



UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERIA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS

"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

**"DETECCIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DE ADENOVIRUS EN NIÑOS CON
GASTROENTERITIS"**

TESIS PRÁCTICA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO BIOLÓGO CLINICO

PRESENTA:

ARMANDO AVILÉS HERNÁNDEZ

NAVOJOA, SONORA

OCTUBRE 2017

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



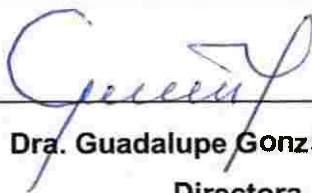
**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del jurado asignado para revisar la tesis profesional de **Armando Avilés Hernández**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el título de **Químico Biólogo Clínico**.



Dra. Guadalupe González Ochoa

Directora



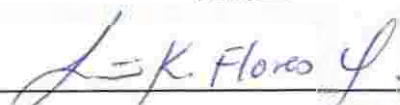
Dra. Norma Patricia Adán Bante

Secretario



MC. Ramona Icedo García

Vocal



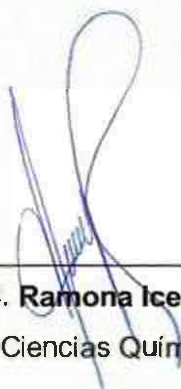
Dra. Lilian Kareem Flores Mendoza

Suplente

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente al autor y a la Universidad de Sonora, Unidad Regional Sur.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de datos contenidos en esta tesis deberá dar crédito a la Universidad de Sonora, previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión por el director de tesis profesional.



M.C. Ramona Icedo García

Jefa a Departamento de Ciencias Químico Biológicas y Agropecuarias

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a Dios, familia y amigos por motivarme a ser mejor persona y por todas las bendiciones que me ha dado. A la Universidad de Sonora, por permitirme formar parte de su programa académico.

A la Dra. Guadalupe González Ochoa, por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por la confianza depositada en mí y por la motivación brindada.

A los integrantes de mi comité de tesis por su apoyo y colaboración para la culminación de este trabajo. Al Dr. Jesús Alfredo Rosas Rodríguez y al Dr. José Guadalupe Soñanez Organís por el espacio de trabajo brindado.

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo que empezó como un miedo a superar y se convirtió en mi forma de vida.

A mis padres: Sra. Hortencia Hernández Sierra y Sr. Francisco Felipe Avilés Torres

Gracias a ustedes, tengo la motivación día a día de realizarme y ser mejor persona, compartiendo todos mis sueños y proyectos, para unirnos más como familia.

CONTENIDO

FORMA DE APROBACIÓN	ii
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
DEDICATORIA.....	v
CONTENIDO	vi
LISTA DE TABLAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	x
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
Gastroenteritis en Niños.....	3
Adenovirus.....	5
Clasificación de Adenovirus.....	7
Características Estructurales de las Partículas Virales de Adenovirus	11
Ciclo de Replicación.....	13
Patogénesis.....	19
OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
MATERIAL Y MÉTODO	22
Área de Estudio y Muestreo	22
Detección de Adenovirus.....	22
Extracción de Ácidos Nucleicos	23
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	23
Amplificación del Gen Hexón de Adenovirus	23
Purificación del Producto de PCR	24
Secuenciación y Análisis de las Secuencias	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
Detección de Adenovirus Entérico Mediante Pruebas Rápidas.....	26
Amplificación del gen Hexón de Adenovirus.....	27

Análisis Filogenético 28
CONCLUSIÓN 32
BIBLIOGRAFÍAS 33

LISTA DE TABLAS

Figura		Pág.
1.	Principales agentes infecciosos causantes de gastroenteritis.....	4
2.	Patologías clínicas asociados a adenovirus humano.....	5
3.	Principales serotipos de adenovirus asociados con enfermedades en los humanos.....	9
4.	Secuencias de oligonucleótidos y tamaño de segmento esperado en la detección de adenovirus.....	23

LISTA DE FIGURAS

Figura	Pág.
1. Microscopia electrónica de microvellosidades intestinales.....	8
2. Estructura tridimensional de la proteína viral hexón de adenovirus tipo 5 del grupo C.....	10
3. Microscopia electrónica de partículas de adenovirus.....	12
4. Esquema de la estructura del genoma de Adenovirus tipo 2 del grupo C.....	14
5. Esquema de los extremos del genoma de adenovirus tipo del grupo C....	17
6. Esquema descriptivo del ciclo de replicación de Adenovirus.....	18
7. Pruebas rápidas de detección de Adenovirus.....	26
8. Amplificación del gen hexón de Adenovirus.....	27
9. Alineación de secuencias nucleotídicas del fragmento amplificado del gen hexón de Adenovirus.....	29
10. Análisis filogenético del Grupo C, tipo 6 de Adenovirus.....	30

RESUMEN

La gastroenteritis infecciosa es una de las enfermedades más frecuentes en los humanos, es la segunda mayor causa de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Afectando principalmente a niños menores de cinco años, causando diarreas agudas deshidratantes, además de otros síntomas como náuseas, vómito, fiebre, anorexia, depresión y dolor abdominal. Los principales virus que infectan a infantes pertenecen a familias diferentes: *Reoviridae*, *Caliciviridae*, *Adenoviridae* y *Astroviridae*. Los Adenovirus pertenecientes al grupo F (Adenovirus entéricos) serotipos 40 y 41, son la tercera causa de gastroenteritis aguda en infantes por lo que objetivo de este trabajo es detectar y tipificar cepas de adenovirus aisladas en niños menores de cinco años con gastroenteritis durante el periodo de estudio. Para la detección de Adenovirus se utilizó el kit comercial *SD Rota/Adeno Rapid Test* y para la tipificación se realizó la amplificación de un fragmento del gen que codifica para la proteína hexón; mismo que posteriormente fue secuenciado. En total se analizaron 179 muestras de las cuales 2 (1.1%) fueron positivas para Adenovirus. El análisis de secuencia de 1(50%) muestra de adenovirus indica que corresponde al sub-género C tipo 6, cepa responsable de causar principalmente infecciones respiratorias agudas, pero encontrado esporádicamente en casos de gastroenteritis en infantes. La evolución molecular de adenovirus hace más propenso a modificaciones de su tropismo, brindándole la capacidad de infectar a más tipos de tejidos en los mamíferos. Por tal motivo, es importante continuar con el monitoreo epidemiológico y molecular de adenovirus causantes de gastroenteritis en niños.

INTRODUCCIÓN

La gastroenteritis aguda es en la actualidad una de las enfermedades más importantes que afectan a los niños menores de cinco años. Este padecimiento se define como una inflamación del revestimiento gástrico e intestinal el principal síntoma es la diarrea aguda asociada a una rápida deshidratación. La diarrea es la causa más frecuente de morbilidad y mortalidad de infantes en países desarrollados y en desarrollo, y se relaciona con alrededor de 760,000 muertes de niños al año. Aunque la diarrea puede ser causado por diferentes factores y agentes infecciosos (toxinas, bacterias, parásitos, virus), la mayoría de los casos son por consecuencia de una infección viral. Los virus pueden infectar de igual manera a los adultos y niños; sin embargo, los niños presentan estas infecciones con mayor frecuencia y severidad debido a que su sistema inmunológico no ha madurado por completo, aunado a que son más susceptibles a una rápida pérdida de fluidos y por lo tanto a una deshidratación severa (Lindesmith y col., 2011; Hostetter, 2004).

Actualmente se han identificado diferentes tipos de virus como agentes etiológicos causantes de gastroenteritis aguda, pero los principales virus que infectan a niños se dividen en cuatro familias diferentes: *Reoviridae* (rotavirus), *Caliciviridae* (norovirus y sapovirus), *Adenoviridae* (adenovirus entéricos) y *Astroviridae* (astrovirus), con el paso del tiempo surgen nuevos serotipos de las mismas familias, debido a que carecen de mecanismos de reparación de su genoma viral y tienen la capacidad de recombinación, por consecuencia son capaces de presentar mutaciones y re-arreglos genéticos que permiten su evolución y generación de cepas emergentes (Raboni y col., 2014). Los adenovirus pertenecientes al grupo F (Adenovirus entéricos) son la tercer causa de gastroenteritis no bacteriana en infantes; Son responsables del 1-8% de los casos de gastroenteritis aguda en niños menores de cinco años, en países desarrollados y 2-31% en países en desarrollo, sin embargo, otros serotipos se han visto implicados en los procesos de infecciones gastrointestinales tales como los serotipos 12, 18 y 31 del grupo A, 1,2, 5 y 6 del grupo C (Baum y col., 2000; Domínguez y col., 2008; Mendoza, 2012). Por tal motivo, se puede considerar que los cambios en el genoma adenovirus a consecuencia de las mutaciones y recombinaciones entre serotipos, han modificado su tropismo, brindándole la capacidad de infectar a una variedad de células en los mamíferos, convirtiéndose en el responsable de un

gran número de enfermedades del sistema respiratorio, gastrointestinal, neurológico, ocular, genitourinario, cardíaco y cutáneo (Kaslow y col., 2014; Lu y col., 2014; Shen y col., 2017). Es por eso que es de suma importancia su vigilancia epidemiológica para poder contribuir a la creación de nuevas estrategias de prevención contra infecciones gastrointestinales de origen viral.

ANTECEDENTES

Gastroenteritis en Niños

La gastroenteritis infecciosa es una de las enfermedades más frecuentes en los humanos, es la segunda mayor causa de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Afecta principalmente a los niños menores de cinco años, se calcula más de 1, 700, 000,000 de casos de diarreas agudas por año, solo para este grupo de la población mundial (Wilhelmi y col., 2003).

Según datos de la organización mundial de la salud (OMS), 2013, las enfermedades diarreicas ocasionaron la muerte de 760,000 niños menores de cinco años, cada año. Concluyendo que en los últimas cuatro décadas han demostrado claramente una disminución de mortalidad infantil, pero una morbilidad constante y esto se debe a los siguientes factores favorables, desarrollo de vacunas, una mejor nutrición infantil, aumento de la lactancia materna y un mejor servicio de salud y oportuno (Victoria y col., 2000; Instituto Mexicano del Seguro Social, 2015).

La gastroenteritis infecciosa aguda se define como una inflamación de la capa gástrica (mucosa) del estómago e intestinos, la cual se manifiesta con diarreas deshidratantes, además de otros síntomas como náuseas, vómito, fiebre, anorexia, depresión y dolor abdominal (Peña y Conejo., 2010). La diarrea puede ser causada por diferentes factores o por diferentes agentes infecciosos. Entre los microorganismos causantes de gastroenteritis se encuentran: bacterias (10-20%), parásitos (<10%) y virus (70-80% de los casos) (Tabla 1) (Elliott, 2007).

Tabla 1. Principales Agentes Infecciosos Causantes de Gastroenteritis.

