de los casos de GEA. Si bien GII cuenta con diversos genotipos, el genotipo GII.4 se ha mantenido mayormente en circulación durante

las pasadas dos décadas (35) y se encuentra asociado al 37 - 100% de los casos de GEA ocasionada por NV. En un estudio de NV en pacientes pediátricos se encontró que GII estaba asociado al 96% de los casos, mientras que el genotipo GII.4 estaba asociada al 70% de todos los casos de GEA causada por NV; en contraste, la mayoría de las infecciones asintomáticas fueron causadas por cepas diferentes a GII.4 (36), este último es el responsable de la mayoría de los brotes por NV mundialmente. Debido a que este virus tiene una evolución relacionada directamente con la inmunidad poblacional, han emergido nuevas variantes pandémicas de GII.4 cada 2 a 3 años desde mediados de 1990, reemplazando cepas de GII.4 previamente predominantes, pero no otras cepas endémicas. Estas variantes globales de GII.4 incluyen la cepa GII.4 US95/96 en 1995, GII.4 Hunter en 2004, GII.4 Den Haag en 2006, GII.4 New Orleans en 2009 y GII.4 Sydney en 2012. Estas nuevas variantes de GII.4 son frecuentemente, pero no siempre, asociadas con un incremento en el número de brotes. En EUA, GII.4 Sydney causó la mayoría de los brotes de NV durante la temporada del 2013 a 2014 (17).



**Figura 7. Variantes de NV GII con distribución global y la primera temporada en la que emergieron. Nuevas variantes emergen cada 2 a 3 años aproximadamente y reemplazan a las cepas previamente predominantes. Esto incluye a US95\_96 en 1995, Farmington Hills en 2002, Hunter en 2002, Yerseke en 2006, Den Haag en 2006, New Orleans en 2009 y Sydney en 2012. Adaptada de “Advances in Laboratory Methods for Detection and Typing of Norovirus” (17).**

En cuanto a la seroprevalencia, existen pocos estudios disponibles que confirman que la exposición a NV es muy común en Latinoamérica, con hasta 77% de la población expuesta a GI.1 y hasta 57% a GII.3, aun no se reporta la seroprevalencia para el principal genogrupo circulante en la actualidad GII.4. (15). Por otra parte, un estudio en Holanda comparando suero de pacientes infectados en los años 1963, 1983 y 2006/2007 reportó un incremento del 0 al 58.5% de seroprevalencia de GII.4 entre los años 1963 y 2007 (37).

Cohorte	GI.1		GI.2		GI.6		GI.8		GII.3		GII.4		GII.9		GIV.1		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
1963	2	6.3	10	31.3	5	15.6	2	6.3	1	3.1	0	0.0	4	12.5	8	25.0	32	100
1983	2	6.5	4	12.9	1	3.2	3	9.7	1	3.2	6	19.4	14	45.2	0	0.0	31	100
2006/2007	3	3.2	16	17.0	0	0.0	1	1.1	9	9.6	55	58.5	6	6.4	4	4.3	94	100

**Figura 8. Distribución de genotipos en sueros positivos con respuesta a un solo antígeno. Adaptado de “Comparison of norovirus genogroup I, II and IV seroprevalence among children in the Netherlands, 1963, 1983 and 2006” (37).**

## 2.10 Norovirus en México

En nuestro país se han realizado diversos proyectos de investigación relacionada a NV, siendo uno de los principales intereses la inocuidad alimentaria. Un estudio realizado en la Ciudad de México evaluó la contaminación alimentaria por virus entéricos en muestras de vegetales frescas y congeladas además de ostras. De 134 muestras analizadas 14 fueron positivas para el virus de la hepatitis A (HAV), 6 para NV y 11 para RV, revelando así la susceptibilidad de la transmisión por medio de la ingestión de estos precederos que generalmente se consumen sin previa cocción. (38). Otro equipo de trabajo analizó la carga patogénica del agua de las cascadas Bassaseachic en el estado de Chihuahua en el año 2013. Utilizando qRT-PCR detectaron virus de RNA encontrando la mayor cantidad de NV y RV en los meses de octubre y marzo respectivamente, identificando NV GII (39).

Por otra parte, el análisis epidemiológico poblacional es de suma importancia en la estimación del nivel de penetración de un agente patológico como NV. En los años 1998 a 2000 se realizó un estudio en niños menores de 5 años con diarrea aguda admitidos en 3 hospitales de la Ciudad de México, se colectaron las heces y se analizó la presencia de conocidos agentes bacterianos, parasitarios y virales causales de GEA. 396 de 1,129 muestras (36%) fueron negativas para los microorganismos analizados. Estas muestras fueron posteriormente amplificadas con primers para Calicivirus humanos (CVH) encontrando 19 muestras positivas por NV GII. (40). Sumando información a la epidemiología de NV en México en los años 2005 a 2006, se realizó un estudio que abarcó 14 estados de la república (Chihuahua, Nuevo León, Tamaulipas, Nayarit, Colima, Michoacán, Ciudad de México, Hidalgo, Puebla, Veracruz, Chiapas, Campeche, Yucatán y Quintana Roo) analizando heces de niños menores a 5 años para la determinación de CVH y genotipificando las muestras positivas por medio de secuenciación utilizando RdRp o VP1. De un total de 414 muestras obtenidas, 131 fueron positivas para CVH (32%), dentro de las cuales 72 fueron secuenciadas utilizando los primers para RdRp mientras que a través de los primers para VP1 se genotipificaron 46 (41).

Recientemente en un estudio de muestras de heces diarreicas colectadas durante los años 2013 y 2014 con un total de 100 muestras de las cuales 62 eran de niños y 38 de adultos, se encontró NV en un 77% del total de las muestras, identificando los siguientes genotipos para RdRp: GII.P2, GII.P31, GII.P4, GII.P7, GII.P40, y GI.P14 y para VP1 GI.3, GII.2, GII.4, GII.5, GII.14 y GII.17 (42). A su vez, en un estudio realizado en pacientes hospitalizados en el Hospital Universitario de la UANL analizó 240 muestras de heces diarreicas colectadas en

los años 2016 al 2017 encontrando una frecuencia de NV del 28.6%, encontrando además co-infecciones con bacterias y parásitos (43).

### 3. JUSTIFICACIÓN

El impacto en la salud pública y en la economía derivado de brotes epidemiológicos causados por NV, han posicionado al Norovirus como uno de los virus entéricos más importantes que afectan a la población mundial. En México, las enfermedades gastrointestinales en niños son el 2º lugar de muertes. A pesar de que hay algunos estudios epidemiológicos que han evaluado la presencia de este virus, aún no se ha reportado un estudio de detección de cepas circulantes específico para Monterrey y su área metropolitana.

Además, el estudio de los mecanismos moleculares con los que NV logra su estrategia de replicación y patogénesis están aún inconclusos debido a la falta de un modelo de replicación de NV en líneas celulares humanas. La investigación de las interacciones entre las proteínas virales y las proteínas de la célula hospedera podrían ser evaluadas través del modelo de NVM en células Raw264.7

Es por esto, que el análisis de secuencias genéticas de las cepas circulantes de NVH en México permitirá ampliar el conocimiento de la filogenia de este virus. Además, el estudio de Norovirus a través del modelo de MNV en células Raw264.7 *in vitro* beneficiará a la elucidación de los mecanismos moleculares de la patogénesis viral.



## 4. HIPÓTESIS

- Los Norovirus humanos en circulación en la población de Monterrey y el área metropolitana son diferentes a los reportados en México y el resto del mundo.
- El Norovirus murino induce estrés oxidativo en células Raw264.7.

## **5. OBJETIVO**

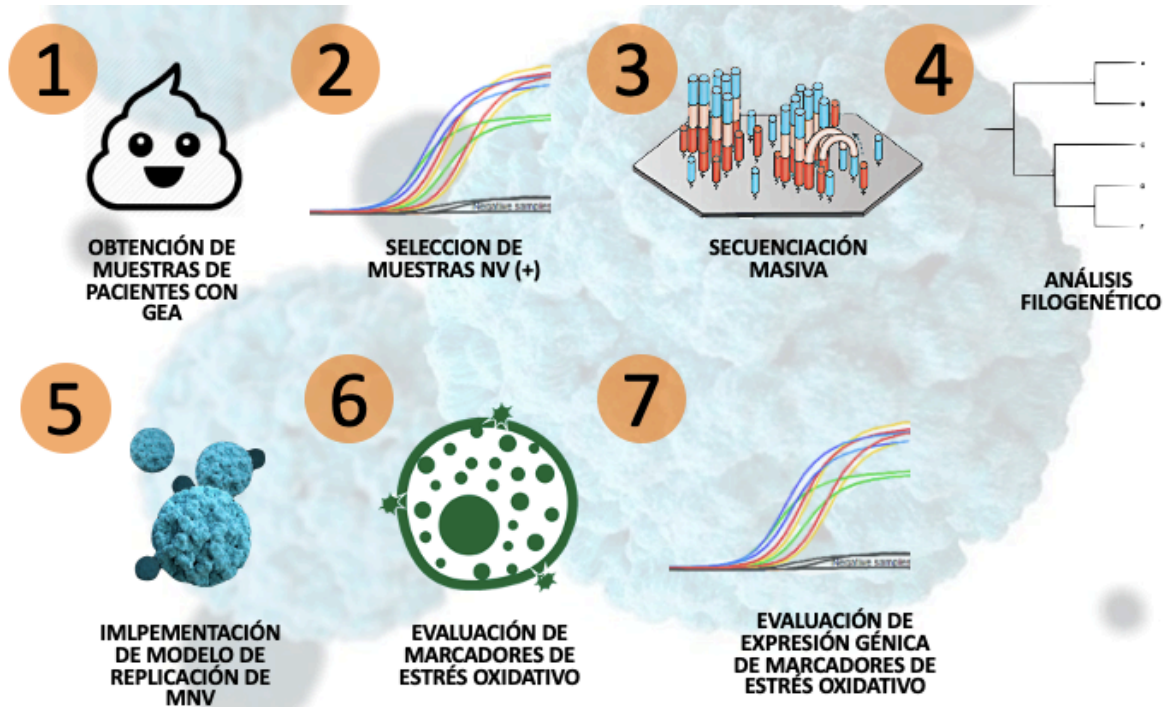
### **OBJETIVO GENERAL**

Identificar y secuenciar el genoma completo de cepas circulantes de NVH en pacientes infectados en México y estudiar la relación del estrés oxidativo con los mecanismos de patogénesis de Norovirus.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Detectar y secuenciar genomas circulantes de NVH en el Hospital Universitario.
2. Realizar análisis filogenético de los NVH circulantes en el Hospital Universitario.
3. Establecer el modelo de estudio de NVM en la línea celular Raw264.7 *in vitro*.
4. Evaluar la relación entre los mecanismos moleculares de estrés oxidativo y la patogénesis inducida por NVM en la línea celular Raw264.7 *in vitro*.

## 6. ESTRATEGIA GENERAL



En el presente estudio se planteó una estrategia experimental general que consistió en las siguientes actividades: obtención de muestras fecales diarreicas de pacientes con EDA (1), evaluación y selección de muestras positivas a Norovirus GI y GII por qPCR dúplex (2), preparación del RNA viral para llevar a cabo la secuenciación en masa utilizando un DNAs sintético (3) y análisis bioinformático metagenómico y filogenético de las secuencias obtenidas (4); así mismo para la evaluación de mecanismo moleculares de patogenia de la infección se implementó un modelo de cultivo de MNV en las células susceptibles y permisivas Raw264.7 (5) mediante el cual se evaluaron marcadores de estrés oxidativo como peróxidos totales, anión superóxido mitocondrial (6), así como la evaluación de la expresión génica de genes participantes en sistemas celulares antioxidantes tales como SOD-1, SOD-2, Cat y Trx.

## **7. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **7.1 Línea celular**

Se utilizó la línea celular Raw 264.7 (ATCC® TIB-71™) de macrófagos murinos transformados con el virus de la leucemia murina de Abelson donada por el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.

### **7.2 Reactivos para cultivo celular**

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco, EUA)
- Suero fetal bovino (SFB) 10%
- Glutamina 200mM (100X) al 2X
- Penicilina-estreptomicina 100X al 1%
- Aminoácidos no esenciales (AANES) al 1%
- HEPES 1M al 1% (US Biological)
- Dimetil sulfóxido (DMSO) al 10%

### **7.3 Virus**

Se utilizó la cepa de CW1 de Norovirus murino (MNV) (ATCC, EUA) donado por el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.

### **7.4 Equipos y otros reactivos**

- Campana de flujo laminar clase II, tipo A2 (Nuair)
- Incubadora con 5% de CO<sub>2</sub>, y 37°C de temperatura (Nuair)
- Baño de agua
- Microscopio invertido (Olympus CKX41)
- Vórtex (Vortex-gene 2 Scientific Industries)
- Centrífuga refrigerada Heraeus (Osterode, Alemania)

- Minicentrífuga (Centrifuge Eppendorf 5415D)
- Lector de placas (Synergy HT, BioTek)
- Cámara de Neubauer.
- Ultracongelador (Thermo Scientific, EUA).
- Termociclador 7500 fast (Applied BioSystem, EUA)
- TRIzol (Invitrogene, EUA)
- Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, EUA).
- Secuenciador masivo MySeq (Illumina, EUA)
- Raspadores celulares (Corning, EUA)
- Botellas de cultivo de 25cm<sup>2</sup> y 75cm<sup>2</sup> (Corning, EUA)
- Placas para cultivo celular de 6, 12 y 96 pozos para cultivo adherible (Corning, EUA)
- Tubos falcon de 15 y 50 mL (Corning, EUA)
- Tubos Eppendorf de 0.2, 0.6 y 1 mL
- Tubos Falcon de 15 y 50 mL (Corning, EUA)
- Pipetas serológicas de 5 y 10 mL (Corning, EUA)
- Puntas plásticas desechables
- Azul de tripano al 0.4 % (Gibco, Invitrogen, EUA)
- TRIzol (Life Technologies, EUA)
- Cloroformo (Sigma)
- Isopropanol (Sigma)
- Cell Proliferation Kit I (MTT) (MERCK, EUA)

## **7.5 Recepción de muestra fecal.**

En el presente proyecto se obtuvieron muestras fecales mediante la colaboración con el Servicio de Infectología del Hospital Universitario, el Laboratorio de Bacteriología del Departamento de Patología Clínica del Hospital Universitario y el Departamento de Pediatría del Hospital Universitario, en donde se capturaron pacientes de todas las edades que acudieron a consulta por GEA. A estos pacientes, así como a sus responsables legales se les dio conocer la posibilidad de participar en el proyecto PI18-00121 y se les brindó el beneficio de ser notificados en el caso de encontrar muestras positivas para NVH; los derechos de los pacientes, así como la privacidad de su información personal fueron respetados en todo momento de acuerdo con las normas de bio-seguridad del Hospital Universitario. Los pacientes proporcionaron una muestra fecal recolectada en un recipiente estéril de 62mL proporcionado durante la consulta.

Para la selección de dichas muestras se utilizaron los siguientes criterios:

-Inclusión:

- 1) Sujetos de todas las edades que asistan a consulta en el área de Urgencias o Pediatría debido a GEA.
- 2) Muestras de heces diarreicas con un grado Bristol de 5 a 7.
- 3) Consentimiento informado verbalmente.

-Eliminación:

- 1) Muestra insuficiente o con material genético degradado
- 2) Muestras duplicadas
- 3) Historial clínico no disponible en el Hospital Universitario.

## **7.6 Manipulación de muestras fecales.**

Las muestras fueron conservadas a 4°C y transportadas en un contenedor con refrigerantes hacia en el Laboratorio de Infectología Molecular localizado en el Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la UANL ubicada en Zapopan 1023A-C, Monterrey, N.L., así como en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de los Microorganismos del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL ubicada en Av. Pedro de Alba s/n cruz con Manuel L. Barragán, Monterrey, N.L.; ya en dichas instalaciones las muestras fueron refrigeradas a -80°C con el fin de preservar el material genético de los agentes patógenos a investigar, el cual puede ser lábil a mayores temperaturas.

## **7.7 Obtención de RNA y cDNA**

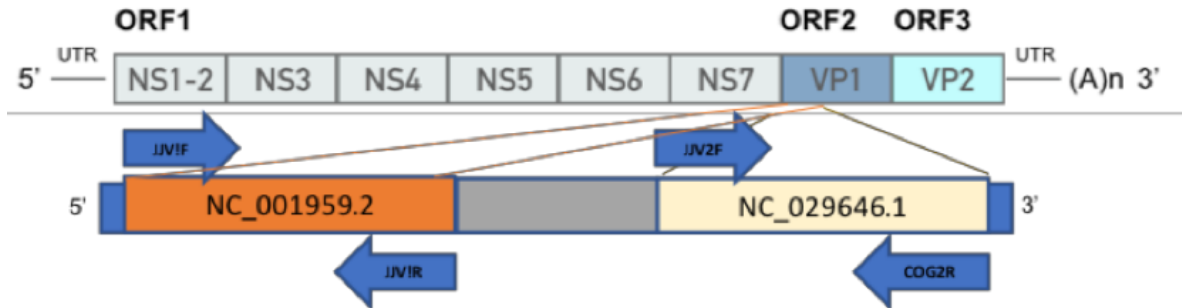
Se llevó a cabo el análisis de las heces para determinar la presencia del NVH; para este propósito se llevó a cabo una dilución al 10% v/v de las muestras utilizando como solvente PBS estéril. La solución obtenida fue clarificada por centrifugación a 13,000 rpm durante 5 minutos; se tomaron 500µL de la solución clarificada y se le realizó una extracción de RNA mediante columnas con membrana de sílice de la marca QIAamp viral mini (QIAGEN). El RNA obtenido fue cuantificado por medio de un equipo NanoDrop y posteriormente se llevó a cabo una reacción de retro transcripción utilizando la enzima MMLV (Invitrogen) y random primers.