Virus Causantes de Gastroenteritis en Humanos	
• Rotavirus (grupos A,B,C)	• Calicivirus: Norovirus y sapovirus
• Astrovirus	• Adenovirus entéricos (serotipos 40 y 41)
• Coronavirus	• Torovirus
• picobirnavirus	• Picomavirus: Virus Aichi
Bacterias Causantes de Gastroenteritis en Humanos	
• <i>Escherichia Coli (enteropatagénica)</i>	• <i>Yersinia Enterocolitica</i>
• <i>Shigella Spp</i>	• <i>Salmonella Typhi</i> y <i>S. Paratyphi</i>
• <i>Campylobacter jejuni</i>	• <i>Vibrio cholearea</i>
Parásitos Causantes de Gastroenteritis en Humanos	
• <i>Giardia Lambia</i>	• <i>Entamoeba histolytica</i>
• <i>Cryptosporidium</i>	• <i>Strongyloides stercoralis</i>

Los virus causantes de gastroenteritis pueden infectar por igual a niños, adultos, y ancianos; sin embargo, los niños y los adultos inmunosuprimidos son más susceptibles a desarrollar la enfermedad debido a que su sistema inmunológico no está tan desarrollado o se encuentra comprometido (Roy y col., 1995). En México, las enfermedades gastrointestinales representan una de las principales causas de consulta médica, el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), atendió 2 millones 188 pacientes por enfermedades gastrointestinales, según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición en el año 2012, las infecciones gastrointestinales en México, ocupan el 5° sitio como causa de muerte con 266 decesos (Hernández, 2011).

Adenovirus

Las partículas virales de adenovirus fueron aisladas y caracterizadas por primera vez en 1953 por Rowe y colaboradores del tracto respiratorio superior, específicamente en las amígdalas o adenoides, es por eso que lo nombraron adenovirus por el tejido original del cual fue encontrado (Knipe y col., 2013). Adenovirus es el agente causal de un gran número de patologías clínicas, entre las frecuentes incluye, gastroenteritis, enfermedades respiratorias, infecciones en vías urinarias (cistitis hemorrágica), conjuntivitis y las raras como catarro común, infecciones cutáneas (Exantema petequeal y Síndrome de Stevens-Johnson), nefritis, meningoencefalitis y enfermedades cardíacas (Miocarditis y Pericarditis) (Tabla 2) (Pereira, 2007; Ghebremedhin, 2014).

Tabla 2. Patologías clínicas asociados a adenovirus humano.

ESPECIES DE HAdVs	TIPOS DE INFECCIONES
A	<ul style="list-style-type: none">• Gastroenteritis, Infecciones Respiratorias Agudas y meningoencefalitis.
B tipo 1	<ul style="list-style-type: none">• Queratoconjuntivitis, gastroenteritis, infecciones respiratorias agudas, meningoencefalitis, miocarditis y Cistitis
B tipo 2	<ul style="list-style-type: none">• Gastroenteritis, infecciones respiratorias agudas y cistitis.
C	<ul style="list-style-type: none">• Gastroenteritis, infecciones respiratorias agudas, hepatitis, cistitis, miocarditis y meningoencefalitis.
D	<ul style="list-style-type: none">• Queratoconjuntivitis, meningoencefalitis y gastroenteritis.
E	<ul style="list-style-type: none">• Queratoconjuntivitis e infecciones respiratorias agudas.
F y G	<ul style="list-style-type: none">• Gastroenteritis.

Adenovirus humanos del grupo C (HAdV-1, -2, -5, -6), grupo B (HAdV-3, -7, -14, -21) y grupo E (HAdV-4), son los responsables del 10% de las infecciones respiratorias en infantes, causando nasofaringitis, faringitis, amigdalitis, neumonía, síndrome tipo tos ferina y pulmón Hiperlucido Unilateral, siendo los serotipos 14 y 21 los responsables de provocar infecciones respiratorias agudas mortales, la incidencia aumenta ligeramente a finales de invierno, primavera y principios de verano y son endémicas en la mayoría de los países a nivel mundial, la transmisión ocurre a través de partículas de aerosoles, con un periodo de incubación de 5 a 7 días. Entre estos genotipos, HAdV-7 y HAdV-3 se asocia más frecuentemente en las enfermedades respiratorias, numerosos estudios informan que este genogrupo causa epidemias entre los niños y los espacios llenos de gente (Moom, 1999; Bernaola y Luque, 2002; Li, 2015; Yang y col., 2017).

Las infecciones oculares causados por HAdV, se presentan con patologías clínicas variables, tales como queratoconjuntivitis hemorrágica, fiebre faringoconjuntival, conjuntivitis folicular inespecífica y conjuntivitis papilar crónica, estas patologías se clasifican de leves a graves, donde la queratoconjuntivitis es la forma más severa de las infecciones oculares, la transmisión ocurre por contacto directo con el área infectada a través de las lágrimas, con un periodo de incubación de 8 a 10 días y se presentan síntomas como dolor, ojos rojos, ardor, prurito, lagrimeo, fotofobia, sensación de un cuerpo extraño y secreciones purulentas, en casos más graves puede provocar visión borrosa durante meses o incluso años, disminuyendo la calidad de vida e incluso graves daños económicos, HAdV del grupo C (HAdV-1, -2, -5), E (HAdV-4) y grupo B (HAdV-3, -7, -11) son responsables de brotes esporádicos de conjuntivitis y fiebre faringoconjuntival, circulan en su mayoría en China, África, Australia y Estados Unidos, los del grupo B afecta principalmente a infantes, donde el 30% de los casos presentan lesiones corneales, en los brotes epidémicos se han identificados principalmente serotipos del grupo D (HAdV-8, -19, -37), los cuales son los agentes más comunes en la queratoconjuntivitis hemorrágica, una infección ocular altamente contagiosa y discapacitante, las infecciones oculares causados por Adenovirus predominan en el continente Asiático (Jernigan y col., 1993; Cooper y col., 1998; Adhikary y col., 2001; López y col., 2008; Fedaoui y col., 2016). Por otro lado, se han realizado estudios en tejidos de miocardio donde se han encontrado los genomas de Enterovirus (Coxsackievirus) y Adenovirus del grupo C y B, por lo que se considera una de las causas más comunes de miocarditis aguda (Feldman y McNamara, 2000; Bowles y col., 2003; Sharma y col., 2016).

Adenovirus entéricos pertenecientes al grupo F, serotipos 40 y 41 son responsables del 1-8% de los casos de gastroenteritis aguda en niños menores de cinco años, en países desarrollados y 2-31% en países en desarrollo. La prevalencia se incrementa en pacientes inmunocomprometidos, han surgido brotes esporádicos principalmente en guarderías, escuelas (pre-escolar) y hospitales, por lo que ocupa el tercer lugar entre los virus entéricos, donde rotavirus ocupa el primer lugar, seguido de norovirus (Verma, 2009; Rezaei, 2012; Dashti, 2015). Recientemente algunos adenovirus de serotipos del grupo A (HAdV-12, -31), B₁ (HAdV-3), B₂ (HAdV-11), C (HAdV-1, -2, -5, -6), D (HAdV-15, -17, -32, -33, -38) y G (HAdV-52) se han aislado de manera muy frecuente en brotes de gastroenteritis aguda, al igual que se han reportado casos muy raros de linfadenitis mesentérico, invaginación intestinal, apendicitis y hepatitis donde el agente causal son partículas de adenovirus del grupo C (Bernaola y Luque, 2002; Wold y Horwitz, 2013; Raboni y col., 2014).

Los viriones de adenovirus entéricos infectan selectivamente a los enterocitos maduros de la porción apical de las microvellosidades intestinales sin afectar las células de la cripta, las células del huésped son invadidas por el virus, se replica rápidamente provocando lisis celular y por lo tanto una atrofia de las microvellosidades y una hiperplasia compensatoria de las criptas, con la consecuente malabsorción y pérdida de líquidos (Figura 1A, 1B) (Lundgren y Svensson, 2001; Domínguez, 2008). El 70-80% de los niños menores de cinco años, han adquirido anticuerpos específicos por lo menos para un serotipo de adenovirus humano, no hay predominio estacional y la transmisión es a través de la vía fecal-oral, con un periodo de incubación de 3 a 10 días y con una duración promedio de 9 a 12 días (Moom, 1999).

Clasificación de Adenovirus

Adenovirus pertenece a la familia *Adenoviridae*, la cual se divide en cinco géneros: *Mastadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Atadenovirus*, *Siadenovirus* e *Ichtadenovirus*. Los adenovirus humano (HAdVs) se localizan dentro del género *Mastadenovirus*, que a su vez se divide en siete especies o genogrupos (AdVs A – AdVs G), con más de 50 serotipos, que son capaces de infectar a humanos, en el cual se han logrado clasificar en base a las propiedades antigénicas de las proteínas estructurales de superficie del virión (fibras y

hexones), los hexones contienen numerosos epítomos que pueden ser específicos de grupo localizados en la superficie basal y epítomos específicos de serotipo, localizados en la región de la torre (Figura 2) y son responsables de una fuerte respuesta inmune humoral. Hasta el momento se conocen 72 genotipos, que se han logrado identificar, utilizando diferentes métodos clásicos (propiedades antigénicas: neutralización y capacidad de aglutinar eritrocitos humanos y animales), distancia filogenética, organización del genoma, homología del DNA (G+C%), capacidad de recombinación, ensayos con endonucleasas de restricción y capacidad de provocar tumores en roedores (oncogenicidad) (tabla 3). (Harrach, 2012; Lu y col., 2014; La Rosa y col., 2015; Hage, 2016; Fedaoui y col., 2016). La especie B de HAdV esta subdividido en dos subespecies (B₁ y B₂), esta división se logró mediante ensayos con enzimas de restricción y por cultivo celular, mostrando también tropismos diferentes (Segerman, 2003).

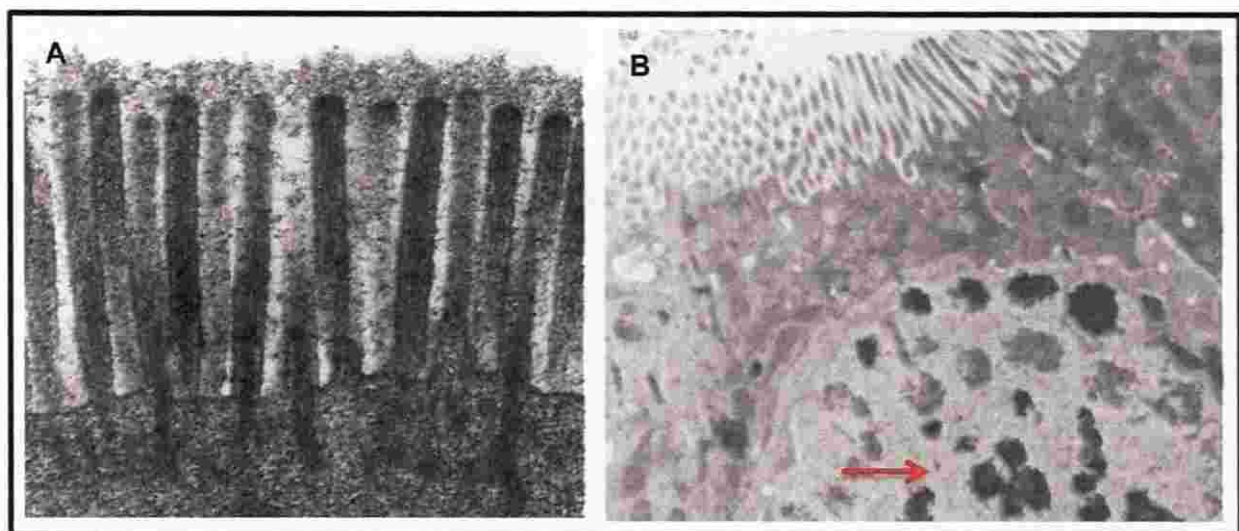


Figura 1. Micrografías de microscopio electrónico de transmisión. A) Microvellosidades intestinales de un animal sano (Dr. Joaquín Carrillo y colaboradores, Facultad de Medicina, UNAM), B) microvellosidades intestinales fetales humanas, de un cultivo celular infectado cinco días antes con Adenovirus Humano tipo 40, flecha roja indica partículas de adenovirus replicándose en el núcleo (Tiemessen y Kidd, 1995).

Tabla 3. Principales serotipos de adenovirus asociados con enfermedades en los humanos modificado de Lu y col, 2014.

% Homología DNA: primer listado porcentaje de homología entre HAdVs de la misma especie, segundo listado porcentaje de homología entre HAdVs de especies diferentes.

Especies	Serotipos	oncogenicidad	Longitud de la fibra (nm)	% Homología	% G+C	Numero de fragmentos (SmaI)
A	12, 18, 31	Alta	28-31	48-69/8-20	47-49	4-5
B ₁ y B ₂	B ₁ (3, 7, 16, 21) y B ₂ (11, 14, 34, 35 y 55)	Media	9-11	89-94/9-20	50-52	8-10
C	1, 2, 5, 6	Negativa	23-31	99-100/10-16	57-59	10-12
D	8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51	Negativa	12-13	94-99/4-17	57-60	14-18
E	4	Negativa	17	4-23	58	19
F	40, 41	Negativa	~29	62-69/15-22	52	10-12
G	52					

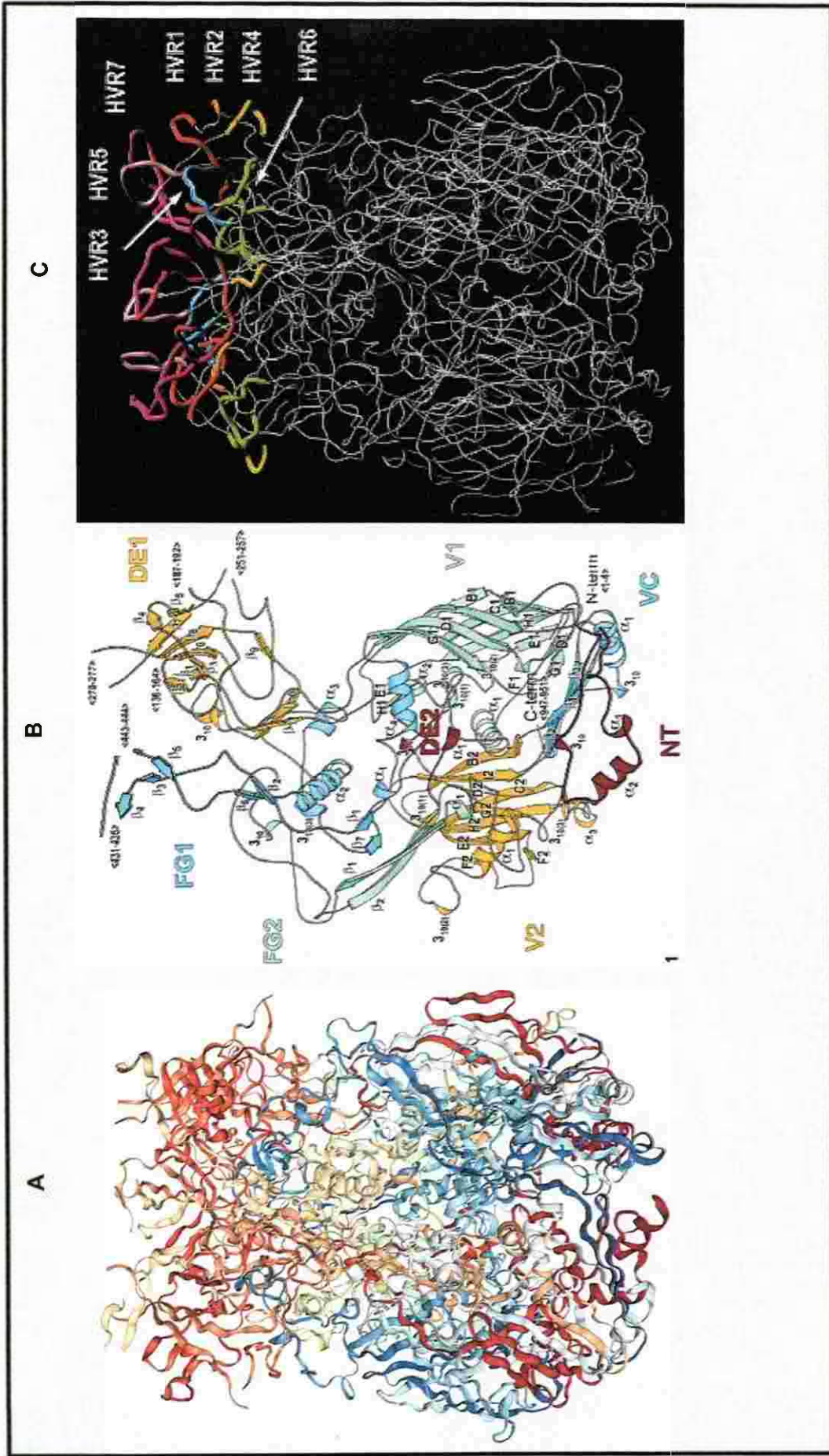


Figura 2. A) Estructura tridimensional de la proteína viral Hexón de adenovirus tipo 5 del grupo C (Protein Data Bank N. De acceso 1RUX), B) Dominios del Hexón ad5 (DE1, FG1 y FG2) que forman la superficie externa de la capsida viral y contienen las siete regiones hipervariables (HVR), C) Las siete regiones hipervariables en el Hexón ad5 que contienen numerosos epítopos que son específicos de serotipo.

Características Estructurales de las Partículas Virales de Adenovirus

Los adenovirus son virus icosaédricos de 70-90 nm de diámetro (Figura 3), su genoma es de DNA lineal de doble cadena de aproximadamente 35 Kpb y tiene dos secuencias de repeticiones terminales invertidas (ITR), localizadas en cada extremo y sirven como orígenes de replicación (Tan y col., 2016; Ballester y col., 2016). La cápside está formada por siete proteínas estructurales, el hexón (II) es la proteína más abundante, se encuentra dispuesto en 240 trímeros, los cuales conforman las 20 caras de la superficie icosaédrica. La base de pentón (III) y la fibra (IV) dan lugar al complejo pentón el cual sella la cápside en cada uno de los 12 vértices de virión; así mismo, estas proteínas están involucradas tanto en el reconocimiento como en la entrada del virus a las células hospederas (Rux y Burnett, 2004; Ebner y col., 2005; Russell, 2009; Liu y col., 2010; Ziros y col., 2015), los polipéptidos VI (217 a.a), VIII (134 a.a) y IX (139 a.a) brindan estabilidad al capsómero, además los polipéptidos VI y VIII unen la cápside con el núcleo central del virión y por último el polipéptido IIIa (566 a.a) se encuentra rodeando al pentón para permitir la unión con el hexón (Flores y col., 2006).

En el núcleo se encuentra el material genético y 6 proteínas, V, VII, IVa2, X, la proteína terminal (TP) y proteasa; las proteínas V y VII se encargan de dar estabilidad al genoma, función similar al que realizan las histonas, la proteína principal en el core es VII; la proteína X (conocida como proteína Mu) es una proteína transactivadora, TP tiene la función de oligonucleótido por lo que se encuentra involucrada en la replicación, esta proteína se encuentra covalentemente unida al final del genoma.

La proteína IVa2 tiene una función específica, de acuerdo al serotipo, la cual es el empaquetamiento del DNA viral, aunque también se ha relacionado como un activador transcripcional del principal promotor tardío (MLP). La proteasa se encarga de catalizar el proceso de maduración de seis proteínas estructurales, lo que resulta esencial para la producción de partículas virales (Zhang e Imperiale, 2003; Cusack, 2005; Gonçalves y Vries, 2006; Liu y col., 2010).

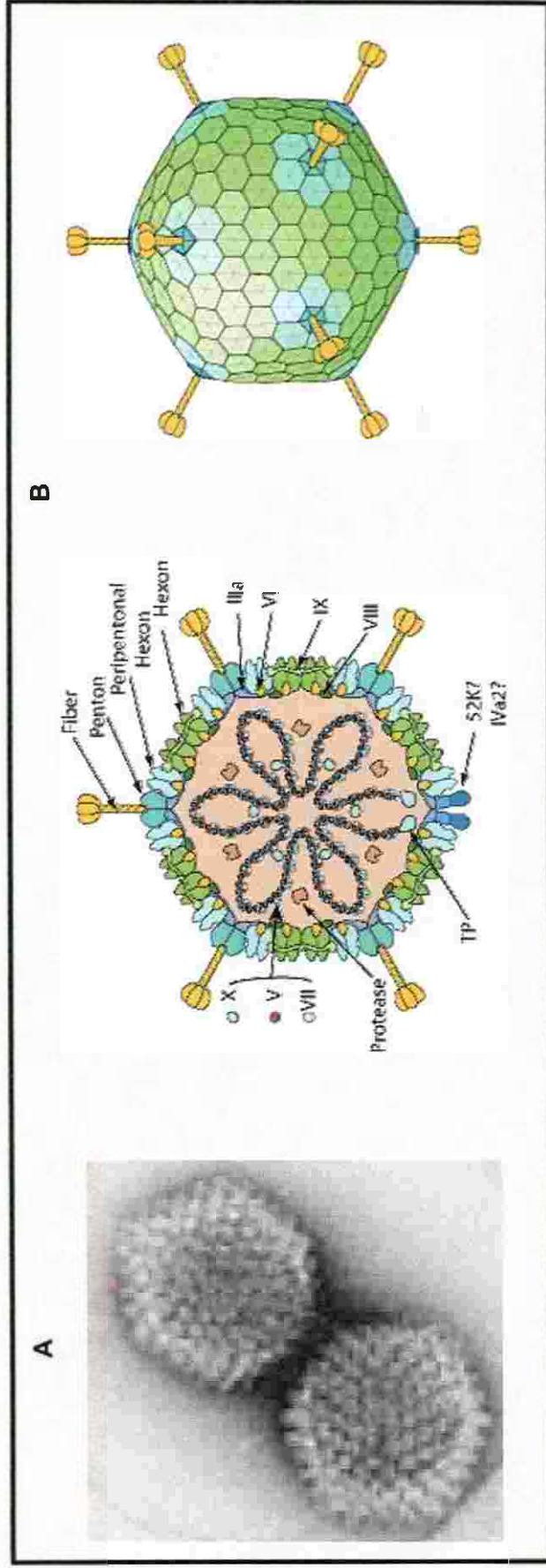


Figura 3. A) Partículas de Adenovirus visualizadas por microscopía Electrónica (Cedidas por el Dr. G. William Gary Jr.) B) Representación esquemática de la estructura de adenovirus basada en la microscopía crio-electrónica v la cristalografía.