## 7.8 Estandarización de qPCR dúplex para detección de NVH GI y GII

El cDNA obtenido fue posteriormente analizado mediante una qPCR dúplex para la detección del NVH GI y GII utilizando la polimersa MyTaq DNA Polymerase (BioLine), así como las secuencias cebadoras y sondas siguientes para GI: GCC ATG TTC CGI TGG ATG, TCC TTA GAC GCC ATC ATC AT, JJV1P FAM-TGT GGA CAG GAG ATC GCA ATC ; y GII: CAA GAG TCA ATG TTT AGG TGG ATG AG, TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA y CY5-TGG GAG GGC GAT CGC AAT CT-RQS (44). Debido a que esta metodología fue estandarizada en este proyecto, fue necesario diseñar un control positivo a partir de DNA sintético (Gblock) para la detección de NV GI y GII, utilizando amplicones de las secuencias de los siguientes genomas de referencia de NV NC\_001959.2 y NC\_029646.1 (45) utilizando los iniciadores mencionados. Dicho control positivo fue utilizado para establecer una curva estándar que permitió determinar el umbral de detección de la qPCR dúplex utilizando 0.0256fg, 0.128fg, 0.64fg, 3.2fg, 16fg, 80fg, 400fg, 2000fg, además se estimó el equivalente de copias virales en relación con el peso del DNA sintético (Figura7) utilizando la siguiente fórmula.

$$\text{Número de copias} = \frac{X \text{ ng} * 6.0221 \times 10^{23} \text{ moléculas /mol}}{(N*660\text{g/mol}) * 1 \times 10^9 \text{ ng/g}}$$





**Figura 9. Diseño de control Positivo (G-block) para qPCR dúplex para detección de GI y GII.**

G-block (ng)	No. De Copias
1.25	408000000
0.25	81600000
0.05	16320000
0.01	3264000
0.002	652800
0.0004	130560
0.00008	26112
0.000016	5222.4
0.0000032	1044.48
0.00000064	208.896
1.28E-07	41.7792
2.56E-08	8.35584

**Figura 10. Estimación de número de copias equivalentes a ng de control positivo (G-block).**

## 7.9 Secuenciación del genoma completo

Se llevó a cabo la secuenciación del genoma viral completo a partir del RNA viral extraído de las muestras positivas para NVH. Para esto se trataron los RNA obtenidos de las muestras fecales con la enzima DNAsa I (QIAGEN) incubando por 15 minutos a temperatura ambiente seguido de la inactivación por calor mediante su incubación a 65°C por 10 minutos. Posteriormente se realizó una reacción de retro-transcripción utilizando la enzima polimerasa Super Script VILO (Invitrogen) y random primers de acuerdo con las indicaciones del

fabricante, utilizando el máximo volumen posible de RNA por reacción, posteriormente se sintetizó la segunda hebra de DNA (DNAs) de las muestras a través del kit comercial Second Strand cDNA Synthesis Kit dNTP based (ABM). Después se llevó a cabo la cuantificación del DNA de doble hebra (dsDNA) por fluorometría utilizando el equipo Qubit V3.0 (ThermoFisher) y preparando las muestras de acuerdo con el protocolo del reactivo Qubit dsDNA HS (High Sensitivity) (ThermoFisher). Se evaluó la presencia de las secuencias de NV GI y GII en el DNA de doble hebra obtenido sintéticamente con el fin de validar dicho material genético.

A continuación, las muestras fueron secuenciadas en el Laboratorio de Servicios Genómicos del UGA-LANGEBIO perteneciente al CINVESTAV, utilizando la técnica de secuenciación por puenteo en la plataforma NextSeq de Illumina, así en una celda de 2 x 150 ciclos. Las bibliotecas analizadas se generaron mediante el estuche Nextera XT (46). Después, las secuencias obtenidas fueron ensambladas en el programa Genome Detective (Emweb bv)

### **7.10 Análisis metagenómico y filogenético viral**

Las secuencias obtenidas fueron evaluadas en el servidor web Genome con el fin de realizar un análisis metagenómico con la finalidad de identificar la presencia de otros virus o microorganismo presentes en las muestras con NV; así mismo se llevó a cabo un análisis filogenético de las secuencias ORF1 y ORF2 de NVH GI y GII mediante el alineamiento múltiple con las secuencias encontradas en Genbank utilizando el servidor web Genome, permitiendo además la genotipificación dual de NVH. Posteriormente se realizó la reconstrucción filogenética de los genomas virales circulantes mediante el método de máxima similitud utilizando el programa IQtree por el modelo TIM3+F+G4 con 1000 réplicas.

## **7.11 Cultivo celular**

Se utilizó la línea celular Raw264.7 permisiva y susceptible a la replicación de la cepa viral de MNV. Para su mantenimiento se utilizó medio de cultivo DMEM completo, compuesto por medio DMEM suplementado con L-glutamina (200 mM, 100X), SFB 10X, antibiótico (100 UI/mL de penicilina G sódica y 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina), AANES (10 mM, 100X) y la solución amortiguadora de CO<sub>2</sub> HEPES (1M, 1X). Las células fueron incubadas a 37°C en una atmósfera húmeda con un 5% de CO<sub>2</sub>. El pasaje celular fue realizado por raspado utilizando un raspador de células (47).

Las células fueron cultivadas en las condiciones descritas, alcanzando una confluencia de 90-95%, posteriormente fueron desprendidas por raspado y recuperadas adicionando medio DMEM completo. La suspensión celular fue diluida (1:8) con medio de cultivo y azul de tripano, para contar las células en la cámara de Neubauer. Se sembraron las células según el experimento a realizar.

Aunado a esto, se realizó un stock de la línea celular Raw264.7, las células al 90% de confluencia fueron recuperadas células de una caja de 75cm<sup>2</sup> de confluencia al 90% y se ajustaron a ~1,000,000 células/ml. Se colocó un mililitro de la suspensión celular colocando en crioviales con 5% de DMSO y 10% de SFB e inmediatamente fueron transferidas a un contenedor para congelación con isopropanol y congeladas a -80°C para finalmente ser criopreservadas en un tanque de nitrógeno.

## **7.12 Propagación viral**

Las células Raw264.7 al 70-80% de confluencia fueron infectadas con el virus MNV el cual fue agregado directamente en el medio y mezclado con suavidad, posteriormente se incubó

a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> por 40 a 48 horas. Después se realizó una observación celular microscópicamente con el fin de confirmar el efecto citopático característico de la infección por MNV, el cual consiste en el redondeamiento, desprendimiento o lisis celular para de esta forma corroborar la infección viral. El sobrenadante y células adheridas fueron recuperadas y sometidas a 2 ciclos de congelación a -80°C y descongelación a 37°C en un baño de agua (47). A su vez esta metodología fue repetida en dos botellas de cultivo de 75cm<sup>2</sup> y finalmente el lisado celular fue centrifugado a 13,000 x g por 3 minutos para eliminar detritos y contenido celular, mientras que el sobrenadante conteniendo el virus MNV fue alicuotado en volúmenes de 50µL y 100µL y almacenado a -80°C.

### **7.13 Titulación viral**

-TCID<sub>50</sub>.

Se colocaron 25 µl del virus en el primer pozo de una placa de micro titulación de 96 pozos, y se realizaron diluciones 1 a 10<sub>7</sub>, transfiriendo 25 µl sucesivamente hasta completar la serie de diluciones (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-8</sup>) por triplicado. Posteriormente de una caja de cultivo celular de 75cm<sup>2</sup> con una confluencia de 80-100% se agregaron 9 ml de medio por cada mililitro de suspensión celular y se transfirieron 100 µl de esta suspensión a los pocillos en una nueva placa de micro titulación y se transfirieron 50 µl de cada dilución por triplicado, se incubo a 37°C por 3 a 5 días (47). Se observó el efecto citopático en cada pozo y los valores de TCID<sub>50</sub> fueron calculados con las siguientes formulas, se tomó la dilución a la cual al menos el 50% de los pozos fueron infectados:

$$\text{Distancia Proporcional (-PD)} = \frac{(\% \text{ positivas igual o mayor al } 50\% - 50\%)}{(\% \text{ positivas igual o mayor al } 50\%) - (\% \text{ positivas menor al } 50\%)}$$

Donde -PD es la distancia proporcional entre dos diluciones que dan un porcentaje de infección si es por mayor o menor al 50% de efecto citopático.

$$\log \text{TCID}_{50} = (\log \text{ dilución igual o mayor a } 50\%) + (-\text{PD})$$

Posteriormente se obtiene a partir de -PD el Log TCID<sub>50</sub>:

$$\text{TCID}_{50}/\text{mL} = (1/10^{\log \text{TCID}_{50}}) / \text{Factor de dilución}$$

### **-Ensayo de Unidades Formadoras de Placas (PFUs)**

Se sembró una densidad celular de  $1 \times 10^6$  células/ml de Raw 264.7 en una placa de 6 pozos, agregando 2 ml de la suspensión por cada pozo, se incubó a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> hasta lograr una confluencia del 60-80%. Posterior a esto se preparó el inóculo viral, donde, a partir del virus previamente producido se realizaron diluciones en serie de diez veces en una placa de 24 pozos, adicionando 1.35 ml de medio y mezclando inicialmente 0.15 ml del virus y así sucesivamente hasta lograr la serie de diluciones. Se retiró el medio contenido en la placa de 6 pozos para agregar 0.5 ml de la dilución, adicionando una dilución típica de  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ , se incubó por 1 hora a temperatura ambiente homogenizando cada 10 minutos para prevenir el secado de las células y permitir la absorción viral. El cálculo de la titulación viral se determinó multiplicando el factor de dilución (1 ml por dos pozos infectados con 0.5ml) sumando el número de unidades formadoras de placa del duplicado (48).

#### **7.14 Preparación de agarosa de bajo punto de fusión y visualización con tinción de azul de naftol.**

La agarosa se preparó al 1%, manteniendo una relación de 3g por cada 100 ml de agua destilada (3% p/v). Después de su esterilización se equilibró en baño maría a 42°C antes de su uso. Una vez terminada la hora de incubación se adicionó medio suplementado en relación 1:1 a la solución de agarosa para posteriormente retirar el medio conteniendo la dilución viral en la placa de 6 pozos y agregar 2 ml por pozo de la suspensión equilibrada de agarosa /medio. Se incubaron las placas por 48 horas, 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Una vez pasado el tiempo de incubación y confirmación de la formación de placas, se preparó una solución de azul de naftol agregando 3 ml por cada 97 ml de PBS. Se agregaron 2 ml de esta solución por cada pozo, permitiendo la visualización después de una hora de incubación a 37°C. El cálculo del título viral se realizó sumando el número de placas formadas en una misma dilución observadas al microscopio y multiplicándolo por el factor de dilución, es decir, 1 ml en 2 pozos que fueron infectados con 0.5 ml (48).

#### **7.15 Ensayo de viabilidad de células Raw264.7 infectadas con MNV.**

Se llevó a cabo la infección por adsorción de 0.001, 0.01, 0.1, 1 y 10 MOIs de MNV utilizando la metodología de infección perteneciente al ensayo de formación de placa. Posteriormente se incubaron a diferentes tiempos 12, 24, 36 y 48 horas en las condiciones previamente descritas. La viabilidad celular fue determinada mediante el estuche comercial de MTT (Sigma) (49).

### **7.16 Determinación de Peróxidos Totales.**

La producción de peróxidos totales se comprobó por la fluorescencia emitida por la diclorofluoresceína (DCFH) en presencia de peróxidos. Para este ensayo se sembraron  $1 \times 10^4$  células en placas negras de 96 pozos las cuales fueron tratadas al día siguiente con 0.1 y 1 MOI por 12, 24 y 36 horas, adicionalmente se evaluó el tratamiento con peróxido de hidrógeno  $5 \mu\text{M}$ ,  $50 \mu\text{M}$ ,  $500 \mu\text{M}$  y  $5\text{mM}$  por 36 horas utilizado como control positivo de la reacción con DCFH. Al término del tratamiento se agregó  $1 \mu\text{L}$  de DCFH-DA [ $5 \text{mM}$ ] y se incubó durante 30 min en oscuridad (50). Inmediatamente se determinó la fluorescencia de la DCFH usando un lector multimodal de microplacas Synergy HT BioTek; a  $529 \text{nm}/503 \text{nm}$  (emisión/excitación).

### **7.17 Determinación de Anión Superóxido Mitocondrial.**

La producción de especies reactivas de oxígeno se comprobó a través de la tinción de anión superóxido utilizando el reactivo MitoSox que es un indicador de anión superóxido mitocondrial. Para este ensayo se sembraron  $1.5 \times 10^5$  células sobre cubreobjetos redondos en placas de 24 pozos, las cuales fueron tratadas al día siguiente con 1 y 10 MOI por 3, 6 y 24 horas, adicionalmente se evaluó el tratamiento con el reactivo rotenona  $250\text{nM}$  3, 6 y 24 horas utilizado como control positivo de la producción de anión superóxido. Al término del tratamiento se agregó el reactivo MitoSox [ $5 \text{mM}$ ] y se incubó durante 30 minutos en oscuridad a  $37^\circ\text{C}$  (51). Después se recuperaron los cubreobjetos redondos con las células tratadas y fueron montados en portaobjetos utilizando la solución de montaje FluoroMount. Las laminillas fueron preservadas en oscuridad a  $4^\circ\text{C}$  por un día para ser analizadas en el microscopio de fluorescencia con estas características, capturando 5 replicas por cada cubreobjetos. Las micrografías obtenidas fueron analizadas a través del software ImageJ.

### **7.18 Evaluación de la Expresión Génica de Sistemas Antioxidantes.**

Se cultivaron  $1.5 \times 10^5$  células Raw 264.7 en placas de 24 pozos, se incubaron durante una noche y posteriormente fueron infectadas con MNV. Se obtuvieron las células mediante raspado a las 12, 24 y 36 horas post-infección y se realizó la extracción de RNA por medio del método de Trizol. Los precipitados de RNA fueron lavados con etanol al 75%, re-suspendidos en agua libre de RNAsas y posteriormente cuantificados por medio del equipo NanoDrop. Se realizó la retro-transcripción para la síntesis de cDNA. Posteriormente se analizaron 300ng de cDNA de cada replica utilizando SybrGreen a través de qPCR para determinar la expresión relativa de los genes antioxidantes se diseñaron iniciadores para determinar la expresión del RNA maduro de genes SOD-1, SOD-2, Cat y Trx en *Mus musculus*, utilizando las siguientes secuencias SOD-1 F - GAA CCA GTT GTG TTG TCA GGA, R - ACT GGT ACA GCC TTG TGT ATT G; SOD-2 F - GTT ACA ACT CAG GTC GCT CTT, R - GCA ACT CTC CTT TGG GTT CT; Cat F- GTC TCT CCA TCA GGT TTC TTT CT, R- CAA TAG ACT GCC TCT CCA TCT G; Trx F- GCT GAT CGA GAG CAA GGA AG, R- GTC ACA GAG GGA ATG GAA GAA G. Además, se realizó una cuantificación relativa de la expresión génica utilizando el gen endógeno RPS18S como gen normalizador. Todos los experimentos se realizaron utilizando 3 replicas mediante triplicados independientes.