Ciclo de Replicación

Adherencia, penetración, desvoltura del virus y entrada al núcleo celular: La entrada del virus a la célula huésped se lleva a cabo por un mecanismo de endocitosis mediada por receptor, empezando con la interacción, entre la proteína estructural de superficie del virión (Fibra) con el receptor CAR (Receptor Coxsackie-Adenovirus) localizado en la membrana de la célula huésped, seguido con la interacción de las integrinas de membrana $\alpha_V\beta_3$ y $\alpha_V\beta_5$ con las secuencias de Arginina-Glicina-Aspartato de los cinco polipéptidos de la base del pentón, ocurriendo como consecuencia la internalización del virión por endocitosis mediada por clatrina. También se han descrito mecanismos de unión a moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de Clase I (CMH-1), CD46, CD80, CD86, ácido sálico y otras glicoproteínas celulares (Wickham y col, 1995; Hong y col., 1997; Lu y col., 2014).

Después de la internalización del virus, la membrana de la vesícula endocítica se fusiona con los lisosomas, acidificando el medio, por lo que las proteínas de la cápside del virión sufren cambios conformacionales, provocando el desprendimiento parcial de algunos de los péptidos, principalmente la proteína hexón (II) y la proteína lítica (VI). La proteína lítica desestabiliza la membrana del endosoma, liberando a la partícula viral al citosol (Flores y col., 2006). Las partículas virales son transportadas desde el espacio citoplasmático hasta el núcleo celular, por la proteína motora kinesina-1 a través de microtúbulos, donde el virión es desprendido de su cápside, para que el genoma viral pueda ser introducido al núcleo por poros de la membrana nuclear.

Transcripción del genoma viral: Una vez que el genoma viral ingresa al núcleo de su célula huésped se inicia el proceso de transcripción en tres etapas, transcripción de genes tempranos (E1A, E1B, E2, E3 y E4), transcripción de genes intermedios (IX y IVa2) y transcripción de genes tardíos (L1, L2, L3, L4, L5) (Figura 4) (Robinson y col., 2011; Ballester y col., 2016).

Unidades de transcripción temprana: Cada una codifica para un número de proteínas los RNA son transcritos por un solo promotor y pueden orientarse en cualquier dirección y se someten a un empalme alternativo para producir varios mRNA (Murray y col., 2009). La subunidad E1A es la primera en ser expresada, codifica para dos proteínas (12S y 13S) indispensables para activar la transcripción de otros genes necesarios para la replicación del genoma viral a través de secuencias TATA, aun no se han definido los elementos que regulan/activan su expresión, pero se conoce su mecanismo de acción, la proteína 12S interactúa con el factor de transcripción TBP (proteína de unión a TATA) y la proteína 13S interactúa con el represor transcripcional Dr1, otra de las funciones de E1A es inducir a la célula huésped a entrar en la fase S del ciclo celular, (Philipson, 1995; Flores y col., 2006; Berk y col., 2007).

La subunidad E1B expresa dos proteínas (E1B1 y E1B2) prolongan la supervivencia celular uniéndose a la proteína p53 inhibiendo la apoptosis (Lu y col., 2014). La unidad transcripcional E2 expresa tres proteínas, el cual tienen la función de proporcionar la maquinaria para la replicación del genoma viral (proteína de unión a DNA, DNA polimerasa y el precursor de la proteína terminal TP) y la consiguiente transcripción de genes tardíos (Ying y col., 2010).

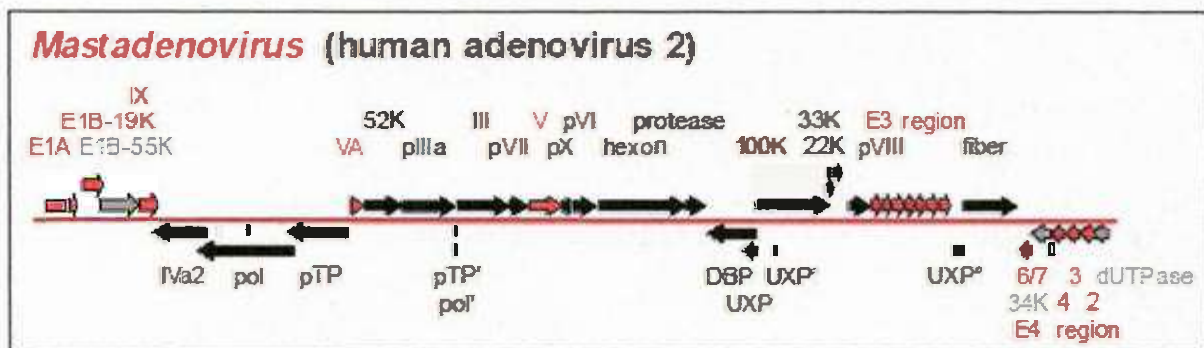


Figura 4. Organización del genoma de Adenovirus tipo 2 del grupo C, las flechas indican la dirección de la transcripción, las de color negro indican genes muy conservados en los cinco géneros (*Mastadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Atadenovirus*, *Siadenovirus* e *Ichtadenovirus*), las de color gris representan genes que se encuentran en más de un género, por último las flechas rojas indican genes específicos del género *Mastadenovirus* cedido por Murphy y col., 2012.

La unidad transcripcional E3 codifica para tres proteínas (19 kD, 14 kD y 10 kD) se clasifica como no esencial en el cultivo y replicación *in vitro*, se han realizado experimentos con adenovirus mutantes que tienen delección de E3 y pueden replicarse eficientemente en cultivos celulares, por lo que hace pensar que estas proteínas son parte de los mecanismos de Adenovirus para evadir o regular la respuesta inmune del huésped, la proteína 19 kD se une a la molécula del CMH de clase I durante su tránsito por el retículo endoplásmico y no permite su transporte a la membrana celular, además E3-19kD puede unirse directamente a TAP (Transportador Asociado al Procesamiento de Antígeno) y bloquea la transferencia de péptidos virales procesados en el citosol a las moléculas del CMH de clase I, por lo que disminuye el número de moléculas presentadoras de antígeno en la superficie de las células infectadas y por lo tanto se inhibe la lisis de las células infectadas por los linfocitos T citotóxicos (CD8⁺).

Las proteínas 14 kD y 10 kD forman un complejo llamado RID (Internalización y degradación del receptor) que estimula la degradación de los receptores Fas y TRAIL vía endocitosis y degradación lisosomal e inhiben la lisis por el factor de necrosis tumoral (TNF), evadiendo la apoptosis mediante el bloqueo de la cascada de señalizaciones de los receptores de la muerte, los productos de la unidad transcripcional E4 regulan la transcripción, la salida de los mRNA del núcleo, el corte y empalme de RNA, la traducción y la replicación del ADN, (Gooding y col., 1991; Philipson, 1995; Shisler y col., 1997; Tollefson y col., 1998; Bennett y col., 1999).

La unidad transcripcional intermedia expresan a dos proteínas a la proteína IX, que se ha demostrado que actúa como proteína cemento reforzando la cápside viral madura, pero también tiene la función de un activador transcripcional antes de ser ensamblada y la proteína IVa2 es un activador transcripcional del principal promotor tardío (MLP) (Lutz y col., 1997).

Replicación del genoma viral: El genoma de adenovirus se encuentra flanqueado por dos secuencias de repeticiones terminales invertidas (ITR) de 100 bp, localizadas en cada extremo y sirven como orígenes de replicación, además se requieren de tres de las proteínas expresadas por los genes E2, la DNA polimerasa, proteína de unión al DNA (DBP) y el precursor de la proteína terminal (pTP). La replicación se inicia con la unión covalente de la DNA polimerasa con el primer residuo desoxicitidina 5'-monofosfato y a un residuo de

serina del precursor de la proteína terminal (pTP), formando un complejo (pTP-C-DNA poi), posteriormente la DNA polimerasa inicia la síntesis de la nueva cadena de DNA (elongación) (Figura 4), la proteína de unión al DNA está implicada en varios pasos de la replicación, protege al DNA de cadena sencilla (ssDNA) de ser degradadas por nucleasas, participa en el desenrollamiento del genoma mediante la formación de multimeros, separa las cadenas de DNA función similar de la helicasa y aumenta la velocidad y procesabilidad de la DNA polimerasa. Una vez sintetizada la primera cadena de ADN, el precursor de la proteína terminal (pTP) madura mediante la acción de la proteasa viral y pasa de ser pTP a TP, la nueva cadena de DNA se circulariza mediante la unión de secuencias complementarias ITR, luego la segunda cadena es sintetizada de la misma manera que la primera, con la intervención de una nueva pTP.

Al mismo tiempo que el genoma viral se replica, se activa la unidad transcripcional de los genes tardíos (L1 - L5) que codifican principalmente las proteínas estructurales del virión, solo se produce un transcrito de 29, 000 nucleótidos de longitud, este transcrito es procesado por corte y empalme, generando 18 mRNA que son traducidos en el citoplasma. (Nagata y col., 1983; Komatsu y Nagata, 2012; Hoeben y Uil, 2017).

Ensamble del virión: La morfogénesis del virión ocurre en el núcleo, se forman los capsómeros de hexón y los capsómeros de pentón, una vez armados se auto-ensamblan, añadiendo la fibra y el resto de las proteínas que estabilizan la capsida, posteriormente se empaqueta el genoma, para que la partícula viral sea estable, infecciosa y resistente a nucleasas, las proteínas de la capsida tiene que sufrir algunos desdoblamiento por la acción de una cisteína proteínasa, el proceso de auto-ensamble es ineficiente ya que el 80% de las proteínas estructurales y el 90% del DNA del virus no se utilizan. El ciclo de vida completo ocurre entre las 24 y 36 horas y genera unos 10^4 viriones por célula infectada.