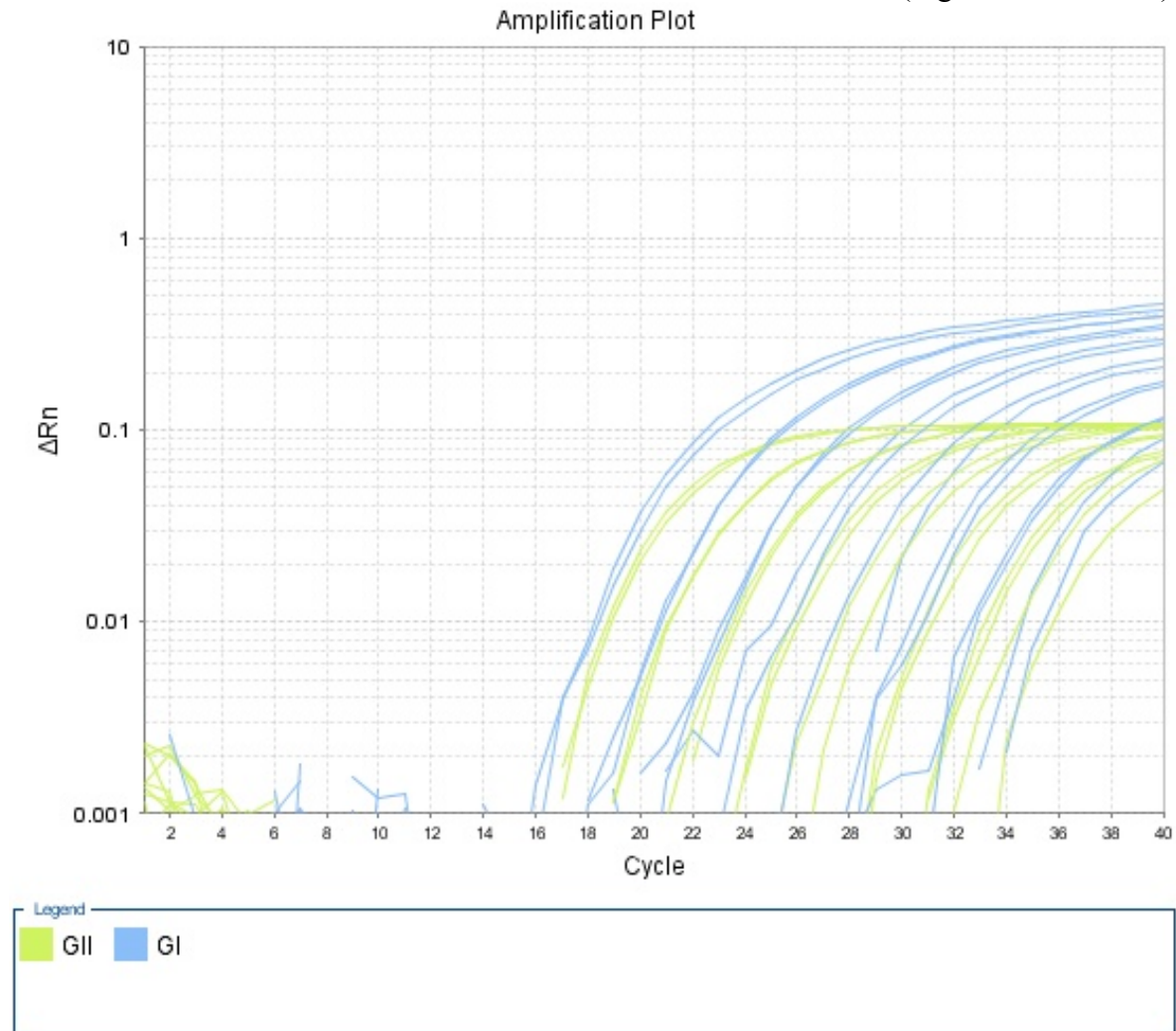
### **7.19 Análisis Estadístico.**

Los experimentos se realizaron al menos 3 veces y cada condición por triplicado. Los resultados fueron evaluados mediante t de Student utilizando el programa SPSS versión 20.0 y considerando una diferencia significativa cuando el valor p resultara menor a 0.05 o 0.01.



## 8. RESULTADOS

En lo que al procesamiento de heces fecales refiere, se llevó a cabo la estandarización de la técnica qPCR dúplex para detección de NVH GI y GII implementada en este proyecto. Mediante el diseño de una curva estándar se estimó un límite bajo de detección de 83.53 copias virales (Figura 11 y 12) con una eficiencia  $r^2$  de 0.9973 en la curva estándar de GI y 0.9969 en la de GII (Figura 13).



**Figura 11. Gráfica de amplificación de la curva estándar qPCR dúplex para detección de NVH GI y GII, de 0.0256fg, 0.128fg, 0.64fg, 3.2fg, 16fg, 80fg, 400fg y 2000fg.**

G-block (ng)	No. De Copias	CT PROMEDIO	
		GI	GII
1.25	408000000	5.435	6.35
0.25	81600000	7.715	7.98
0.05	16320000	10.97	11.155
0.01	3264000	14.265	14.38
0.002	652800	16.57	17.145
0.0004	130560	18.95	19.315
0.00008	26112	21.22	21.785
0.000016	5222.4	23.52	24.03
0.0000032	1044.48	27.11	26.345
0.00000064	208.896	28.53	28.995
1.28E-07	417.792	31.145	31.415
2.56E-08	83.5584	33.7	33.045

Figura 12. Límite bajo de detección de curva estándar de qPCR dúplex para detección de NVH GI y GII.

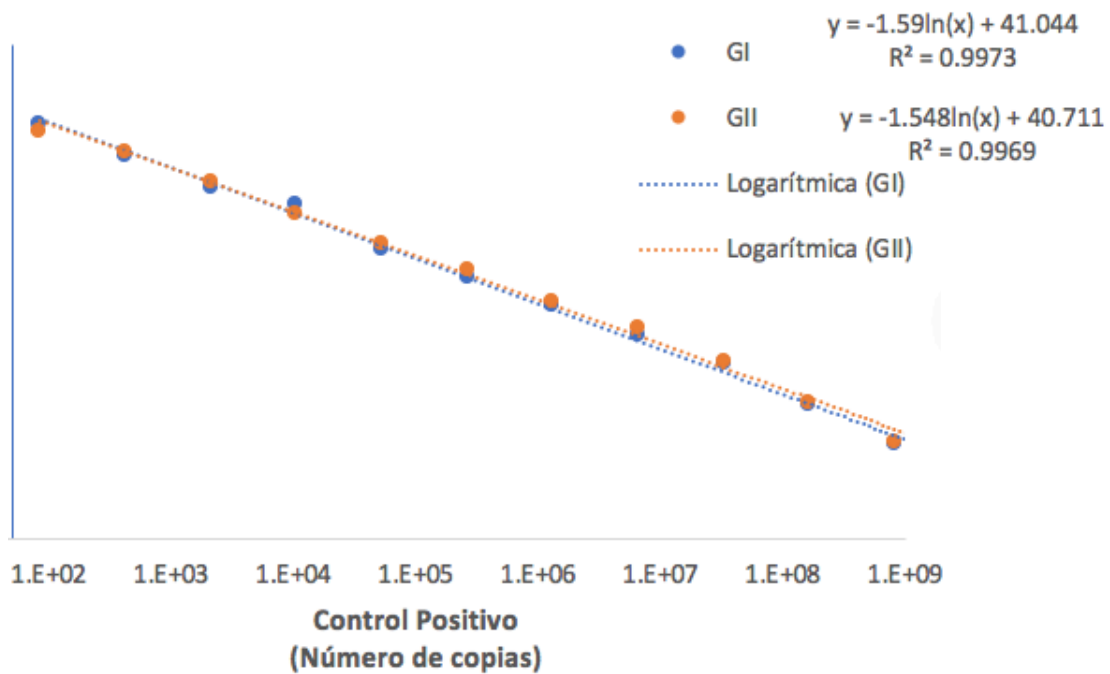
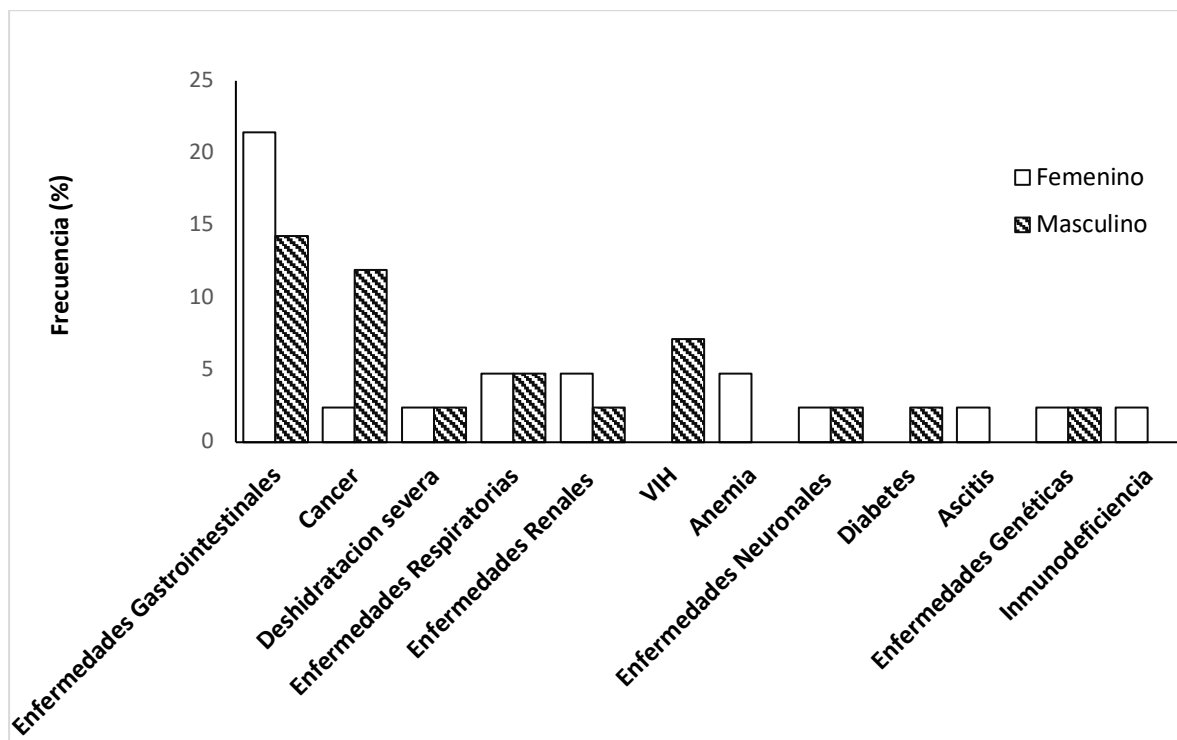


Figura 13. Curva estándar del número de copias del control positivo en la qPCR dúplex para detección de NVH GI y GII.

Durante este proyecto se recabaron 48 muestras de pacientes de las cuales 42 muestras cumplían con los criterios de inclusión y correspondían a pacientes de entre 0 a 82 años de los cuales 50% eran mujeres y 50% hombres. Dichos pacientes mostraban diversos diagnósticos primarios de acuerdo con los datos recabados de su correspondiente historial clínico (Figura 14) siendo el diagnóstico primario más frecuente de origen gastrointestinal, posteriormente cáncer, deshidratación severa, enfermedades respiratorias, enfermedades renales, VIH, anemia, enfermedades neuronales, diabetes, ascitis, enfermedades genéticas e inmunodeficiencias.



**Figura 14. Clasificación de pacientes por diagnóstico primario y sexo.**

La evaluación de la presencia de NVH mediante la metodología por qPCR dúplex, previamente descrita, permitió identificar un total de 19% (8/42) de muestras positivas de las cuales se encontró un total de muestras con NV GI de 7.14% (3/42), GII 9.52% (4/42), GI y GII de 2.38% (1/42) (Tabla 3). La clasificación de muestras por grupos de edades mostró que la mayoría de las muestras positivas 14.28% (6/42) correspondía al grupo de 0-10 años de edad, 4.8% (2/42) al grupo de 11-20 años y 2.4% (1/42) al grupo de 21-30 años, sin embargo, no se encontraron muestras positivas en otros grupos de edad. Además, se identificaron los genogrupos GII en un 50% de las muestras con NVH (4/8), GI 37.5% (3/4) y una co-infección de GI y GII 12.5% (1/8). Cabe señalar que NV se encontró en un 33% (8/18) de las muestras de los pacientes de 0-3 años, correspondiendo 5.6% (1/18) a GI, 22.2% (4/18) a GII y 5.6% (1/18) a una co-infección de GI y GII. Esta evaluación fue implementada con el registro del Laboratorio de Microbiología y se presenta en la siguiente tabla.

Norovirus	Número de Pacientes (n = 42)						
	Grupos por Edad						
	0-10 (n = 18)	11-20 (n = 8)	21-30 (n = 4)	31-40 (n = 2)	41-50 (n = 3)	51-60 (n = 4)	61-82 (n = 3)
<b>Genogrupo</b>							
GI	1	1	1	0	0	0	0
GII	3	1	0	0	0	0	0
GI y GII	1	0	0	0	0	0	0

**Tabla 3. Identificación de NVH GI y GII en muestras fecales diarreicas.**

Posteriormente se llevó a cabo la síntesis de la doble hebra de DNA de las muestras positivas las cuales fueron validadas por fluorometría y qPCR.

<b>Muestra</b>	<b>Qubit ng/μL</b>	<b>Relación 260/230</b>	<b>Relación 260/280</b>	<b>RNA validado</b>
M1	26.9	2.37	1.85	GI
M2	25.9	2.34	1.85	GI
M3	24.0	2.25	1.77	GII
M4	26.8	2.36	1.85	GI
M5	6.85	2.38	1.85	GII
M6	32.7	2.38	1.86	GII
M7	13.8	2.38	1.84	GI
M8	1.76	2.13	1.85	GII

**Tabla 4. Validación de DNA de doble hebra sintético por fluorometría y qPCR.**

Las muestras validadas fueron secuenciadas masivamente encontrando un número adecuado de lecturas o reads (Tabla 5). Posteriormente se llevó a cabo el ensamble de dichas secuencias a través del software Genome Detective en donde se obtuvo una cobertura genómica del 97.8% de NVH GII en la muestra M7 (Figura 15) y 87.6% en la muestra M5 (Figura 17), mientras que para el genoma de NVH GI se ensambló un genoma del 36% de cobertura para la muestra M2 (Figura 16) y 59.3% para a muestra M8 (Figura 18). Además, el análisis filogenético de las secuencias correspondientes a ORF1 y ORF2 de NVH GI y GII permitió identificar los genotipos GII.4/GI.P16 en las muestras M7 (Figura 19), M5 (Figura 20 )y M8 (Figura 21) mientras que GI.P4 en la muestra M2 (Figura 22). A su vez, el análisis filogenético de las muestras secuenciadas no mostro agrupación de las mismas con muestras de igual genotipo previamente reportadas (Figuras 23 y 24), sugiriendo cambios en el genoma de NV GI y GII circulante en México.

2x150 Nextseq		
Reads filt	994,557,732	
% Reads Identificadas (PF)	Reads Identificadas (PF)	Total de Reads
0.0616	61,265	146,767
0.0453	45,053	144,869
0.0546	54,303	188,663
0.0441	43,860	73,480
0.0458	45,551	126,685
0.0503	50,026	124,640
0.062	61,663	189,815
0.0459	45,650	117,800
0.0479	47,639	152,632

**Tabla 5.** Cantidad de lecturas obtenidas durante la secuenciación en masa mediante la plataforma Nextseq utilizando una celda de 2x150 de las muestras evaluadas permitiendo la obtención un rango de lecturas totales de 70, 000 a 189,000 por muestra.

<b>Muestra</b>	<b>M7</b>
Asignación	Norovirus GII
# Contigs	1
# Lecturas	3057
Cobertura (%)	97.8
Profundidad de la Cobertura	48.4
Identidad NT (%)	72.4
Identidad AA (%)	80.9



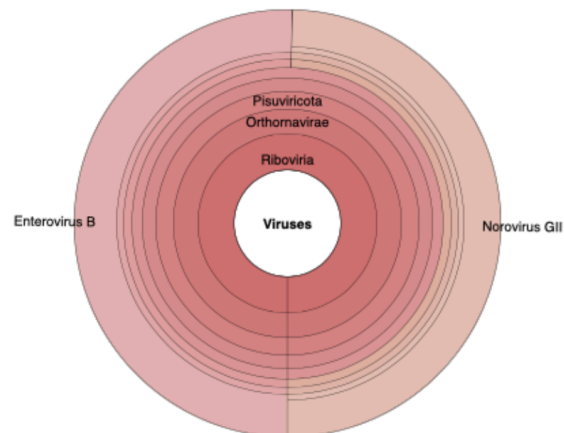
**Figura 15.** Ensamble de genoma de NV GII de la muestra M7, a la izquierda, con una cobertura del 97.8% del genoma obtenida de un contig con 3057 lecturas y una profundidad de 48.4. Análisis metagenómico utilizando el software Genome Detective, a la derecha, identificando la presencia de NV GII además de otros dominios virales como Riboviria, Orthornavirae, Pisuviricota predominantemente.

Muestra	M2
Asignación	Norovirus GI
# Contigs	8
# Lecturas	1238
Cobertura (%)	36
Profundidad de la Cobertura	58
Identidad NT (%)	76.1
Identidad AA (%)	86.1



**Figura 16.** Ensamble de genoma de NV GI de la muestra M2, a la izquierda, con una cobertura del 36% del genoma obtenida de 8 contigs con 1238 lecturas y una profundidad de 58. Análisis metagenómico, a la derecha, identificando la presencia de NV GI además de otros virus como Escherichia Virus DE3, Escherichia Virus Lambda 4A7, Enterobacteria fago O276, Uroviricota, Heunggongvirae, Duplodnaviria, Riboviria, Orthornavirae, Pisuviricota predominantemente.