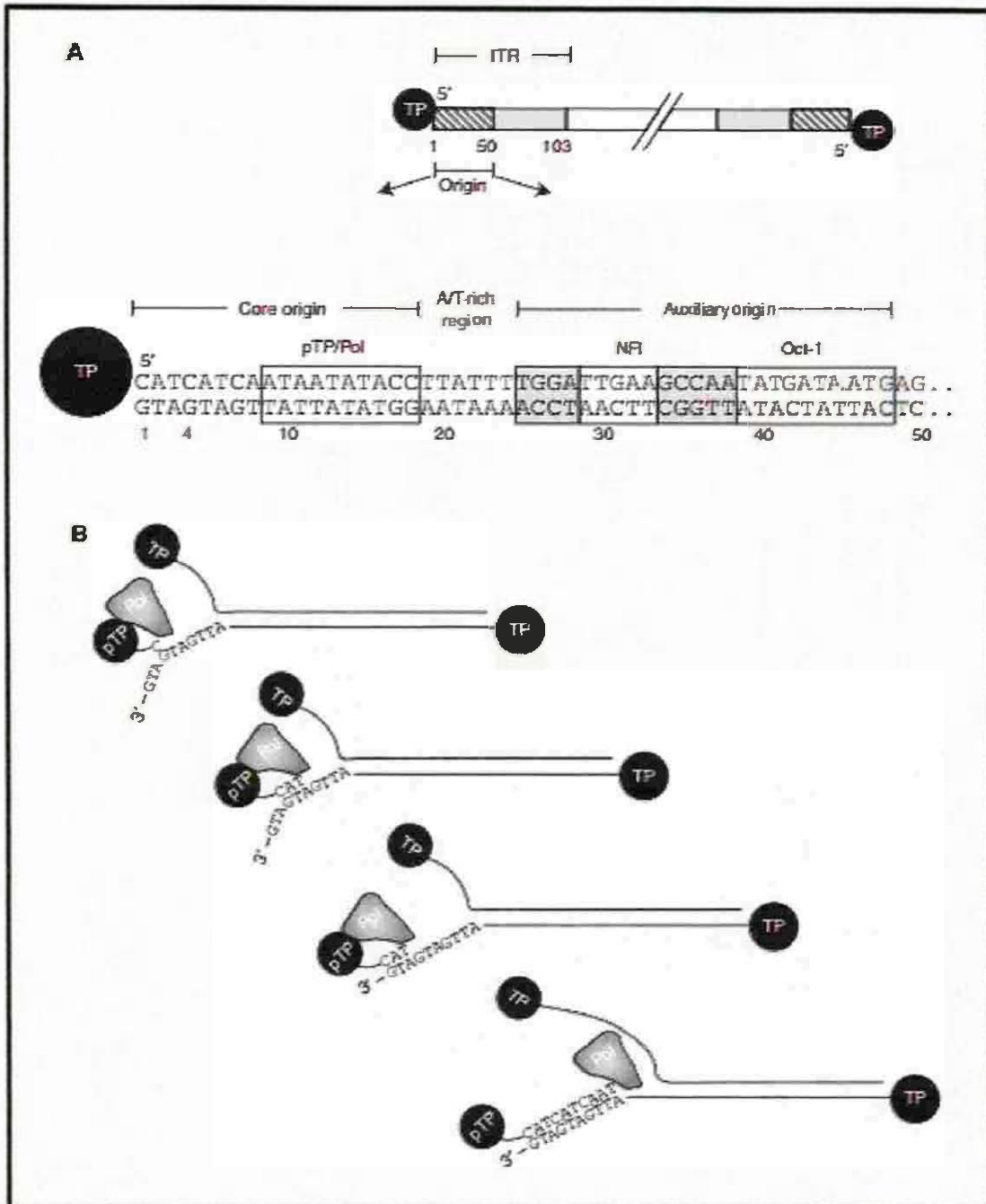


Figura 5. A) Extremos del genoma de adenovirus tipo del grupo C, que contienen las repeticiones terminales invertidas (ITR), donde se encuentra el origen de replicación y las secuencias donde interactúan las proteínas víricas y celulares, para iniciar la replicación del genoma viral. B) Representación esquemática de la iniciación de la replicación del DNA, se ilustra como los nucleótidos 4-6 se usan como molde para la formación del complejo pTP-CAT-DNA poi y como el complejo se desplaza a los nucleótidos 1-3 para continuar con la elongación.

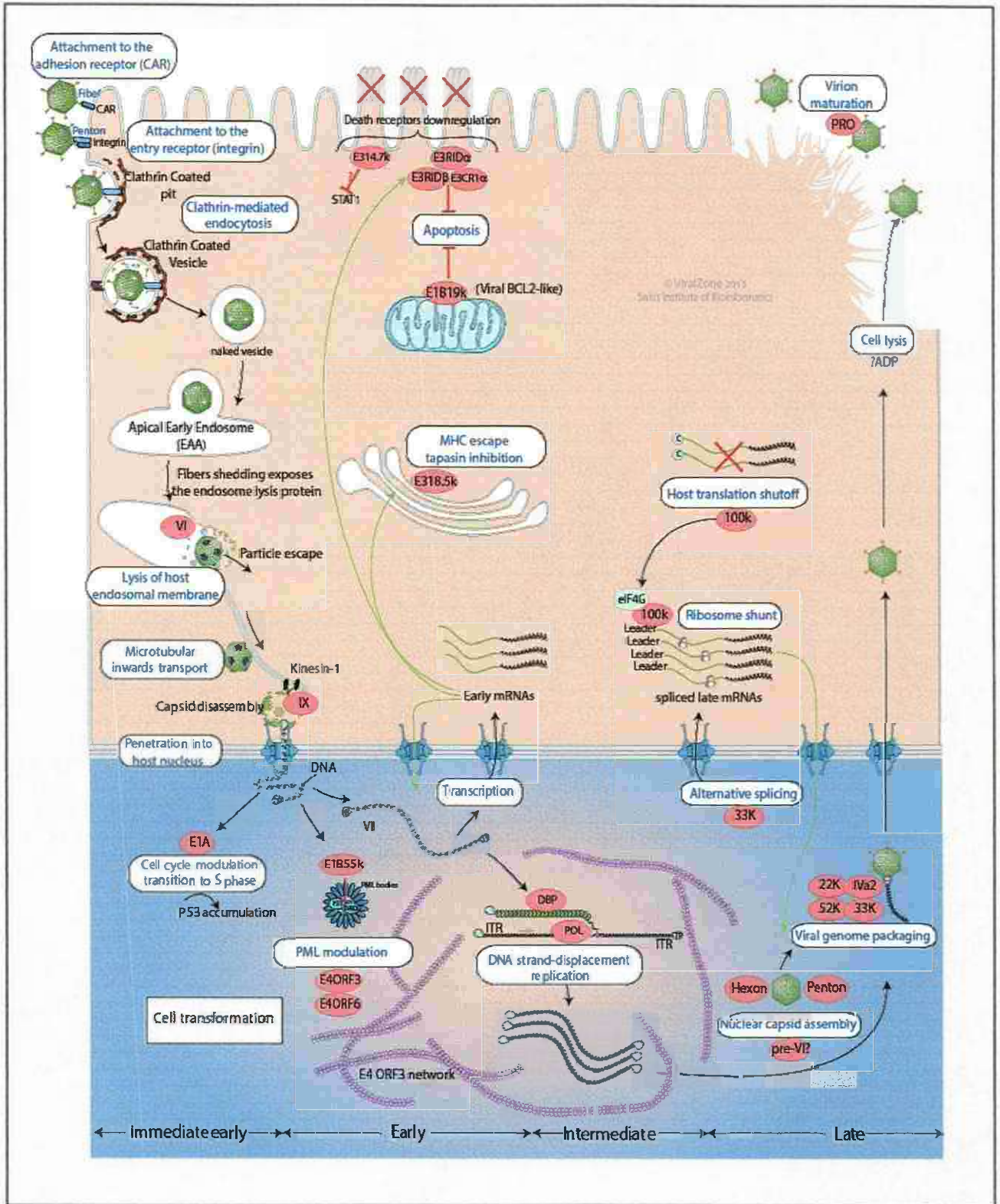


Figura 6. Ciclo de Replicación de Adenovirus cedido de viralzone.

Patogénesis

La infección viral inicia con la interacción de la fibra y base del pentón con la membrana celular; la fibra lleva a cabo el reconocimiento inicial con el receptor CAR y el pentón con las glicoproteínas (integrinas). Los adenovirus humanos causan patologías durante el proceso de replicación viral y lisis de sus células huésped. Estudios de Adenovirus en modelos animales revelan que las partículas virales pueden causar procesos inflamatorios significativos en ausencia de la replicación y lisis celular, por lo tanto las manifestaciones clínicas parecen resultar tanto de la invasión de las partículas virales de Adenovirus a sus células huésped (Infección localizada o diseminada) como de la respuesta inflamatoria del huésped (Lu y col., 2014).

Además Adenovirus tiene la capacidad de interactuar con un gran número de proteínas receptoras y antígenos de superficie celular, es probable que los cambios específicos de genotipo, principalmente en las secuencias codificantes de las proteínas de la capsida (fibra y pentón) sean las responsable del variable tropismo de tejidos. La mayoría de los serotipos de las especies A, C, D, E y F se unen a CAR, la mayoría de los virus de la especie B se unen a moléculas como CD46, CD80 y CD86 (Roelvink y col., 1998; Gaggar y col., 2003; Short y col., 2006).

Las mutaciones puntuales y la recombinación homóloga tienen como resultado nuevos genotipos de Adenovirus, se han realizado estudios, donde se realiza la secuenciación completa del genoma encontrado en pacientes con infecciones Adenovirales, demostrando que los eventos de recombinación son muy comunes. La recombinación ocurre usualmente entre miembros de la misma especie (Intra-especie) o con diferentes especies (Inter-especie), se requiere co-infección de la misma célula, las recombinaciones inter-especies se producen cuando la DNA polimerasa de cualquiera de los HAdV pasa a replicar el DNA del otro serotipo y por consecuencia la evolución molecular es más rápida, resultando nuevos genotipos recombinantes con tropismo celular alterado, aumento de la virulencia y con capacidad de producir nuevos brotes de enfermedades más graves (Lukashev y col., 2017; Cook y Radke, 2017).

En infecciones naturales, Adenovirus ha desarrollado varios mecanismos para evadir y regular la respuesta inmunológica de sus células huésped. Aproximadamente el 1% del genoma viral de Adenovirus se transcribe en RNA no codificante denominado RNA asociados a virus (VA RNA), este transcrito tiene una longitud de 160 pb aproximadamente y forma una estructura similar a un dsRNA, gracias a su secuencia autocomplementaria. La función de los interferones de tipo I es activar la expresión génica de los genes involucrados en la defensa viral como la síntesis de la proteína cinasa R (PKR) o también llamada cinasa dependiente de dsRNA que cumple con la función de fosforilar al factor de iniciación de la traducción eIF2- α , lo que lleva a la **detención de la síntesis de proteínas virales**. Los VA RNA impiden la dimerización y activación de la PKR y por consecuencia impide que la síntesis de proteínas virales se vea afectada (Kitajewski y col., 1986; O'Malley y col., 1989; Kumar y col., 1999; Felty y col., 2015).

En 2015 en China, se realizó un estudio epidemiológico sobre un brote de infecciones respiratorias graves, donde se reveló que HAdV-7 del genogrupo B era el responsable, estudios adicionales como la secuenciación del genoma completo, reveló que en la gran mayoría de sus genes fueron altamente conservados con otras cepas de HAdV-7 responsables de brotes anteriores menos graves, con excepción de la región no codificante denominado VA RNA que fueron altamente variables y con la delección de 12 pb. También se realizó cultivo celular y se comparó la cinética de replicación viral, se demostró que las cepas de HAdV-7 con la región incompleta de la región terminal VA RNA mostraba un crecimiento más rápido en comparación con las cepas que contienen la región completa de VA RNA (Yang y col., 2017).

OBJETIVO GENERAL

Detección y genotipificación de cepas de adenovirus aisladas en niños menores de cinco años con gastroenteritis durante el periodo de estudio.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar partículas virales de adenovirus causantes de gastroenteritis en niños menores de cinco años mediante pruebas rápidas (inmunocromatografía) y técnicas de biología molecular (PCR).
- Identificar los genotipos correspondientes de las cepas circulantes de adenovirus, detectados durante el periodo de estudio, mediante la secuenciación parcial de la región codificante del gen Hexón.
- Analizar la secuencia nucleotídica (mediante programas bioinformáticos) de los genes asociados a la clasificación genotípica de adenovirus (Gen hexón).

MATERIAL Y MÉTODO

Área de Estudio y Muestreo

Las muestras de heces fecales se obtuvieron de niños con gastroenteritis atendidos en el Hospital Regional de Navojoa y el Hospital del Niño y la Mujer en Cd. Obregón. Las muestras se transportaron al laboratorio y se almacenaron a -20°C hasta su análisis. Como criterios de inclusión se consideró la edad del menor, no mayor de 5 años, presentar 3 o más episodios diarreicos en un tiempo no mayor de 24 horas, vómito, fiebre o uno de los síntomas mencionados. Como criterios de exclusión se consideró que la gastroenteritis fuera de origen bacteriano o parasitario y que el infante tuviera más de 5 años. Las muestras obtenidas de niños con gastroenteritis se transportaron al laboratorio de Microbiología e Inmunología (JL-203) de la Universidad de Sonora, Unidad Regional Sur.

Detección de Adenovirus

Para determinar si una muestra era positiva para adenovirus entéricos, se utilizó el kit comercial SD Rota/Adeno Rapid Test de acuerdo a las indicaciones del proveedor (SD Biotec, CTR, S.A. de C.V., Monterrey, N.L.). El protocolo se describe brevemente a continuación: con un hisopo se recolectaron aproximadamente 50 mg de heces que se disolvieron en 4 ml de buffer diluyente, posteriormente se adicionaron de 3 a 4 gotas (120 a 150 μl) de esta mezcla al pocillo de la tira reactiva del kit comercial y se incubó a temperatura ambiente por 20 min. La muestra se determinó positiva para rotavirus y/o adenovirus entérico con la aparición de una banda de color rosa en la línea correspondiente a rotavirus y/o adenovirus en la tira reactiva y otra similar correspondiente al control.

Extracción de Ácidos Nucleicos

De muestras recolectadas se realizó una suspensión de heces al 20% en buffer de fosfatos (PBS), y posteriormente se realizó una extracción de DNA utilizando el kit comercial PureLink® Genomic DNA Mini Kit (ThermoFisher Scientific, Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Amplificación del Gen Hexón de Adenovirus

El DNA extraído de las muestras positivas se sometió a una PCR para amplificar el gen hexón de adenovirus, se realizó una mezcla con un volumen final de 12.5 µl, utilizando PCR Master Mix (2x) (50 U/µl de *Taq* polimerasa DNA, 400 µM de dATP, 400 µM de dGTP, 400 µM de dCTP, 400 µM de dTTP, 3 mM MgCl₂) (PROMEGA®) y oligonucleótidos específicos para genotipos 40 y 41 (Tabla 3), posteriormente se sometió en el termociclador a las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C por 4 min, seguido de 35 ciclos de 3 etapas a 94°C por 1 min, 57°C por 1 min y 72°C por 2 min, finalmente un ciclo de 72°C por 7 min (Verma y col., 2009). El producto obtenido se visualizó en gel de agarosa al 1.5%, tras una corrida electroforética en buffer tris acetato EDTA (TAE) a 100 volts durante 35 min, teñido con SYBR® Safe (Invitrogen), en exposición a luz ultravioleta en el transiluminador.

Tabla 4. Secuencias de oligonucleótidos y tamaño de segmento esperado en la detección de adenovirus (Rezaei y col., 2012).

Oligonucleótido	Polaridad	Secuencia 5' → 3'	Producto (Pb)
Ad1	(+)	TTCCCATGGCICAYAACAC	482
Ad2	(-)	CCCTGGTAKCCRATRITGTA	

Purificación del Producto de PCR

Para realizar la purificación del producto de PCR de rotavirus, astrovirus, adenovirus, norovirus y sapovirus, se utilizó el kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA®), siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación se detalla metodología: se agregó en partes iguales la solución de unión a membrana a la amplificación de PCR (gel). Después se realizó la purificación de DNA por centrifugación, donde se ensambló la mini-columna en el tubo colector, se le agregó el producto de PCR y se dejó incubar por 1 min a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó la mini-columna a 13,500 RPM por 1 min (Centrifuga LabNet International Inc.®).

Se descartó el líquido del tubo colector, para esto se removió la mini-columna, y se volvió a colocar en el tubo una vez descartado el sobrenadante. Se realizaron dos lavados a la mini-columna, al primer lavado se le adicionó 700 µl de solución de lavado y se centrifugó a 13,500 rpm por 1 min, descartando el líquido resultante, el segundo lavado se realizó con 500µl de la solución previamente mencionada y se centrifugó a 13,500 rpm por 5 min. Por último, se transfirió la mini-columna a un tubo eppendorf de 1.5 ml debidamente etiquetado, se le agregó 25 µl de agua libre de nucleasas y se dejó incubar a temperatura ambiente por 1 min y se almacenó a -20°C hasta su uso. Una vez realizada la purificación, a las muestras se les realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en buffer tris acetato EDTA (TAE) a 100 volts durante 35 min, SYBR® Safe (Invitrogen), en exposición a luz ultravioleta en el transluminador (Bio-Imaging Systems MiniBis Pro) con el fin de confirmar la purificación del DNA.

Secuenciación y Análisis de las Secuencias

Una vez realizada la purificación del producto de PCR, se procedió medir la concentración de DNA a una absorbancia de 260; así mismo se verificó su pureza en base a la relación 260/280 en NANODROP 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc.) cuando este se encuentra entre 1.8 y 2.0, se considera óptimo, la muestra contiene exclusivamente ADN, valores menores a 1.8, la cantidad de proteína en la muestra es alta, índice mayor que valores de 2.0 indica rotura del ADN. La secuenciación se realizó directamente del producto de PCR purificado y cuantificado, de acuerdo con las instrucciones de la solicitud de secuenciación, con un volumen final de 16 μ l, en un tubo eppendorf de 0.2 μ l se agregó 120 ng del DNA purificado, mezclado con 10 pmol del oligonucleótido correspondiente (sentido y anti-sentido), la mezcla fue enviada a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca, Morelos, donde fue secuenciada por el método de Sanger.

Las secuencias obtenidas fueron alineadas y se compararon con secuencias ya reportadas en la base de datos GenBank utilizando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor, Posterior se realizó un análisis filogenético en el programa MEGA 7.0, por el método máxima verosimilitud (Maximum likelihood) en base al modelo Tamura-Nei (1993) con 1.000 bootstrap.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Detección de Adenovirus Entérico Mediante Pruebas Rápidas.

Las 179 muestras obtenidas durante el periodo de muestreo en el Hospital Regional de Navojoa y Hospital del Niño y la Mujer de Cd. Obregón, fueron sometidas a las pruebas rápidas comerciales SD Rota/Adeno Rapid Test (SD Bioline, CTR, S.A. de C.V., Monterrey, N.L.). Se obtuvieron 2 muestras positivas de adenovirus (1.11%). Así mismo, se observó la presencia de rotavirus en una de las muestras, por lo que se determinó como co-infección (figura 8).

De acuerdo con los informes médicos de los casos, los pacientes eran infantes con edad \leq 12 meses, presentaron síntomas típicos de enfermedades gastrointestinales tales como diarrea (100%) con una duración de 2 a 4 días y con evacuaciones de hasta 6 veces por día, vómito (50%) y deshidratación (50%) leve, los pacientes fueron hospitalizados (100%).



Figura 7. Pruebas rápidas de detección de rotavirus. A) Prueba SD Rota/Adeno Rapid Test (SD Bioline) positiva para Adenovirus . B) Prueba SD Rota/Adeno Rapid Test (SD Bioline) negativa.

Amplificación del gen Hexón de Adenovirus

Las dos muestras positivas de adenovirus identificadas con las pruebas rápidas, fueron analizadas por PCR bajo las condiciones antes mencionadas, utilizando el juego de oligonucleótidos Ad1/Ad2 (Tabla 4), que se alinean en la posición 1890 y 2372 respectivamente, los cuales amplifican un segmento del gen que codifica para la proteína estructural hexón, sólo una de las muestras amplificó el segmento esperado de 482 pb (Figura 8). La secuenciación de genes de adenovirus combinada con análisis bioinformáticos, proporciona información más precisa para la identificación de nuevos genotipos, mutaciones y recombinaciones. Una vez amplificado el segmento de interés, se procedió a purificar el producto de PCR, el cual fue secuenciado por el método de Sanger. En el análisis de secuencias de la muestra de adenovirus reveló una identidad del 99% con adenovirus humano tipo 6 perteneciente del grupo C (Figura 9). Por su parte, el análisis filogenético de la secuencia codificante obtenida en este estudio y su alineación con otras cepas circulantes en otras regiones del mundo, indicaron que las secuencias fueron fuertemente conservadas entre las cepas reportadas en Japón, Estados Unidos, Argentina, China y Okinawa (Figura 10).

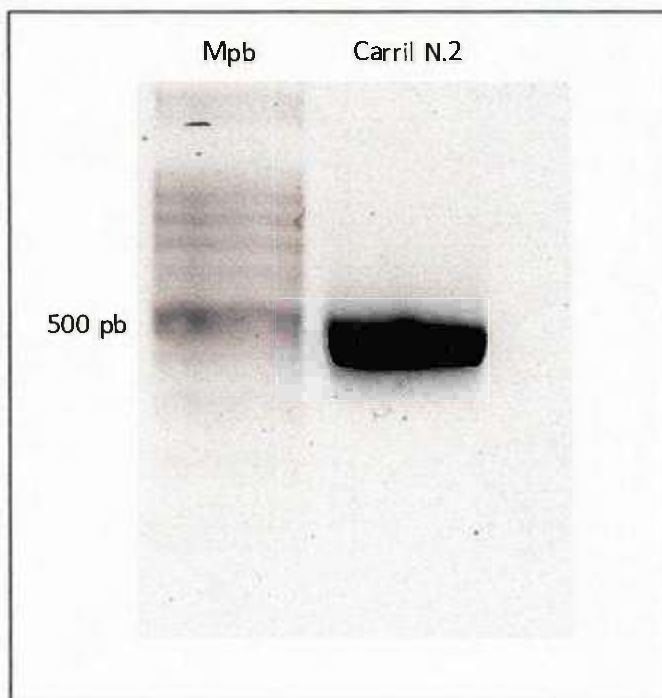


Figura 8. Amplificación del gen hexón de adenovirus carril 1: Marcador de pares de bases; carril 2: Amplificaciones del segmento hexón (482 pb).