Muestra	M5
Asignación	Norovirus GII
# Contigs	4
# Lecturas	275
Cobertura (%)	87.6
Profundidad de la Cobertura	4.9
Identidad NT (%)	71.9
Identidad AA (%)	80



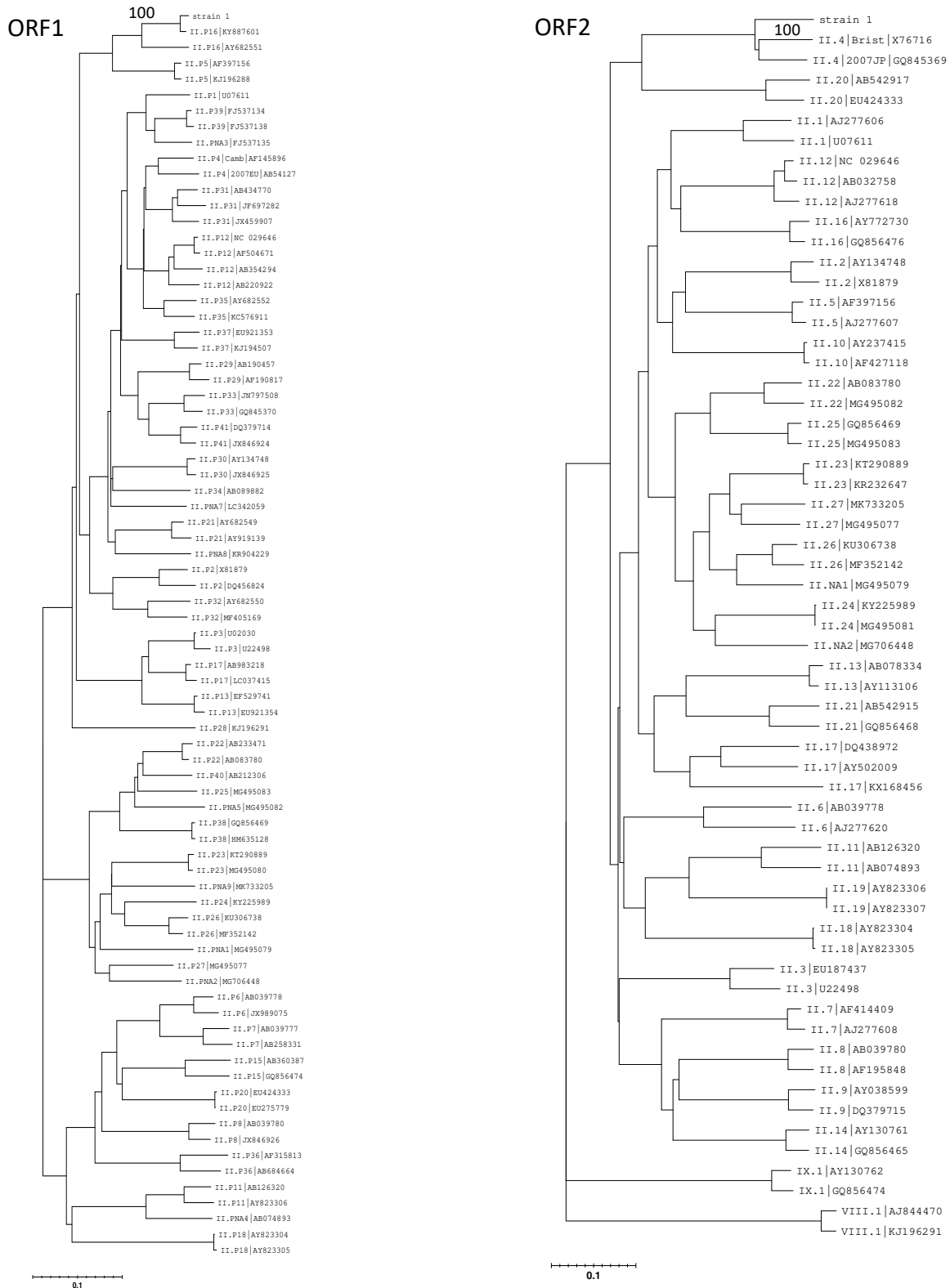
**Figura 17.** Ensamble de genoma de NV GII de la muestra M5, a la izquierda, con una cobertura del 87.6% del genoma obtenida de 4 contigs con 275 lecturas y una profundidad de 4.9. Análisis metagenómico, a la derecha, identificando la presencia de NV GII además de Enterovirus B, y los dominios virales Riboviria, Orthornavirae, Pisuviricota predominantemente.

Muestra	M8
Asignación	Norovirus GII
# Contigs	9
# Lecturas	170
Cobertura (%)	59.3
Profundidad de la Cobertura	4
Identidad NT (%)	72.9
Identidad AA (%)	81.5

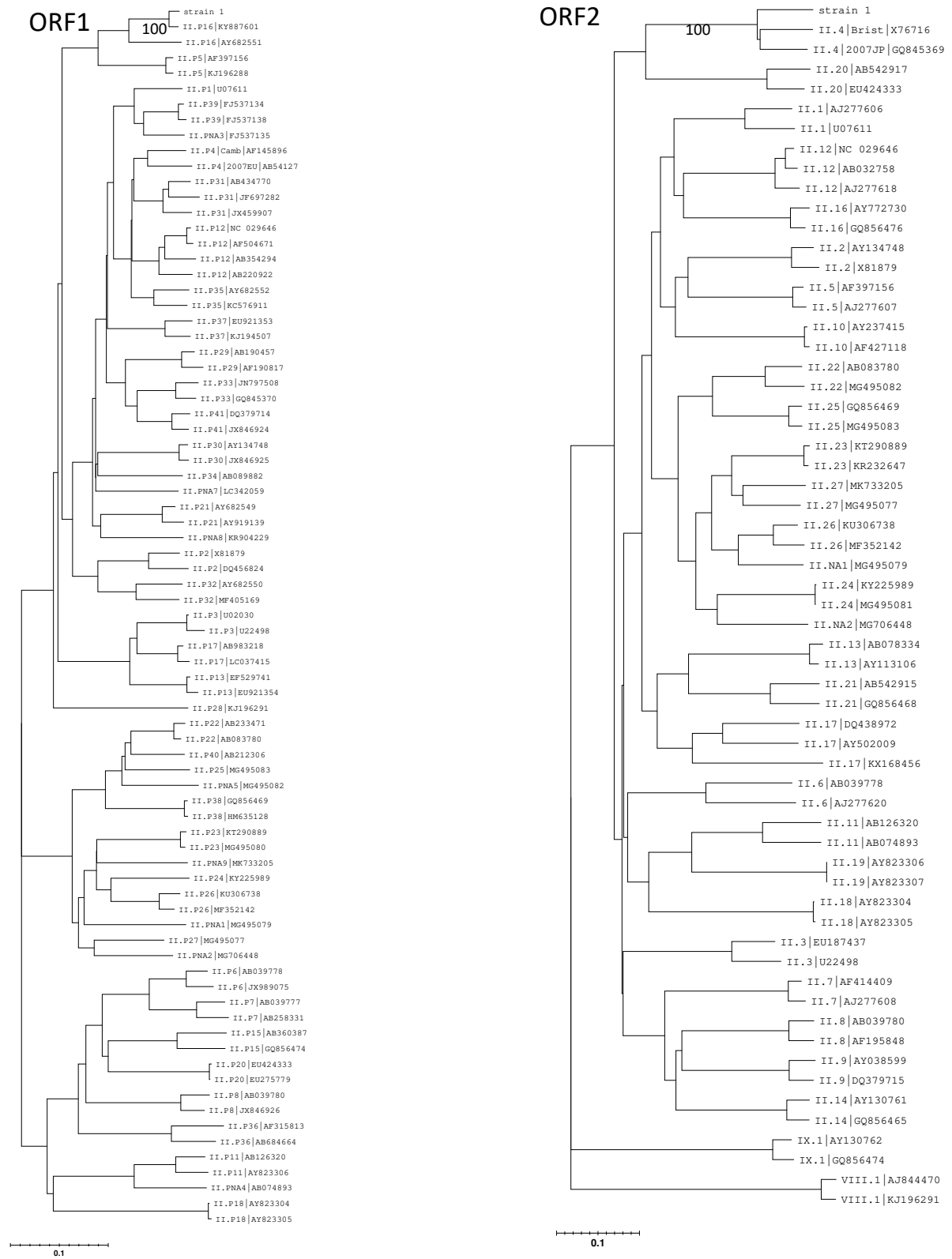


**Figura 18.** Ensamble de genoma de NV GII de la muestra M8, a la izquierda, con una cobertura del 59.3% del genoma obtenida de 9 contigs con 170 lecturas y una profundidad de 4. Análisis metagenómico, a la derecha, identificando la presencia de NV GII además de Escherichia Virus DE3, Enterobacteria fago O276, Uroviricota, Heunggongvirae, Duplodnaviria, Riboviria, Orthornavirae, Pisuviricota predominantemente.



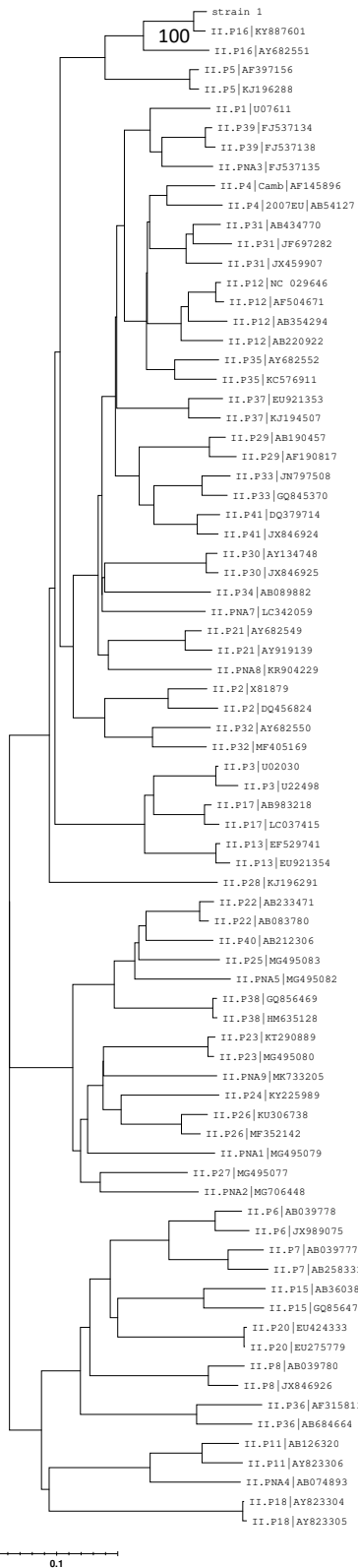


**Figura 19. Reconstrucción filogenética mediante análisis de máxima similitud del ORF1 y ORF2 del genoma de NV GII.4 de la muestra M7 encontrando un soporte de 100 en el ORF1 con el genotipo GII.P16 y con el ORF2 con el genotipo GII.4.**

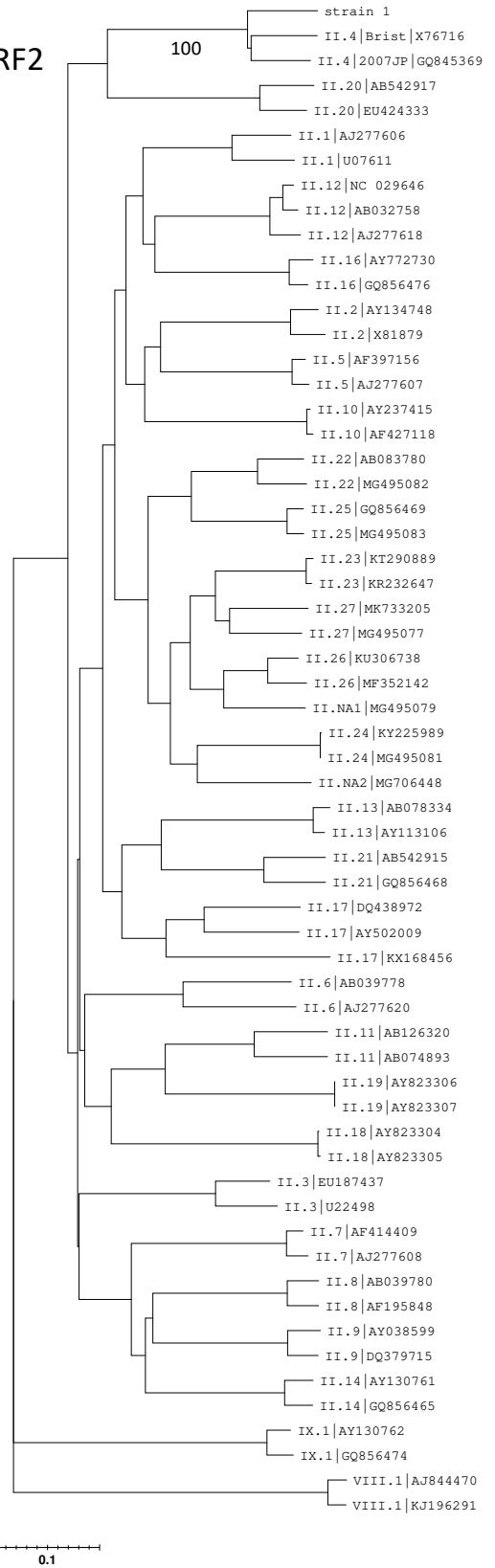


**Figura 20. Reconstrucción filogenética mediante análisis de máxima similitud del ORF1 y ORF2 del genoma de NV GII.4 de la muestra M5 encontrando un soporte de 100 en el ORF1 con el genotipo GII.P16 y con el ORF2 con el genotipo GII.4.**

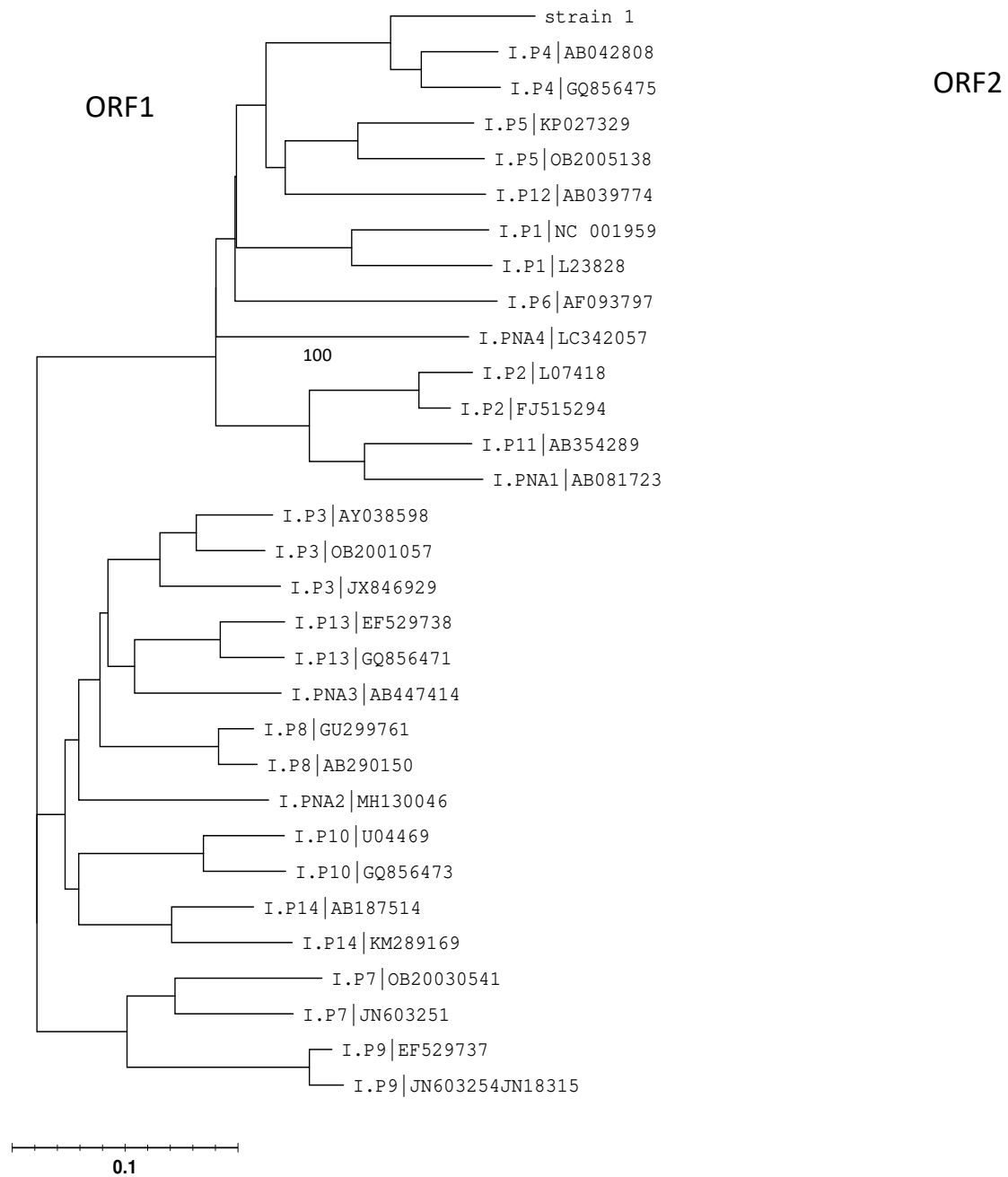
ORF1



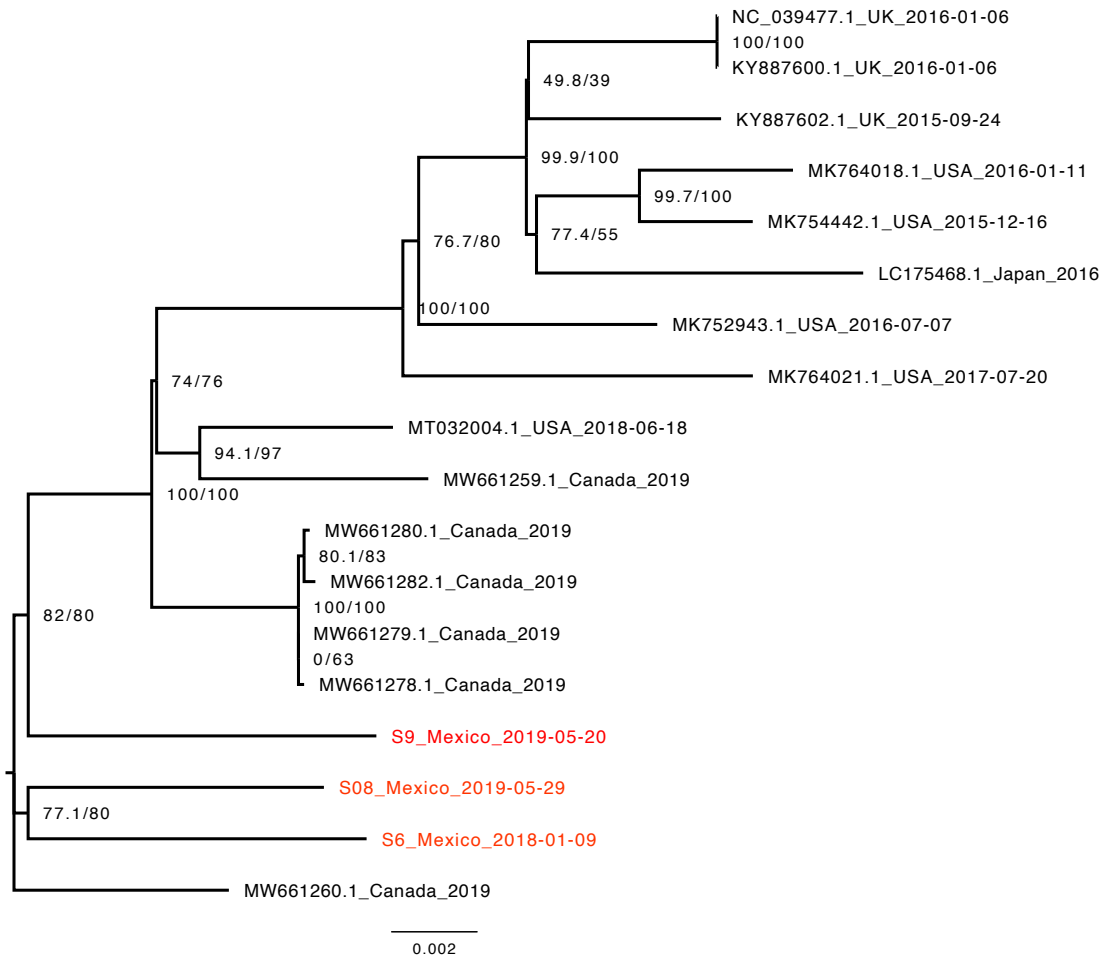
ORF2



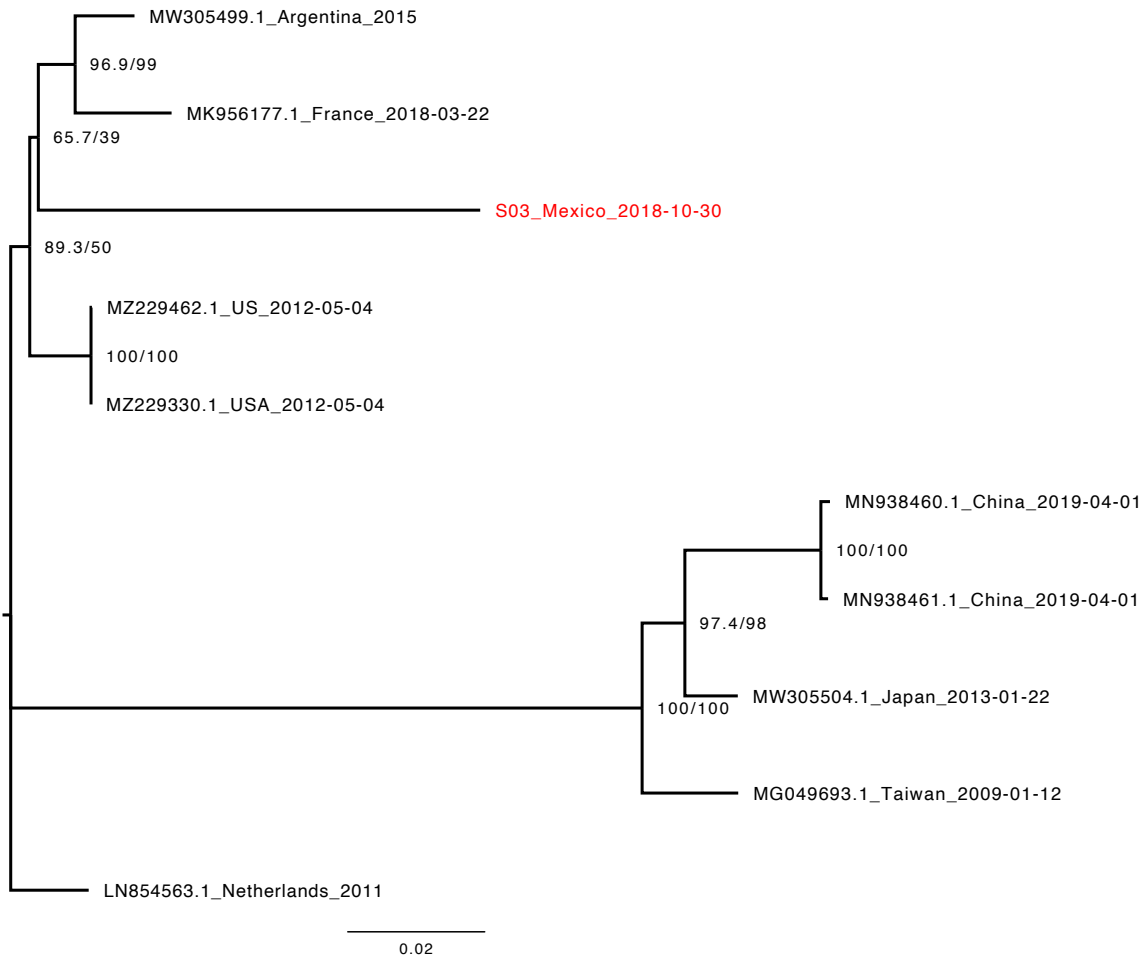
**Figura 21. Reconstrucción filogenética mediante análisis de máxima similitud del ORF1 y ORF2 del genoma de NV GII.4 de la muestra M8 encontrando un soporte de 100 en el ORF1 con el genotipo GII.P16 y con el ORF2 con el genotipo GII.4.**



**Figura 22. Reconstrucción filogenética mediante análisis de máxima similitud del ORF1 y ORF2 del genoma de NV GI de la muestra M2 encontrando un soporte de 100 en el ORF1 con el genotipo GI.P4**



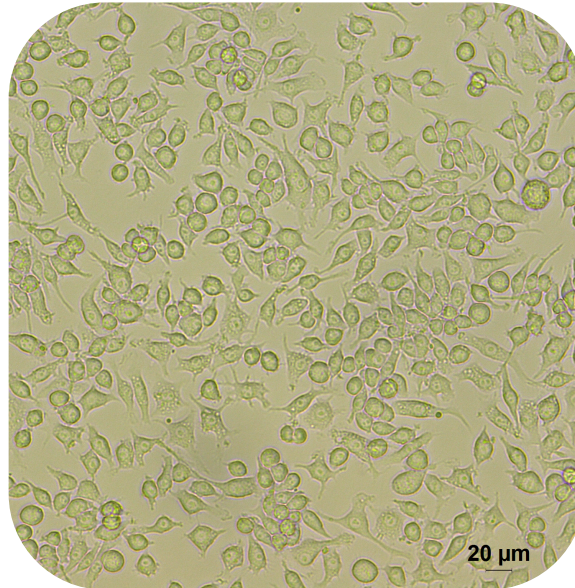
**Figura 23. Reconstrucción filogenética mediante análisis de máxima similitud de las secuencias de genotipo GII.4/GII.P16 encontrado en muestras M7, M5 y M8, las cuales no se relacionaron con otras secuencias de genotipo GII.4/GII.P16 previamente publicadas en Genbank.**



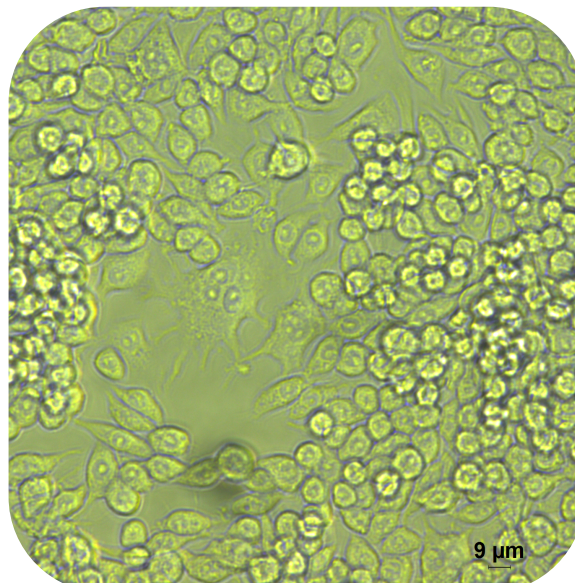
**Figura 24. Reconstrucción filogenética mediante análisis de máxima similitud de las secuencias de genotipo GI.P4 encontrado en la muestra M2, la cual no se relacionó con otras secuencias de genotipo GI.P4 previamente publicadas en Genbank.**

Además, para evaluar mecanismos moleculares de patogénesis de NV, se obtuvo un banco celular de la línea celular Raw264.7 el cual fue preservado en un tanque de nitrógeno. Aunado a esto, se desarrolló un stock viral de MNV alicuotado en volúmenes de 50 y 100µL, y posteriormente titulado por el método de TCID<sub>50</sub> y formación de placas. En el caso de la titulación por TCID<sub>50</sub> se obtuvo un promedio de 6.32 x 10<sup>7</sup>/mL, mientras que el ensayo de formación de placas mostró un título de PFU promedio de 1.02 x 10<sup>7</sup> PFU/mL. Ambos

resultados son comparables, sin embargo, se decidió utilizar el valor obtenido por PFUs para los siguientes ensayos.



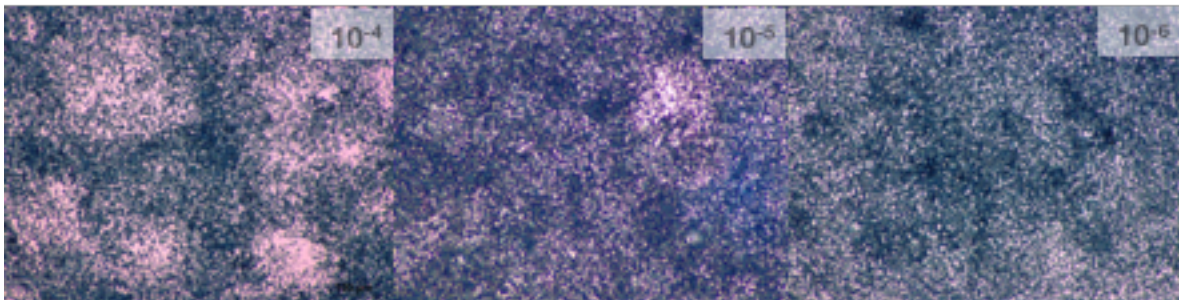
**Figura 25. Micrografía de células Raw264.7 mediante un objeto 20X donde se aprecia una morfología fibroblastoide con la formación de prolongaciones.**



**Figura 26. Micrografía de células Raw264.7 infectadas con MNV observadas mediante un objeto 40X, donde se identifica el característico efecto citopático viral dando origen a sincitios, células redondeadas, muerte y desprendimiento celular así como la formación de focos líticos como el que muestra al centro de esta imagen.**



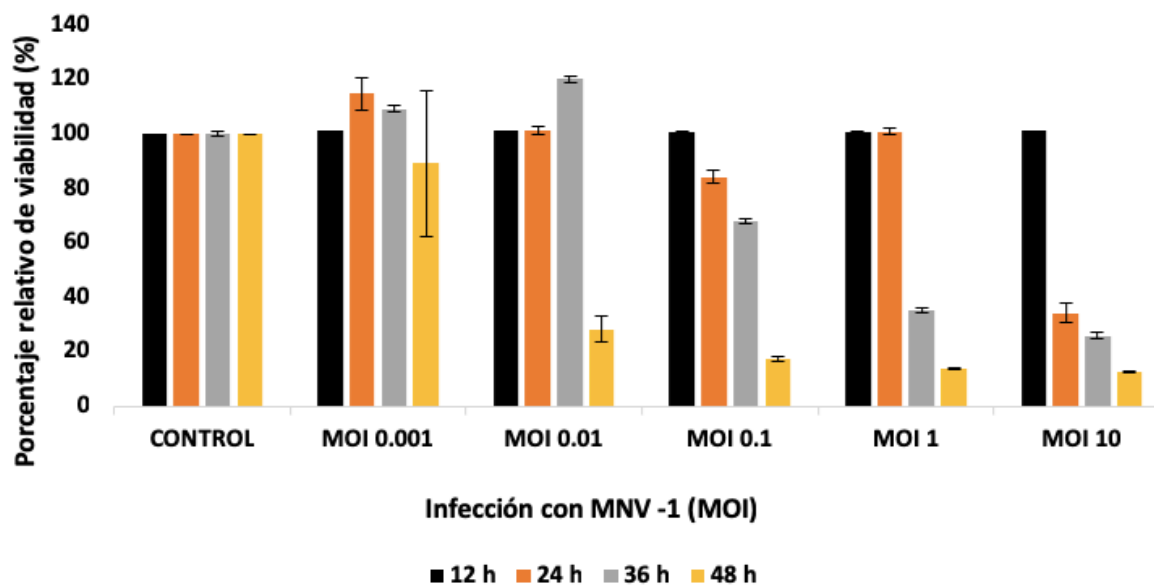
**Figura 27. TCID<sub>50</sub> de MNV en células Raw264.7 mediante un objetivo 10 X, donde se identifica el característico efecto citopático viral el cual tiene un comportamiento inversamente proporcional al incremento de la dilución viral.**



**Figura 28. Ensayo de formación de placa de MNV en células Raw264.7 mediante un objetivo 10X donde se identifica la formación de placas o calvas en la monocapa celular teñida con azul de naftol el cual tiene un comportamiento inversamente proporcional al incremento de la dilución viral.**

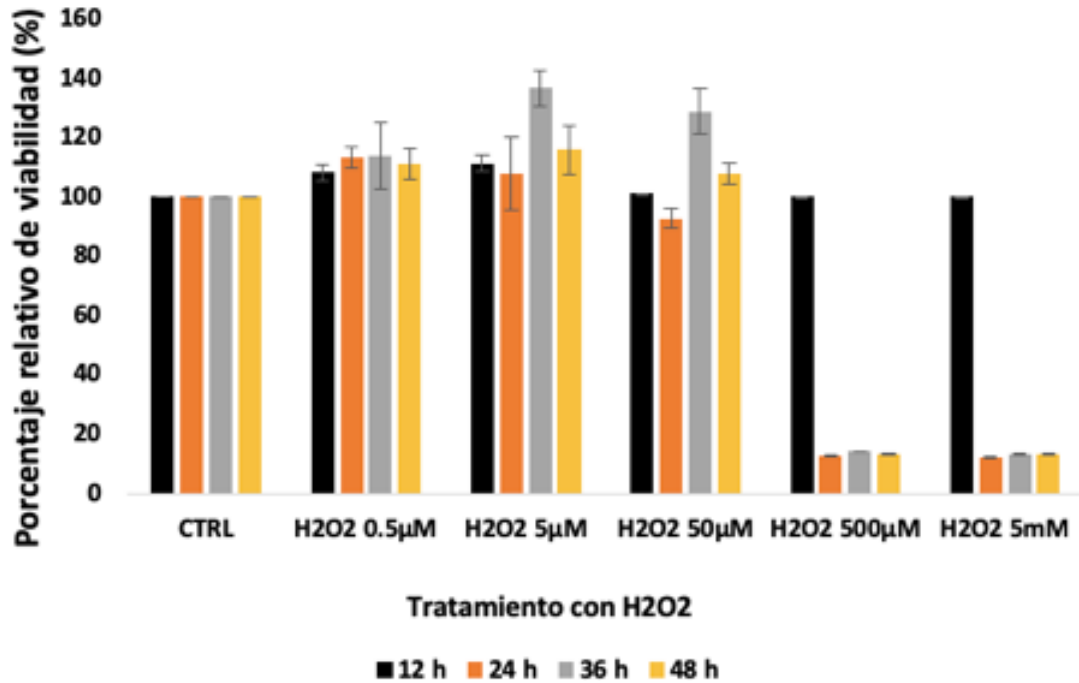
Posteriormente, se llevó a cabo una curva de infección a diferentes MOI (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10) y tiempos de infección (12, 24, 36 y 48h) de la línea celular Raw264.7 infectadas con MNV.





**Figura 29. Porcentaje relativo de viabilidad de células Raw264.7 durante la infección con MNV. En la gráfica se muestra la disminución en la viabilidad celular dependiente de la dosis infecciosa y del tiempo de infección observándose un decremento por debajo del 80% en la MOI 0.1, 1 y 10 a las 36 y 48 horas.**

Además, con el fin de observar la viabilidad celular de las células Raw 264.7 en la exposición a peróxido de hidrógeno el cual se utilizó como control positivo para la determinación de peróxidos totales, se llevó a cabo una curva de tratamiento con diversas concentraciones de peróxido (0.5 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 500 $\mu$ M, 5mM) y a diversos tiempos (12, 24, 36 y 48h); en donde no se observó diferencia en el porcentaje relativo de viabilidad, obtenido por MTT, en relación con el control sin tratamiento.