Análisis Filogenético

HQ413315.1	HAVv-C	6	T	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
JX223280.1	HAVv-C	1	T	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
JKT173078.1	HAVv-C	1	T	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
NF85158E.1	HAVv-C	1	T	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
AB801052.1	HAVv-C	1	T	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
LC068718.1	HAVv-C	1	T	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
KC632816.1	HAVv-C	1	T	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
AB331086.1	HAVv-C	1	T	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
AB331082.1	HAVv-C	1	T	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
AJ292804.1	HAVv-C	2	T	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
JKT173077.1	HAVv-C	2	T	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
AY224382.1	HAVv-C	2	T	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
NY224382.1	HAVv-C	2	T	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
NM458825.1	HAVv-C	2	T	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
NC898105.1	HAVv-B	55	T	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
CG023122.2	HAVv-G	52	T	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
AB331012.1	HAVv-A	31	T	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
AB331083.1	HAVv-A	10	T	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
AB331075.1	HAVv-D	18	T	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
AB331088.1	HAVv-D	8	T	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
AB331085.1	HAVv-E	4	T	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
AB331086.1	HAVv-B	7	T	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
AB331082.1	HAVv-B	11	T	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
AB331085.1	HAVv-B	14	T	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
AB331012.1	HAVv-B	21	T	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
EF564601.1	HAVv-B	3	T	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
AB331021.1	HAVv-F	41	T	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
AB331032.1	HAVv-F	41	T	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110

HQ413315.1	HAVv-C	6	T	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
JX223280.1	HAVv-C	1	T	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
JKT173078.1	HAVv-C	1	T	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
NF85158E.1	HAVv-C	1	T	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
AB801052.1	HAVv-C	1	T	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
LC068718.1	HAVv-C	1	T	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
KC632816.1	HAVv-C	1	T	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
AB331086.1	HAVv-C	1	T	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
AB331082.1	HAVv-C	1	T	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
AJ292804.1	HAVv-C	2	T	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
JKT173077.1	HAVv-C	2	T	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
AY224382.1	HAVv-C	2	T	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
NY224382.1	HAVv-C	2	T	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
NM458825.1	HAVv-C	2	T	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
NC898105.1	HAVv-B	55	T	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
CG023122.2	HAVv-G	52	T	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
AB331012.1	HAVv-A	31	T	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
AB331083.1	HAVv-A	10	T	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
AB331075.1	HAVv-D	18	T	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
AB331088.1	HAVv-D	8	T	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
AB331085.1	HAVv-E	4	T	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
AB331086.1	HAVv-B	7	T	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
AB331082.1	HAVv-B	11	T	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
AB331085.1	HAVv-B	14	T	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
AB331012.1	HAVv-B	21	T	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
EF564601.1	HAVv-B	3	T	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
AB331021.1	HAVv-F	41	T	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
AB331032.1	HAVv-F	41	T	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220

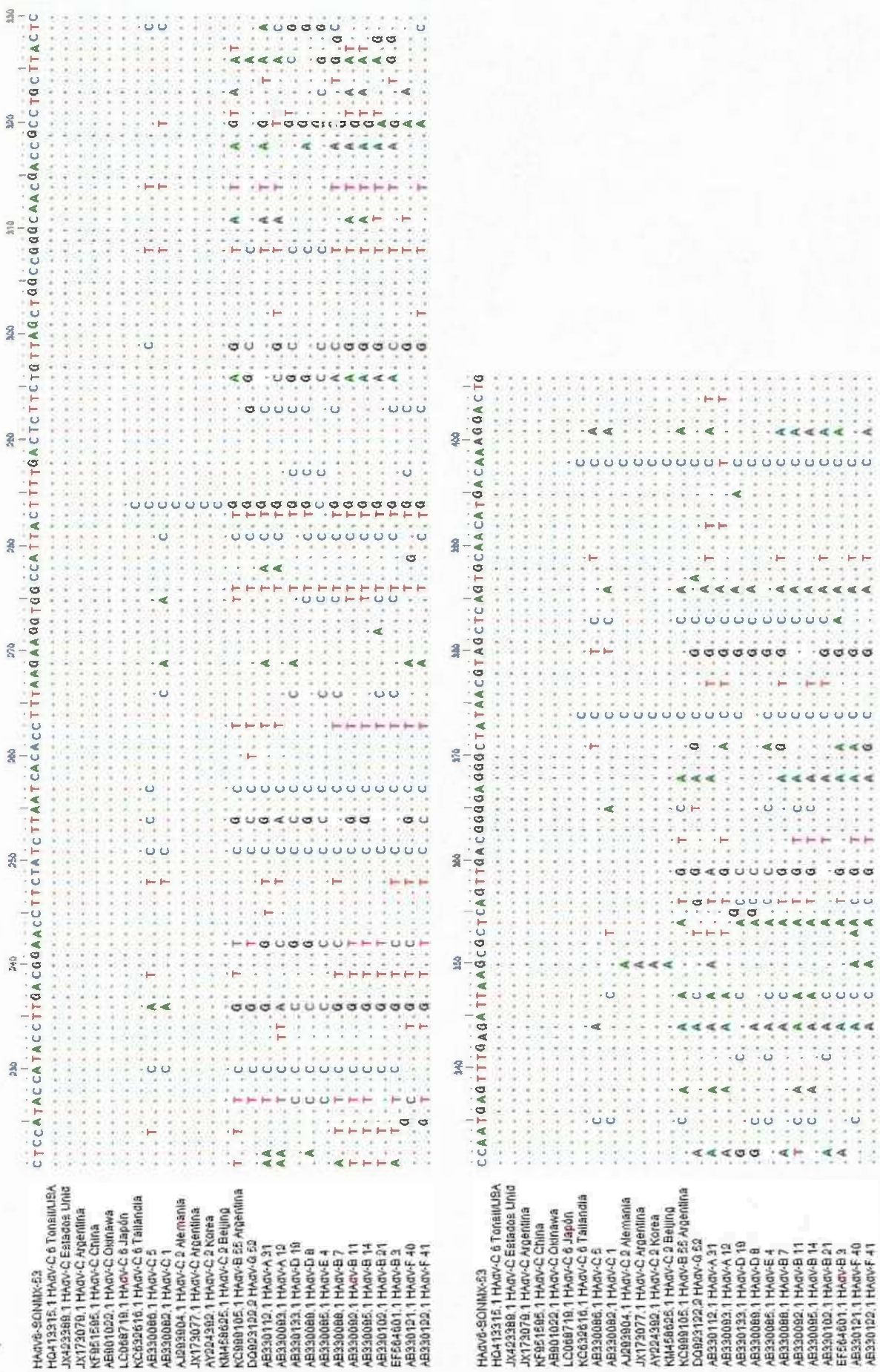


Figura 9. Alineación de secuencias nucleotídicas del fragmento amplificado del gen hexón de adenovirus sub-género C tipo 6 y Otros genogrupos de adenovirus.

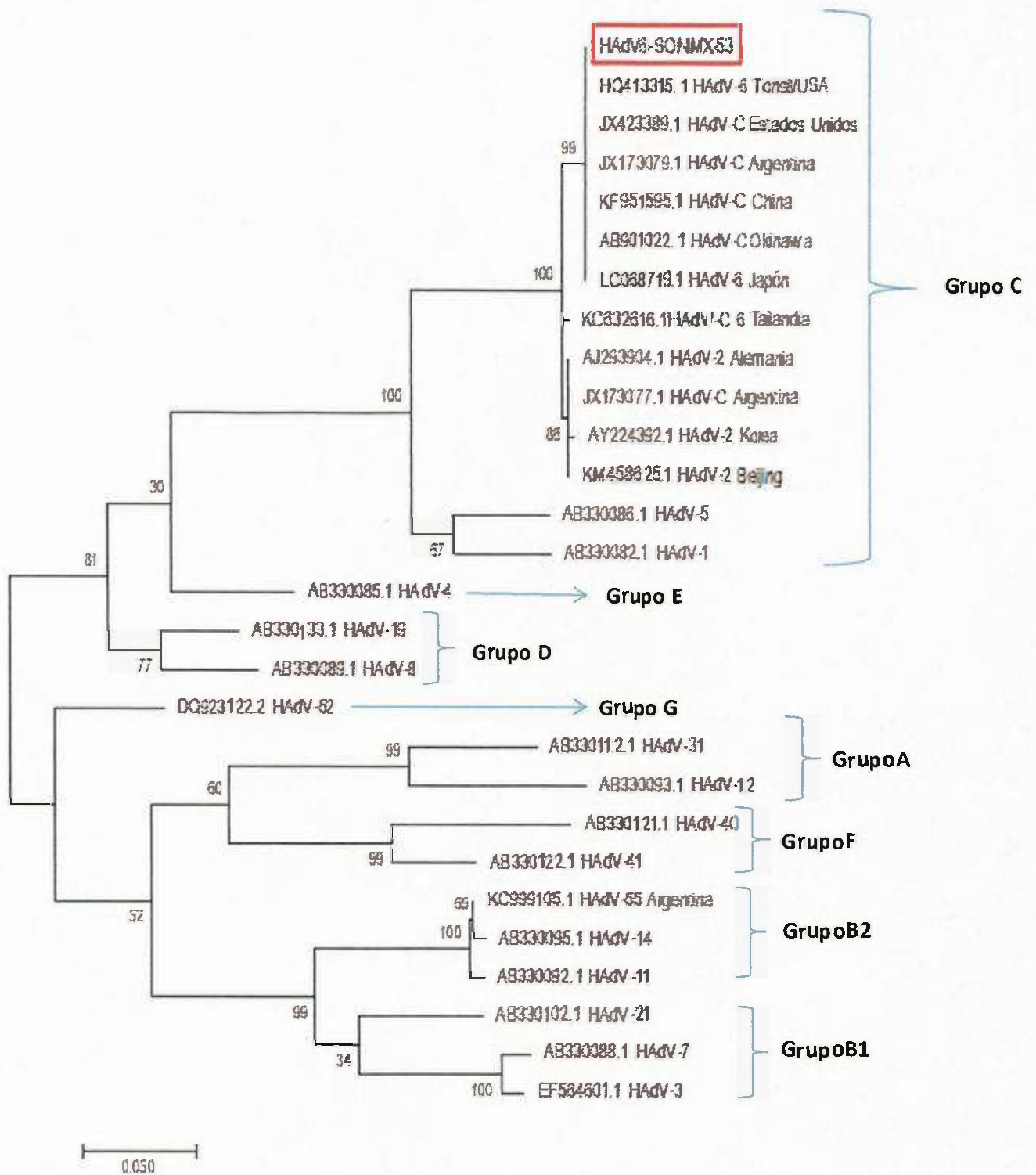


Figura 10. Análisis filogenético del Grupo C, tipo 6 de adenovirus aislado en este estudio y secuencias de referencia reportadas previamente en el GenBank. Se utilizó el método Maximum likelihood en base al modelo Tamura-Nei (1993).