**Figura 30. Porcentaje relativo de viabilidad de células Raw 264.7 tratadas con peróxido 0.5µM, 5µM, 50µM, 500µM, 5mM a las 12, 24 36 y 48 horas en donde se observó la disminución de la viabilidad celular en el tratamiento de 500µM y 5mM a las 24, 36 y 48 horas.**

A continuación, se evaluó el porcentaje relativo de peróxidos totales de células Raw264.7 infectadas con MNV ( 0.1 y 1 MOIs) a diversos tiempos (12, 24 y 36h); en donde se observó un aumento estadísticamente significativo del porcentaje relativo de peróxidos totales durante la infección con 0.1 MOI y 1MOI a las 12 horas y un aumento estadísticamente significativo a las 24 en la infección con 0.1 MOI y 36 horas con 1 MOI, esto en relación con el control sin tratamiento. Estos resultados fueron corroborados mediante 3 ensayos por triplicado (Figura 32). Por otra parte, la evaluación de la producción de anión superóxido mitocondrial durante la infección con MNV (1 y 10 MOIs) durante 3, 6 y 24 mostró una tendencia al alza a las 36 horas en células infectadas con 1 MOI y 10 MOIs (Figura 33).

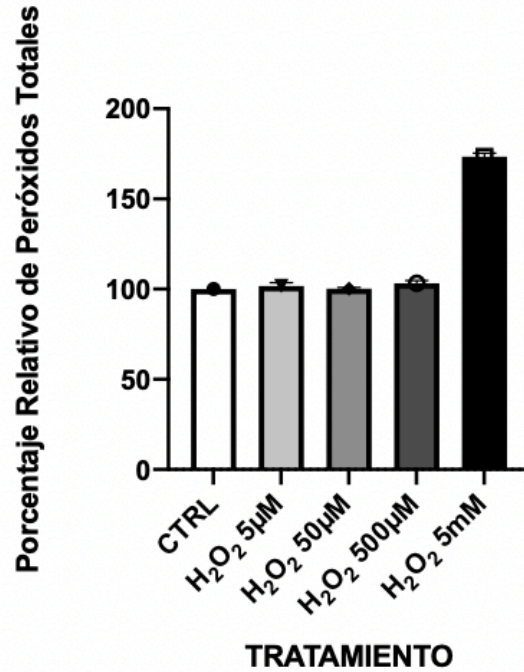


Figura 31. Porcentaje relativo de peróxidos totales de células Raw 264.7 tratadas con peróxido 5µM, 50µM, 500µM, 5mM a las 36 horas, mostrando un incremento en el tratamiento con 5mM.

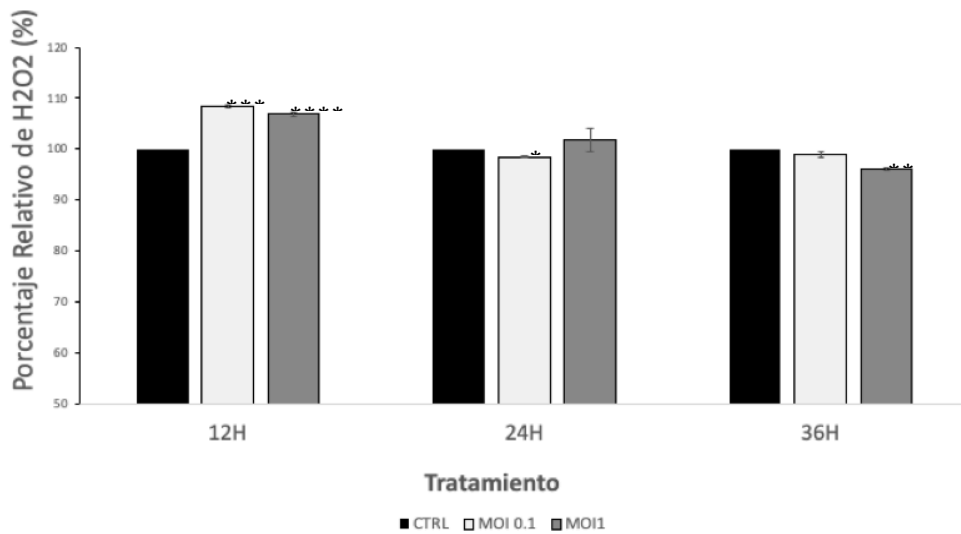
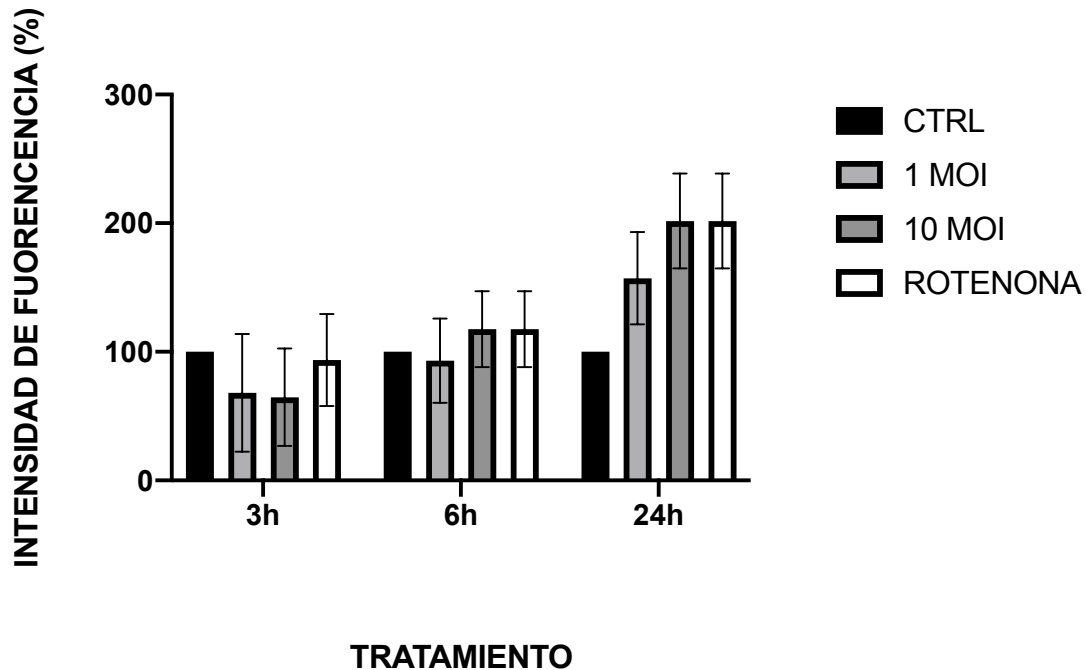


Figura 32. Porcentaje relativo de peróxidos totales de células Raw 264.7 tratadas con 0.1 y 1.0 MOIs de MNV durante 12, 24 y 36 horas, encontrando una disminución significativa en la comparación entre tiempos en la infección con 1 MOI entre los tiempos de 12 horas y 36 horas ( $p > 0.05$ ).



**Figura 33. Porcentaje relativo de intensidad de fluorescencia del anión superóxido mitocondrial en células Raw 264.7 infectadas con 0.1 y 1.0 MOIs de MNV durante 12, 24 y 36 horas. Se encontró un aumento del anión superóxido durante la infección con 1 y 10 MOI en el análisis entre los tiempos 12 y 36 horas ( $p>0.05$ ).**

Adicionalmente, se evaluó la expresión génica relativa de los genes SOD-1, SOD-2, Cat y Trx utilizando como gen endógeno RSP18, durante la infección de células Raw264.7 con 0.1MOIs y 1.0 MOIs por 12, 24 y 36 horas posteriores a la infección. Donde el análisis estadístico indicó una disminución en la expresión génica de SOD-1, SOD-2, Cat y Trx a las 12 en horas en comparación con el control sin infección, mientras que se determinó un incremento en estos genes a las 36 horas en comparación con las 12 horas cuando se realizó el análisis estadístico entre grupos de tiempo ( $p>0.5$ ) (Figura 34, 35, 36, 37).

### SOD-1

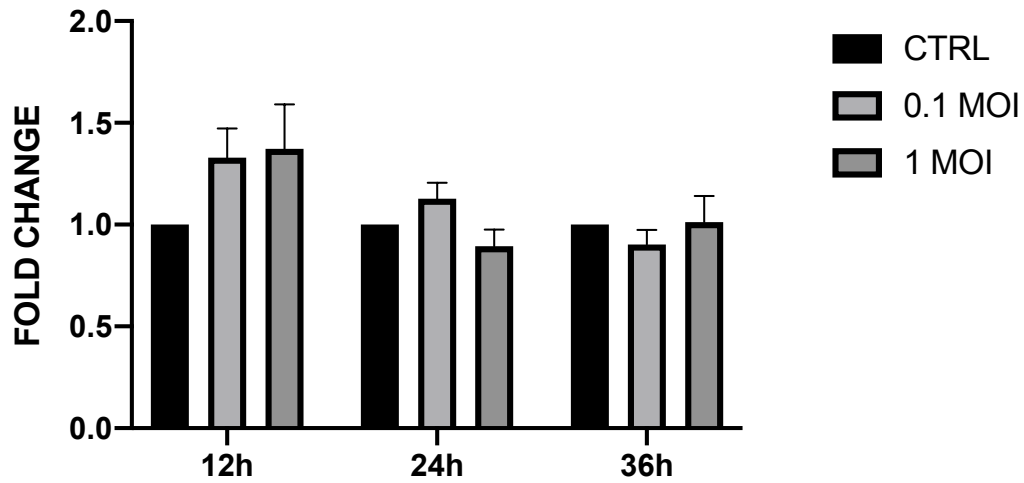


Figura 34. Expresión relativa del gen SOD-1 en células Raw264.7 infectadas con 0.1MOIs o 1.0 MOIs de MNV por 12, 24 y 36 horas. Se encontró una disminución del SOD-1 en la infección con 0.1 MOI en la comparación entre los tiempos 12 y 36 horas ( $p>0.05$ ).

### SOD-2

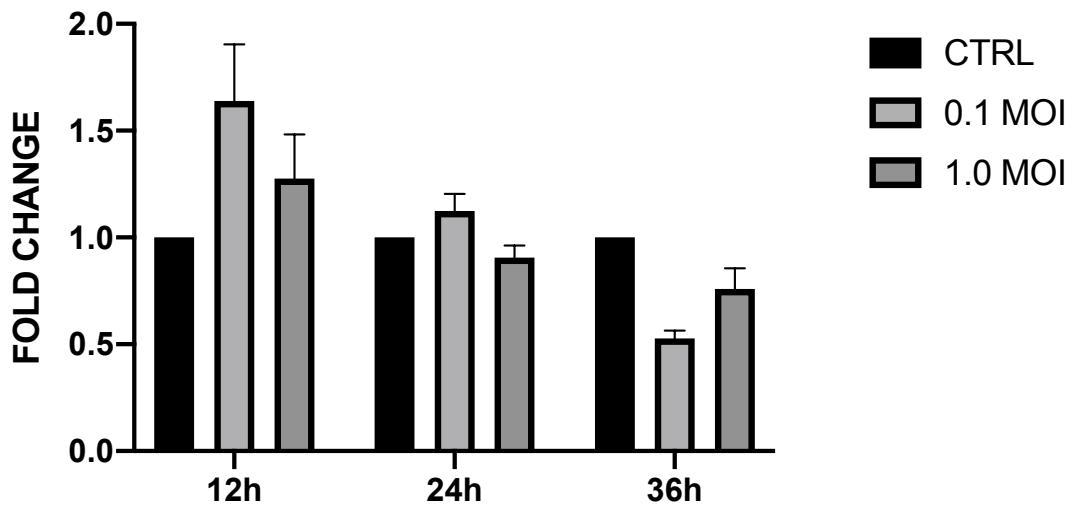
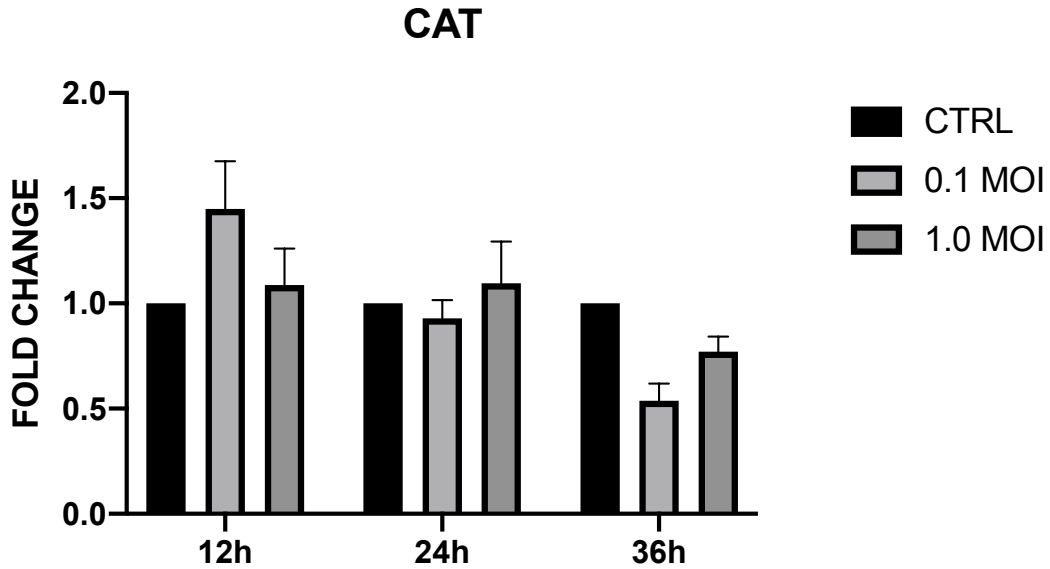
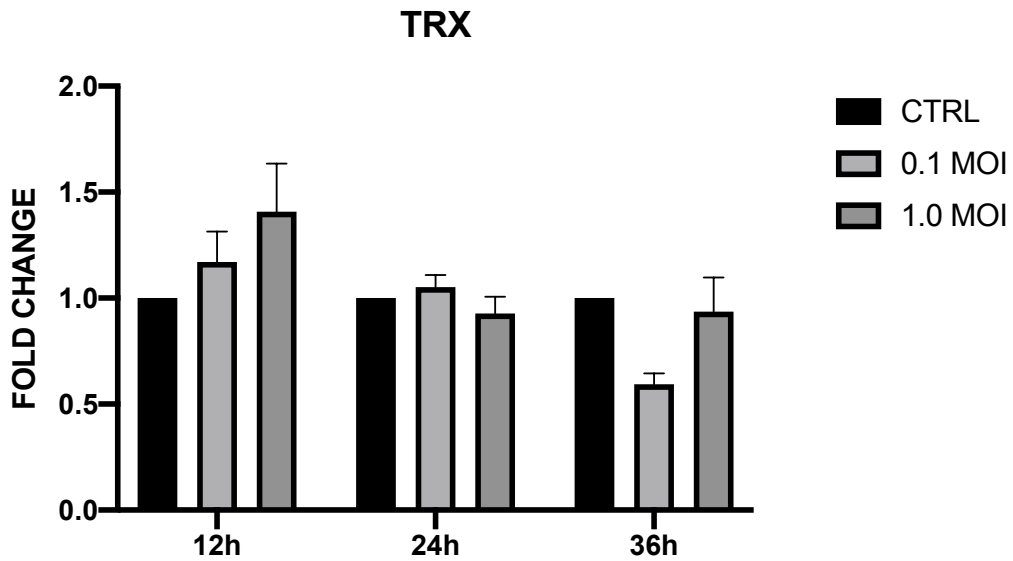


Figura 35. Expresión relativa del gen SOD-2 en células Raw264.7 infectadas con 0.1MOIs o 1.0 MOIs de MNV por 12, 24 y 36 horas. Se encontró una disminución del SOD-2 en la infección con 0.1 MOI en la comparación entre los tiempos 12 y 36 horas ( $p>0.05$ ).



**Figura 36.** Expresión relativa del gene *Cat* en células Raw264.7 infectadas con 0.1MOIs o 1.0 MOIs de MNV por 12, 24 y 36 horas. Se encontró una disminución de *Cat* en la infección con 0.1 MOI en la comparación entre los tiempos 12 y 24 horas y 12 y 36 horas ( $p>0.05$ ).



**Figura 37.** Expresión relativa del gen *Trx* en células Raw264.7 infectadas con 0.1MOIs o 1.0 MOIs de MNV por 12, 24 y 36 horas. Se encontró una disminución de *Trx* en la infección con 0.1 MOI en la comparación entre los tiempos 12 y 24 horas y 12 y 36 horas ( $p>0.05$ ).

## 9. DISCUSIÓN

Las enfermedades virales se distribuyen ampliamente a nivel mundial, sin embargo, a pesar de su relevancia para la salud pública se encuentran pobremente caracterizadas. En México la vigilancia epidemiológica viral es limitada, en parte por el requerimiento de herramientas moleculares y los costos derivados, por lo que actualmente las estadísticas epidemiológicas nacionales, de acuerdo a la Dirección General de Epidemiología, únicamente son reportadas con el término “mal definidos” a los casos de EDA de etiología no identificados y probablemente ocasionadas por agentes virales como Norovirus (52); así mismo la circulación de variantes génicas virales no es monitoreada a través de un sistema de vigilancia epidemiológica.

En este trabajo se identificó NVH por qPCR dúplex en tiempo real en el 19% de las muestras de pacientes de todas las edades que cursaban con GEA en el Hospital Universitario de la UANL, siendo la mayoría de las muestras positivas pertenecientes a menores de edad, con excepción de una muestra de adulto inmunosuprimido que presenta una co-infección de VIH. De manera interesante se detectó NVH en el 33% de los niños de 0 a 3 años, donde en el 66.7% de estos se detectó NVH GI, en el 16.7% se detectó NVH GII y 16.7% en una co-infección de NVH GI y GII, presentándose además el fallecimiento de un menor que presentaba comorbilidades de índole respiratorio. Esta información concuerda con reportes de diferentes países como Ghana en donde se reportó un 36.2% de NVH en niños menores de 5 años con GEA, de los cuales 76.7% correspondía a GI, 14.4% a GII y 8.9% a la co-infección de GI y GII (53). Así mismo, en un estudio en Guatemala (54) se detectó 20.4% de rotavirus, 18.5% NVH, 7% de sapovirus y 4.2% de astrovirus, demostrando que los virus causantes de GEA suman el 50% de los casos de GEA en niños menores a 5 años. Así mismo,

un estudio realizado en Italia encontró que las muestras diarreicas de niños fueron asociadas con 23% de NV, 20% rotavirus, 20% adenovirus, identificando a los patógenos virales en más del 60% de las GEA (55).

Además, la secuenciación en masa del RNA viral obtenido de muestras provenientes de pacientes con GEA permitió el análisis metagenómico de las muestras positivas para NV utilizando una metodología de secuenciación en masa utilizando DNAs sintetizado a partir del RNA viral, donde se logró identificar la presencia de varios géneros de bacteriófagos en todas las muestras así como diversos dominio virales, además se determinó la co-infección viral de la muestra 5 con el patógeno humano Enterovirus B causante de EDA, de acuerdo a la literatura las co-infecciones virales en la GEA son frecuentes, sin embargo los enterovirus han sido recientemente asociado a la diarrea pediátrica (56) como es el caso de la muestra 5 perteneciente al grupo de edad de 0 a 10 años. A su vez mediante esta metodología se obtuvo el 97.8% de la secuencia de Norovirus GII en la muestra, con una profundidad de 48.4, mientras que en la muestra M2 se identificó un 36% de la secuencia de NV GI con una profundidad de 58 que únicamente abarcaba la ORF1. De acuerdo con la literatura, la secuenciación de RNA virus mediante nuevas metodologías como la secuenciación por puenteo que ofrece Illumina, continúa siendo limitada en parte debido a la falta de sistemas de cultivo para RNA virus emergentes, como lo es el Norovirus, así como la alta variabilidad génica propia de estos virus que poseen altas tasas mutagénicas durante su replicación (57). Además, la proporción de RNA genómico representa un gran competidor contra el RNA viral encontrado en las muestras por lo que frecuentemente la profundidad de las secuencias obtenidas se ve mermada.



Por otra parte, la genotipificación de las secuencias obtenidas permitió la identificación de un genotipo circulante GII.4/GII.P16 identificado en tres muestras analizadas, así como la genotipificación parcial del genotipo GI.P4 debido a la ausencia de la secuencia del ORF2 en las secuencias obtenidas de la muestra M2. Además, el análisis filogenético de las tres muestras de genotipo GII.4/GII.P16 no mostro agrupación de estas con muestras de NV previamente reportadas en países como México, Estados Unidos de América, Canadá, Reino Unido y Japón. De igual manera, el análisis filogenético de la muestra de genotipo GI.P4 no mostró agrupación con otras secuencias previamente reportadas en países como Argentina, Francia, Estados Unidos de América, China, Japón, Taiwan y Países Bajos; sugiriendo cambios en el genoma de NV GI y GII circulante en México.

De acuerdo con la literatura encontrada en relación con el genotipo GII.4/GII.P16, que en este estudio se encontró en circulación en México en muestras de recolectadas en los años 2017 y 2018, este genotipo derivó de la recombinación de GII.4 con la polimerasa GII.P16 dando lugar a una cepa altamente contagiosa (58) siendo inicialmente detectado en circulación en Asia , Europa y EUA en el 2016. Desde entonces, los NV GII.P16 han sido detectados en combinación con muchos tipos cap, incluyendo GII.1, GII.3, GII.10 y GII.12 como resultado de diferentes eventos de recombinación. En un estudio realizado en Italia se analizaron 337 muestras de heces diarreicas colectadas en los años 2016 al 2019 en donde se identificó el genotipo GII.P16 en un 58.5% (197/337) particularmente en los años 2016 y 2017. Además, un reporte de vigilancia de NV en Estados Unidos de secuencias reportadas en brotes epidemiológicos en los años 2013 al 2016 identificó el genotipo GII.4/GII.P16 en 71 brotes entre los cuales se registró un incremento en los meses de noviembre y diciembre del 2015, así como enero a julio del 2016 (59).

Respecto al genotipo GI/GI.P4, existe un reporte en el Hospital de Niños de Wuhan en China, donde se analizaron muestras fecales de pacientes con GEA obtenidas en los años 2007 al 2010, encontrando de manera minoritaria el genotipo GI/GI.P4 particularmente en los años 2008 y 2009 (60), así mismo este genotipo se reportó en un estudio realizado en Brasil con una colección de muestras de los años 1982 al 2011 teniendo un total de 2520 muestras se identificó este genotipo en una muestra (61).

Si bien los genotipos identificados en este proyecto han sido reportados con anterioridad en otros países, la comparación filogenética de las secuencias obtenidas en este estudio no indicó la agrupación de dichas secuencias con secuencias de NV publicadas en México o en otros países, siendo relevante que la ausencia de un sistema de vigilancia epidemiológica dirigida al monitoreo de los virus entéricos particularmente NV repercute en la información disponible sobre las cepas circulantes y las variaciones génicas de dichos patógenos en la población mexicana.

Además, en este trabajo se evaluó el efecto de la infección viral, de MNV en células Raw264.7, en los mecanismos moleculares involucrados en la patogénesis viral particularmente los relacionados al estrés oxidativo celular para lo que se analizaron diversos indicadores de los sistemas enzimáticos antioxidantes como la SOD, catalasa y tiorredoxina. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron un posible desequilibrio redox relacionado a la infección de MNV mediante un incremento a las 12 horas de los peróxidos totales, así como de la expresión génica relativa a nivel transcripcional de los genes SOD-1, SOD-2, Cat y Trx, sin embargo, el sucesivo decremento de estos marcadores a las 36 horas podría indicar un restablecimiento del mismo. En el caso del anión superóxido mitocondrial se observó una disminución a las 3 y 6 horas y una tendencia al aumento de este marcador a

las 24 horas posiblemente relacionado con el decremento en la expresión génica de la superóxido dismutasa mitocondrial encargada de la reducción de esta ROS. Si bien la literatura no ofrece información específica sobre estos sistemas antioxidantes en la patogenia de NV, se ha reportado recientemente el decremento en la respuesta celular temprana mediante la disminución en la formación del complejo MDA5, relacionada con el incremento de los genes ATF3 y ATF4 relacionados a la respuesta integrada al estrés (ISR); sugiriendo en conjunto mecanismos de evasión de la respuesta celular antiviral así como la tolerancia celular al estrés inducida por la infección viral (62).

Recientemente se ha establecido la asociación de NV al RE con la formación de complejos de replicación (63), es muy probable que esto ocasione estrés celular de RE y estrés oxidativo por el desbalance en las membranas y la explotación de membranas y de maquinaria de traducción.

## 10. CONCLUSIÓN

En este trabajo se estandarizó una metodología para detección de NV e identificación de genogrupos GI y GII por medio de una qPCR dúplex la cual fue validada a través de la construcción de una curva estándar para GI y otra para GII utilizando el control positivo diseñado en el presente estudio.

Por otra parte, los resultados obtenidos muestran un porcentaje de prevalencia de NV del 19% en pacientes de Monterrey y el área metropolitana de todas las edades y atendidos en el área de Urgencias y Pediatría del Hospital Universitario. Además, el 27.77% de los pacientes pediátricos menores a 10 años fueron positivos para NVH, mientras que los pacientes mayores a 10 años sufrían de comorbilidades como VIH o diabetes. De manera interesante se logró caracterizar el genotipo GII.4/GII.P16 en la población de estudio, así como un genotipo parcial GI/GI.P4 cuyo análisis filogenético no mostró relación con otras secuencias de estos genotipos previamente publicadas.

A su vez se implementó un modelo de replicación de MNV en células Raw264.7 aunado a la generación de un banco celular de células Raw264.7 y del virus MNV titulado. Este modelo fue útil para evaluar la participación de MNV en el estrés oxidativo celular. Las condiciones aquí evaluadas no mostraron una alteración en los niveles de peróxido totales en células Raw264.7 infectadas con MNV. Además, la evaluación a nivel transcripcional de los genes de estrés oxidativo indicó variaciones en los genes SOD-2, Cat y Trx en la infección por 36 horas a una MOI de 0.1 y 1; si bien, es necesario la extensión de este proyecto con el fin esclarecer la regulación del estrés oxidativo durante la infección de MNV.

Este reporte se suma a otros trabajos publicados en población mexicana y tiene como perspectiva obtener la secuencia de genomas completos de NVH y el análisis de posibles secuencias involucradas en la patogenicidad del virus.

## REFERENCIAS

1. Chow, C. M., Leung, A. K., & Hon, K. L. (2010). Acute gastroenteritis: from guidelines to real life. *Clinical and experimental gastroenterology*, 3, 97–112. <https://doi.org/10.2147/ceg.s6554>
2. Stuempfig, N. D., & Seroy, J. (2021). Viral Gastroenteritis. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
3. Schwartz J. L. (2012). The first rotavirus vaccine and the politics of acceptable risk. *The Milbank quarterly*, 90(2), 278–310. <https://doi.org/10.1111/j.1468-0009.2012.00664.x>
4. Santos, V. S., Gurgel, R. Q., Cavalcante, S. M., Kirby, A., Café, L. P., Souto, M. J., Dolabella, S. S., de Assis, M. R., Fumian, T. M., Miagostovich, M. P., Cunliffe, N. A., & Cuevas, L. E. (2017). Acute norovirus gastroenteritis in children in a highly rotavirus-vaccinated population in Northeast Brazil. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 88, 33–38. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.10.015>
5. Robilotti, E., Deresinski, S., & Pinsky, B. A. (2015). Norovirus. *Clinical microbiology reviews*, 28(1), 134–164. <https://doi.org/10.1128/CMR.00075-14>
6. Farkas, T., Deng, X., Ruiz-Palacios, G., Morrow, A., & Jiang, X. (2006). Development of an enzyme immunoassay for detection of sapovirus-specific antibodies and its application in a study of seroprevalence in children. *Journal of clinical microbiology*, 44(10), 3674–3679. <https://doi.org/10.1128/JCM.01087-06>
7. Vasickova P, et al. Viruses as a cause of foodborne diseases: a review of the literature. *International Journal for Veterinary and Biomedical Science*, 2005; 50 (3), 89–104.
8. Capece G, Gignac E. Norovirus. Aug 11. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan–. PMID: 30020637.
9. Zhang, H., Morrison, S., & Tang, Y. W. (2015). Multiplex polymerase chain reaction tests for detection of pathogens associated with gastroenteritis. *Clinics in laboratory medicine*, 35(2), 461–486. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2015.02.006>
10. Souza, M., et al. Monitoring of Calicivirus Among Day-Care Children: Evidence of Asymptomatic Viral Excretion and First Report of GI.7 Norovirus and GI.3. *Journal of Medical Virology*, 2014; 86, 1569–1575.
11. Teunis, P. F., Moe, C. L., Liu, P., Miller, S. E., Lindesmith, L., Baric, R. S., Le Pendu, J., & Calderon, R. L. (2008). Norwalk virus: how infectious is it?. *Journal of medical virology*, 80(8), 1468–1476. <https://doi.org/10.1002/jmv.21237>
12. United States Department of Agriculture. (2012). Introduction to the Microbiology of Food Processing.

13. Duret, S., Pouillot, R., Fanaselle, W., Papafragkou, E., Liggans, G., Williams, L., & Van Doren, J. M. (2017). Quantitative Risk Assessment of Norovirus Transmission in Food Establishments: Evaluating the Impact of Intervention Strategies and Food Employee Behavior on the Risk Associated with Norovirus in Foods. *Risk analysis : an official publication of the Society for Risk Analysis*, 37(11), 2080–2106. <https://doi.org/10.1111/risa.12758>
14. 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. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70767-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70767-4)
15. O'Ryan, M., Riera-Montes, M., & Lopman, B. (2017). Norovirus in Latin America: Systematic Review and Meta-analysis. *The Pediatric infectious disease journal*, 36(2), 127–134. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001369>
16. Thorne, L. G., & Goodfellow, I. G. (2014). Norovirus gene expression and replication. *The Journal of general virology*, 95(Pt 2), 278–291. <https://doi.org/10.1099/vir.0.059634-0>
17. Vinjé J. (2015). Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *Journal of clinical microbiology*, 53(2), 373–381. <https://doi.org/10.1128/JCM.01535-14>
18. Chan, P.K.S., Kwan H.S, Chan M.C.W. The Norovirus. Features, Detection, and Prevention of Foodborne Disease. (2017).
19. Thorne, L. G., & Goodfellow, I. G. (2014). Norovirus gene expression and replication. *The Journal of general virology*, 95(Pt 2), 278–291. <https://doi.org/10.1099/vir.0.059634-0>
20. Zheng, D. P., Ando, T., Fankhauser, R. L., Beard, R. S., Glass, R. I., & Monroe, S. S. (2006). Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology*, 346(2), 312–323. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.11.015>
21. Karst, S. M., Wobus, C. E., Goodfellow, I. G., Green, K. Y., & Virgin, H. W. (2014). Advances in norovirus biology. *Cell host & microbe*, 15(6), 668–680. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.05.015>
22. Parra, G. I., Squires, R. B., Karangwa, C. K., Johnson, J. A., Lepore, C. J., Sosnovtsev, S. V., & Green, K. Y. (2017). Static and Evolving Norovirus Genotypes: Implications for Epidemiology and Immunity. *PLoS pathogens*, 13(1), e1006136. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006136>
23. Ando, T., Noel, J. S., & Fankhauser, R. L. (2000). Genetic classification of "Norwalk-like viruses". *The Journal of infectious diseases*, 181 Suppl 2, S336–S348. <https://doi.org/10.1086/315589>

24. de Graaf, M., van Beek, J., & Koopmans, M. P. (2016). Human norovirus transmission and evolution in a changing world. *Nature reviews. Microbiology*, *14*(7), 421–433. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.48>
25. Rodríguez-Guillén, L., Vizzi, E., Alcalá, A. C., Pujol, F. H., Liprandi, F., & Ludert, J. E. (2005). Calicivirus infection in human immunodeficiency virus seropositive children and adults. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, *33*(2), 104–109. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.09.031>
26. Wobus, C. E., Karst, S. M., Thackray, L. B., Chang, K. O., Sosnovtsev, S. V., Belliot, G., Krug, A., Mackenzie, J. M., Green, K. Y., & Virgin, H. W. (2004). Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS biology*, *2*(12), e432. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020432>
27. Ettayebi, K., Crawford, S. E., Murakami, K., Broughman, J. R., Karandikar, U., Tenge, V. R., Neill, F. H., Blutt, S. E., Zeng, X. L., Qu, L., Kou, B., Opekun, A. R., Burrin, D., Graham, D. Y., Ramani, S., Atmar, R. L., & Estes, M. K. (2016). Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. *Science (New York, N.Y.)*, *353*(6306), 1387–1393. <https://doi.org/10.1126/science.aaf5211>
28. Jheng, J. R., Ho, J. Y., & Horng, J. T. (2014). ER stress, autophagy, and RNA viruses. *Frontiers in microbiology*, *5*, 388. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00388>
29. Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current biology : CB*, *24*(10), R453–R462. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>
30. Yang, S., & Lian, G. (2020). ROS and diseases: role in metabolism and energy supply. *Molecular and cellular biochemistry*, *467*(1-2), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11010-019-03667-9>
31. Guerrero, C. A., & Acosta, O. (2016). Inflammatory and oxidative stress in rotavirus infection. *World journal of virology*, *5*(2), 38–62. <https://doi.org/10.5501/wjv.v5.i2.38>
32. Wang, Y., Branicky, R., Noë, A., & Hekimi, S. (2018). Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *The Journal of cell biology*, *217*(6), 1915–1928. <https://doi.org/10.1083/jcb.201708007>
33. <https://www.rivm.nl/en/noronet>
34. Vega, E., Barclay, L., Gregoricus, N., Williams, K., Lee, D., & Vinjé, J. (2011). Novel surveillance network for norovirus gastroenteritis outbreaks, United States. *Emerging infectious diseases*, *17*(8), 1389–1395. <https://doi.org/10.3201/eid1708.101837>
35. Chhabra P, de Graaf M, Parra GI, Chan MC, Green K, Martella V, Wang Q, White PA, Katayama K, Vennema H, Koopmans MPG, Vinjé J (2019). Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *J Gen Virol*. 2019 Oct;100(10):1393-1406. doi: 10.1099/jgv.0.001318.



36. Vega, E., Barclay, L., Gregoricus, N., Williams, K., Lee, D., & Vinjé, J. (2011). Novel surveillance network for norovirus gastroenteritis outbreaks, United States. *Emerging infectious diseases*, 17(8), 1389–1395. <https://doi.org/10.3201/eid1708.101837>
37. van Beek, J., de Graaf, M., Xia, M., Jiang, X., Vinjé, J., Beersma, M., de Bruin, E., van de Vijver, D., Holwerda, M., van Houten, M., Buisman, A. M., van Binnendijk, R., Osterhaus, A., van der Klis, F., Vennema, H., & Koopmans, M. (2016). Comparison of norovirus genogroup I, II and IV seroprevalence among children in the Netherlands, 1963, 1983 and 2006. *The Journal of general virology*, 97(9), 2255–2264. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000533>
38. Parada-Fabián, J. C., Juárez-García, P., Natividad-Bonifacio, I., Vázquez-Salinas, C., & Quiñones-Ramírez, E. I. (2016). Identification of Enteric Viruses in Foods from Mexico City. *Food and environmental virology*, 8(3), 215–220. <https://doi.org/10.1007/s12560-016-9244-6>
39. Delgado-Gardea, M., Tamez-Guerra, P., Gomez-Flores, R., Mendieta-Mendoza, A., Zavala-Díaz de la Serna, F. J., Contreras-Cordero, J. F., Erosa-de la Vega, G., Pérez-Recoder, M. C., Sánchez-Ramírez, B., González-Horta, C., & Infante-Ramírez, R. (2017). Prevalence of Rotavirus Genogroup A and Norovirus Genogroup II in Bassaseachic Falls National Park Surface Waters in Chihuahua, Mexico. *International journal of environmental research and public health*, 14(5), 482. <https://doi.org/10.3390/ijerph14050482>
40. Gutiérrez-Escolano, A. L., Velázquez, F. R., Escobar-Herrera, J., López Saucedo, C., Torres, J., & Estrada-García, T. (2010). Human caliciviruses detected in Mexican children admitted to hospital during 1998-2000, with severe acute gastroenteritis not due to other enteropathogens. *Journal of medical virology*, 82(4), 632–637. <https://doi.org/10.1002/jmv.21743>
41. Gómez-Santiago, F., Ribas-Aparicio, R. M., & García-Lozano, H. (2012). Molecular characterization of human calicivirus associated with acute diarrheal disease in Mexican children. *Virology journal*, 9, 54. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-54>
42. Félix-Valenzuela, L., Molina-Chavarria, A., Enríquez-Hernández, C. I., Bolado-Martínez, E., Durazo-Arvizu, M., Dórame-Castillo, R., Cano-Rangel, M. A., & Mata-Haro, V. (2020). Molecular Characterization of Norovirus Circulating in Northwest Mexico During 2013-2014. *Food and environmental virology*, 12(4), 355–360. <https://doi.org/10.1007/s12560-020-09446-w>
43. Casillas-Vega, N., Flores-Rodríguez, F., Sotelo-Coronado, I., Vera-García, M. E., García-Heredia, A., Rivas-Estilla, A. M., Lozano-Sepúlveda, S. A., García, S., Flores-Arechiga, A., & Heredia, N. (2020). Norovirus Is the Most Frequent Cause of Diarrhea in Hospitalized Patients in Monterrey, Mexico. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 9(9), 672. <https://doi.org/10.3390/pathogens9090672>
44. Jothikumar, N., Lowther, J. A., Henshilwood, K., Lees, D. N., Hill, V. R., & Vinjé, J. (2005). Rapid and sensitive detection of noroviruses by using TaqMan-based one-step reverse transcription-PCR assays and application to naturally contaminated shellfish

samples. *Applied and environmental microbiology*, 71(4), 1870–1875. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.1870-1875.2005>

45. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

46. Ullmann, L. S., de Camargo Tozato, C., Malossi, C. D., da Cruz, T. F., Cavalcante, R. V., Kurissio, J. K., Cagnini, D. Q., Rodrigues, M. V., Biondo, A. W., & Araujo, J. P., Jr (2015). Comparative clinical sample preparation of DNA and RNA viral nucleic acids for a commercial deep sequencing system (Illumina MiSeq®). *Journal of virological methods*, 220, 60–63. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.04.009>

47. Hwang, S., Alhatlani, B., Arias, A., Caddy, S. L., Christodoulou, C., Cunha, J. B., Emmott, E., Gonzalez-Hernandez, M., Kolawole, A., Lu, J., Rippinger, C., Sorgeloos, F., Thorne, L., Vashist, S., Goodfellow, I., & Wobus, C. E. (2014). Murine norovirus: propagation, quantification, and genetic manipulation. *Current protocols in microbiology*, 33, 15K.2.1–15K.2.61. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc15k02s33>

48. Gonzalez-Hernandez, M. B., Bragazzi Cunha, J., & Wobus, C. E. (2012). Plaque assay for murine norovirus. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (66), e4297. <https://doi.org/10.3791/4297>

49. McCann, K. B., Lee, A., Wan, J., Roginski, H., & Coventry, M. J. (2003). The effect of bovine lactoferrin and lactoferricin B on the ability of feline calicivirus (a norovirus surrogate) and poliovirus to infect cell cultures. *Journal of applied microbiology*, 95(5), 1026–1033. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02071.x>

50. Srinivasan, S., & Avadhani, N. G. (2007). Hypoxia-mediated mitochondrial stress in RAW264.7 cells induces osteoclast-like TRAP-positive cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1117, 51–61. <https://doi.org/10.1196/annals.1402.067>

51. Koo, S. J., Chowdhury, I. H., Szczesny, B., Wan, X., & Garg, N. J. (2016). Macrophages Promote Oxidative Metabolism To Drive Nitric Oxide Generation in Response to *Trypanosoma cruzi*. *Infection and immunity*, 84(12), 3527–3541. <https://doi.org/10.1128/IAI.00809-16>

52. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/606446/EDA\\_SE53\\_2020.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/606446/EDA_SE53_2020.pdf)

53. Lartey, B. L., Quaye, O., Damanka, S. A., Agbemabiese, C. A., Armachie, J., Dennis, F. E., Enweronu-Laryea, C., & Armah, G. E. (2020). Understanding Pediatric Norovirus Epidemiology: A Decade of Study among Ghanaian Children. *Viruses*, 12(11), 1321. <https://doi.org/10.3390/v12111321>

54. Diez-Valcarce M, Lopez MR, Lopez B, Morales O, Sagastume M, Cadena L, Kaydos-Daniels S, Jarquin C, McCracken JP, Bryan JP, Vinjé J. Prevalence and genetic diversity of viral gastroenteritis viruses in children younger than 5 years of age in Guatemala, 2014-2015. *J Clin Virol*. 2019 May;114:6-11. doi: 10.1016/j.jcv.2019.03.006. Epub 2019 Mar 9. PMID: 30875613.

55. Donà, D., Mozzo, E., Scamarcia, A., Picelli, G., Villa, M., Cantarutti, L., & Giaquinto, C. (2016). Community-Acquired Rotavirus Gastroenteritis Compared with Adenovirus and Norovirus Gastroenteritis in Italian Children: A Pediatric Study. *International journal of pediatrics*, 2016, 5236243.
56. Makimaa, H., Ingle, H., & Baldrige, M. T. (2020). Enteric Viral Co-Infections: Pathogenesis and Perspective. *Viruses*, 12(8), 904. <https://doi.org/10.3390/v12080904>
57. Fitzpatrick, A. H., Rupnik, A., O'Shea, H., Crispie, F., Keaveney, S., & Cotter, P. (2021). High Throughput Sequencing for the Detection and Characterization of RNA Viruses. *Frontiers in microbiology*, 12, 621719. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.621719>
58. Hernandez, J. M., Silva, L. D., Sousa Junior, E. C., Cardoso, J. F., Reymão, T., Portela, A., de Lima, C., Teixeira, D. M., Lucena, M., Nunes, M., & Gabbay, Y. B. (2020). Evolutionary and Molecular Analysis of Complete Genome Sequences of Norovirus From Brazil: Emerging Recombinant Strain GII.P16/GII.4. *Frontiers in microbiology*, 11, 1870. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01870>
59. Cannon JL, Barclay L, Collins NR, Wikswø ME, Castro CJ, Magaña LC, Gregoricus N, Marine RL, Chhabra P, Vinjé J. Genetic and Epidemiologic Trends of Norovirus Outbreaks in the United States from 2013 to 2016 Demonstrated Emergence of Novel GII.4 Recombinant Viruses (2017). *J Clin Microbiol*. 2017 Jul;55(7):2208-2221. doi: 10.1128/JCM.00455-17.
60. Wang YH, Zhou DJ, Zhou X, Yang T, Ghosh S, Pang BB, Peng JS, Liu MQ, Hu Q, Kobayashi N (2012). Molecular epidemiology of noroviruses in children and adults with acute gastroenteritis in Wuhan, China, 2007-2010. *Arch Virol*. 2012 Dec;157(12):2417-24. doi: 10.1007/s00705-012-1437-1.
61. Siqueira JAM, Bandeira RDS, Oliveira DS, Dos Santos LFP, Gabbay YB. Genotype diversity and molecular evolution of noroviruses: A 30-year (1982-2011) comprehensive study with children from Northern Brazil (2017). *PLoS One*. 2017 Jun 12;12(6):e0178909. doi: 10.1371/journal.pone.0178909. PMID: 28604828; PMCID: PMC5467842.
62. Brocard M, Lu J, Hall B, Borah K, Moller-Levet C, Georgana I, Sorgeloos F, Beste DJV, Goodfellow IG, Locker N. Murine Norovirus Infection Results in Anti-inflammatory Response Downstream of Amino Acid Depletion in Macrophages (2021). *J Virol*. 2021 Sep 27;95(20):e0113421. doi: 10.1128/JVI.01134-21.
63. Doerflinger, S. Y., Cortese, M., Romero-Brey, I., Menne, Z., Tubiana, T., Schenk, C., White, P. A., Bartenschlager, R., Bressanelli, S., Hansman, G. S., & Lohmann, V. (2017). Membrane alterations induced by nonstructural proteins of human norovirus. *PLoS pathogens*, 13(10), e1006705. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006705>

## FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Ciclo de replicación y genoma de NV. ....	15
Figura 2. Sistemas antioxidantes intracelulares.....	19
Figura 3. Regiones utilizadas en la identificación de NV. Adaptada de NoroNet. ....	21
Figura 4. Clasificación filogenética de NV basada en la secuencia aminoacídica de VP1 en 10 genogrupos y 2 genogrupos no asignados .....	26
Figura 5. Arbol filogenético de secuencias parciales (762 nucleótidos de 3'- ORF1) de RdRp de genogrupos de NV.....	26
Figura 6. Clasificación actualiada de NV con el número de genogrupos y genotipos basado en los aminoácidos de VP1 y el número de P-grupos y P-tipos basada en la región parcial (762 nucleótidos) de la polimerasa dependiente de RNA (RdRp) en 5' de ORF1. P=P-grupo, T=genotipo tentativo/P-tipo.....	27
Figura 7. Variantes de NV GII con distribución global y la primera temporada en la que emergieron. Nuevas variantes emergen cada 2 a 3 años aproximadamente y reemplazan a las cepas previamente predominantes. Esto incluye a US95_96 en 1995, Farmington Hills en 2002, Hunter en 2002, Yerseke en 2006, Den Haag en 2006, New Orleans en 2009 y Sydney en 2012. Adaptada de “Advances in Laboratory Methods for Detection and Typing of Norovirus”, por Jan Vinjé, 2015, Journal of Clinical Microbiology, 53(2): 373–381.....	28
Figura 8. Distribución de genotipos en sueros positivos con respuesta a un solo antígeno. Adaptado de “Comparison of norovirus genogroup I, II and IV seroprevalence among children in the Netherlands, 1963, 1983 and 2006”, por Van Beek J. et al., 2016, Journal of General Virology, Sep;97(9):2255-64. ....	29
Figura 9. Diseño de control Positivo (G-block) para qPCR dúplex para detección de GI y GII. ....	41
Figura 10. Estimación de número de copias equivalentes a ng de control positivo (G-block). ....	41
Figura 11. Gráfica de amplificación de la curva estándar qPCR dúplex para detección de NVH GI y GII, de 0.0256fg, 0.128fg, 0.64fg, 3.2fg, 16fg, 80fg, 400fg y 2000fg.....	49
Figura 12. Límite bajo de detección de curva estándar de qPCR dúplex para detección de NVH GI y GII.....	50
Figura 13. Curva estándar del número de copias del control positivo en la qPCR dúplex para detección de NVH GI y GII.....	50
Figura 14. Clasificación de pacientes por diagnóstico primario y sexo. ....	51
Figura 15. Ensamble de genoma y evaluación metagenómica de la muestra M7. ....	54
Figura 16. Ensamble de genoma y evaluación metagenómica de la muestra M2. ....	55
Figura 17. Ensamble de genoma y evaluación metagenómica de la muestra M5. ....	55
Figura 18. Ensamble de genoma y evaluación metagenómica de la muestra M8. ....	56
Figura 19. Análisis filogenético de secuencias ORF1 y ORF 2 de NVH de muestra M7.....	57
Figura 20. Análisis filogenético de secuencias ORF1 y ORF 2 de NVH de muestra M5.....	58
Figura 21. Análisis filogenético de secuencias ORF1 y ORF 2 de NVH de muestra M8.....	59

Figura 22. Análisis filogenético de secuencias ORF1 y ORF 2 de NVH de muestra M2.....	60
Figura 23. Arbol filogenético de NVH genotipo GII.4/GII.P16 encontrado en muestras M7, M5 y M8. ....	61
Figura 24. Arbol filogenético de NVH genotipo GI.P4 encontrado en muestra M2.....	62
Figura 25. Micrografía de células Raw264.7 mediante un objeto 20X.....	63
Figura 26. Micrografía de células Raw264.7 infectadas con MNV observadas mediante un objeto 40X.....	63
Figura 27. TCID <sub>50</sub> de MNV en células Raw264.7 mediante un objetivo 10 X.....	64
Figura 28. Ensayo de formación de placa de MNV en células Raw264.7 mediante un objetivo 10X.....	64
Figura 29. Porcentaje relativo de viabilidad de células Raw264.7 durante la infección con MNV.....	65
Figura 30. Porcentaje relativo de viabilidad de células Raw 264.7 tratadas con peróxido 0.5µM, 5µM, 50µM, 500µM, 5mM a las 12, 24 36 y 48 horas. ....	66
Figura 31. Porcentaje relativo de peróxidos totales de células Raw 264.7 tratadas con peróxido 5µM, 50µM, 500µM, 5mM a las 36 horas. ....	67
Figura 32. Porcentaje relativo de peróxidos totales de células Raw 264.7 tratadas con 0.1 y 1.0 MOIs de MNV durante 12, 24 y 36 horas. ....	67
Figura 33. Porcentaje relativo de intensidad de fluorescencia del anión superóxido mitocondrial en células Raw 264.7 infectadas con 0.1 y 1.0 MOIs de MNV durante 12, 24 y 36 horas.....	68
Figura 34. Expresión relativa del gen SOD-1en células Raw264.7 infectadas con 0.1MOIs o 1.0 MOIs de MNV por 12, 24 y 36 horas.....	69
Figura 35. Expresión relativa del gen SOD-2en células Raw264.7 infectadas con 0.1MOIs o 1.0 MOIs de MNV por 12, 24 y 36 horas.....	69
Figura 36. Expresión relativa del gene Cat en células Raw264.7 infectadas con 0.1MOIs o 1.0 MOIs de MNV por 12, 24 y 36 horas.....	70
Figura 37. Expresión relativa del gen Trx en células Raw264.7 infectadas con 0.1MOIs o 1.0 MOIs de MNV por 12, 24 y 36 horas.....	70

Tabla 1. Descripción general de ensayos de laboratorio para detección de norovirus. Adaptada de “Advances in Laboratory Methods for Detection and Typing of Norovirus”, por Jan Vinjé, 2015, Journal of Clinical Microbiology, 53(2): 373–381.....	20
--	----

Tabla 2. Cepas genéticas de referencia identificadas por microscopía electrónica (ME), microscopía electrónica inmune (IME) o métodos moleculares por año de publicación. NOTA: Las negritas se refieren a 8 cepas conocidas como cepas prototipo que representan agrupamientos individuales. Números de acceso del GenBank: NV, M87661; HV, U07611; SMV, L23831; JV, AJ011099; KY89, L23828; OTH25, L23830; SOV, L07418; TV, U02030; DSV, U04469; BV, X76716; LV, X86557; MXV, U22498, MKV, X81879; CAV, AF145896. SRSV= small round structured virus. Adaptada de “Genetic Classification of “Norwalk-like Viruses”, por Ando T., 2000, Journal of Infectious Diseases, 181..... 24

Tabla 3. Identificación de NVH GI y GII en muestras fecales diarreicas. .... 52

Tabla 4. Validación de DNA de doble hebra sintético por fluorometría y qPCR. .... 53

Tabla 5. Lecturas obtenidas de la secuenciación en masa de las muestras evaluadas..... 54