Los adenovirus del grupo F, serotipos 40 y 41, así como el genogrupo A (particularmente serotipo 31), son los que se asocian principalmente con gastroenteritis en niños, sin embargo, otros genogrupo como son, el genogrupo C, D y G han sido asociados con brotes esporádicos de gastroenteritis aguda (Jones y col., 2007; Ghebremedhin., 2014; Lu y col., 2014; La Rosa y col., 2015). Es importante mencionar que el genogrupo C, comúnmente se encuentra más asociado con infecciones del tracto respiratorio; sin embargo, esta especie no entérica de adenovirus, ha sido asociada con adenitis mesentérica, la cual puede imitar una apendicitis y ocasionalmente causar intususcepción en los lactantes y niños pequeños (Ghebremedhin., 2014; Lu y col., 2014). Estudios realizados en Vietnam y Australia para determinar los principales factores y agentes infecciosos causantes de intususcepción intestinal en infantes, demostraron que las infecciones Adenovirales tienen una fuerte asociación con la intususcepción intestinal, ya que fueron detectados en el 37% de los casos, en el cual adenovirus respiratorio del grupo C fue la especie predominante con el 63% (Bines y col., 2010).

CONCLUSIÓN

De las 179 muestras analizadas, dos muestras fueron positivas a HAdV (1.1%), mientras que el análisis de secuencia reveló la presencia de HAdV-C tipo 6, genogrupo más frecuente aislado de pacientes con infecciones respiratorias agudas, HAdV tipo 6 del Grupo C está asociado a brotes esporádicos de gastroenteritis aguda, con la capacidad de causar invaginación intestinal, apendicitis y hepatitis. El análisis filogenético, indicó que la cepa reportada en este trabajo, se ubicaron en el mismo grupo de cepas circulantes en Japón, Estados Unidos, Argentina, China y Okinawa. La epidemiología molecular refleja la importancia de seguir profundizando en la investigación de las cepas circulantes de adenovirus en el país.

BIBLIOGRAFIAS

- Aslow, K., Stanberry, L. R., & Le Duc, J. A. W. (2014). *Viral Infections of Humans*. P.99
- Adhikary, A. K., Numaga, J., Kaburaki, T., Kawashima, H., Kato, S., Araie, M., ... & Ushijima, H. (2001). Rapid detection and typing of oculo-pathogenic strain of subgenus D adenoviruses by fiber-based PCR and restriction enzyme analysis. *Investigative ophthalmology & visual science*, 42(9), 2010-2015.
- Bern, C., Martines, J., De Zoysa, I., & Glass, R. I. (1992). The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: a ten-year update. *Bulletin of the World Health Organization*, 70(6), 705.
- Berk AJ. Adenoviridae. In Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 6th ed. Philadelphia (PA): Lippincott-Raven; 2007. P.1704.
- Bernaola, G., & Luque, W. A. L. T. E. R. (2001). Fisiopatología de las Infecciones por Adenovirus. *Paediatrica*, 4(2).
- Bennett EM, Bennink JR, Yewdell JW, Brodsky FM. Cutting edge: adenovirus E19 has two mechanisms for affecting class I MHC expression. *J Immunol*. 1999;162(9):5049-52.
- Brooks, G. (2011). *Jawetz, Melnick y Adelberg: Adenovirus. Capítulo 32. Microbiología médica (25a. McGraw Hill Mexico*.
- Bowles, N. E., Ni, J., Kearney, D. L., Pauschinger, M., Schultheiss, H. P., McCarthy, R., ... & Towbin, J. A. (2003). Detection of viruses in myocardial tissues by polymerase chain reaction. *Journal of the American College of Cardiology*, 42(3), 466-472.
- Bines, J. E., Liem, N. T., Justice, F. A., Son, T. N., Kirkwood, C. D., De Campo, M., ... & Intussusception Study Group. (2006). Risk factors for intussusception in infants in Vietnam and Australia: adenovirus implicated, but not rotavirus. *The Journal of pediatrics*, 149(4), 452-460.
- Cooper, R. J., Yeo, A. C., Bailey, A. S., & Tullo, A. B. (1999). Adenovirus polymerase chain reaction assay for rapid diagnosis of conjunctivitis. *Investigative ophthalmology & visual science*, 40(1), 90-95.

- Domínguez García Ángela & Toner Gràcia Núria. Estudio Epidemiológico de los brotes de gastroenteritis aguda de etiología vírica en Cataluña. Universidad de Barcelona. Tesis. Barcelona, España. 2008.
- Elliott, E. J. (2007). Acute gastroenteritis in children. *BMJ: British Medical Journal*, 35-40.
- Ebner K, Pinsker W, Lion T. 2005. Comparative sequence analysis of the hexon gene in the entire spectrum of human adenovirus serotypes: phylogenetic, taxonomic, and clinical implications. *Journal of virology*, 79(20), 12635-12642.
- Fedaoui, N., Ben Ayed, N., Ben Yahia, A., Hammami, W., Matri, L., Nacef, L., & Triki, H. (2017). Molecular detection and characterization through analysis of the hexon and fiber genes of Adenoviruses causing conjunctivitis in Tunisia, North Africa. *Journal of medical virology*, 89(2), 304-312.
- Feldman, A. M., & McNamara, D. (2000). Myocarditis. *New England Journal of Medicine*, 343(19), 1388-1398.
- Fedaoui, N., Ben Ayed, N., Ben Yahia, A., Hammami, W., Matri, L., Nacef, L., & Triki, H. (2017). Molecular detection and characterization through analysis of the hexon and fiber genes of Adenoviruses causing conjunctivitis in Tunisia, North Africa. *Journal of medical virology*, 89(2), 304-312.
- Gaggar, A., Shayakhmetov, D. M., & Lieber, A. (2003). CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. *Nature medicine*, 9(11), 1408-1412.
- Ghebremedhin, B. (2014). Human adenovirus: Viral pathogen with increasing importance. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 4(1), 26-33.
- Gooding LR, Ranheim TS, Tollefson AE, Aquino L, Duerksen- Hughes P, Horton TM, et al. The 10,400- and 14,500-dalton pro-6 Adenoviruses teins encoded by region E3 of adenovirus function together to protect many but not all mouse cell lines against lysis by tumor necrosis factor. *J Virol*. 1991;65(8):4114–23.

- Hage, E., Espelage, W., Eckmanns, T., Lamson, D. M., Pantó, L., Ganzenmueller, T., & Heim, A. (2017). Molecular phylogeny of a novel human adenovirus type 8 strain causing a prolonged, multi-state keratoconjunctivitis epidemic in Germany. *Scientific Reports*, 7.
- Harrach B, Benko M, Both GW, Brown M, Davison AJ, Echavarría M, et al. Family Adenoviridae. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ, editors. *Virus Taxonomy Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego, CA: Elsevier Academic Press; 2012. p. 125–41
- Hong S, Karayan L, Tournier J, Curiel DT, Boulanger PA. Adenovirus type 5 fiber knob binds to MHC class I a 2 domain at the surface of human epithelial and B lymphoblastoid cells. *EMBO J* 1997;16:2294-2306.
- Hoeben, R. C., & Uil, T. G. (2013). Adenovirus DNA replication. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(3), a013003.
- Jernigan, J., Lowry, B., Hayden, F., Kyger, S., Conway, B., Gröschel, D., & Farr, B. (1993). Adenovirus Type 8 Epidemic Keratoconjunctivitis in an Eye Clinic: Risk Factors and Control. *The Journal of Infectious Diseases*, 167(6), 1307-1313.
- Komatsu, T. and Nagata, K. (2012) Replication-uncoupled histone deposition during adenovirus DNA replication. *J Virol* 86 (12), 6701-6711
- Kumar, K. U., Srivastava, S. P., & Kaufman, R. J. (1999). Double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) is negatively regulated by 60S ribosomal subunit protein L18. *Molecular and cellular biology*, 19(2), 1116-1125.
- La Rosa, G., Della Libera, S., Petricca, S., Iaconelli, M., Donia, D., Saccucci, P., ... & Divizia, M. (2015). Genetic diversity of human adenovirus in children with acute gastroenteritis, Albania, 2013–2015. *BioMed research international*, 2015.
- Launer-Felty, K., Wong, C. J., & Cole, J. L. (2015). Structural analysis of adenovirus VAi RNA defines the mechanism of inhibition of PKR. *Biophysical journal*, 108(3), 748-757.

- Li, Y., Zhou, W., Zhao, Y., Wang, Y., Xie, Z., Lou, Y., & Tan, W. (2015). Molecular typing and epidemiology profiles of human adenovirus infection among paediatric patients with severe acute respiratory infection in China. *PloS one*, 10(4), e0123234.
- Liu H, Jin L, Koh SBS, Atanasov I, Schein S, Wu L, Zhou ZH. 2010. Atomic structure of human adenovirus by cryo-EM reveals interactions among protein networks. *Science*, 329(5995), 1038-1043.
- Lundgren, O., & Svensson, L. (2001). Pathogenesis of rotavirus diarrhea. *Microbes and infection*, 3(13), 1145-1156.
- Lutz, P., Rosa-Calatrava, M., & Kedinger, C. (1997). The product of the adenovirus intermediate gene IX is a transcriptional activator.
- Martínez-Flores, Francisco; Villegas-Castrejón, Hilda; Jiménez-Orozco, Fausto Alejandro; (2006). *Biología molecular de los vectores adenovirales*. Cirugía y Cirujanos, noviembre-diciembre, 483-493.
- Mejía-López, H., Santacruz-Valdés C., & Matías-Florentino, M.. (2008). Caracterización genética de adenovirus aislados de conjuntivitis folicular y queratoconjuntivitis epidémica en un grupo de pacientes mexicanos. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*, 83(3), 161-168.
- Murray, C. J., Lopez, A. D., Mathers, C. D., & Stein, C. (2001). The Global Burden of Disease 2000 project: aims, methods and data sources.
- Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H., Ghabrial, S. A., Jarvis, A., Martelli, G. P., ... & Summers, M. D. (Eds.). (2012). *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses* (Vol. 10). Springer Science & Business Media.
- Nagata, K. et al. (1983) Adenovirus DNA replication in vitro: synthesis of full-length DNA with purified proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80 (14), 4266-4270
- Patrick R. Murray; Ken S. Rosenthal; Michael A. Pfaller (Abril de 2009). «Capítulo 52: Adenovirus». En Patrick R. Murray. *Microbiología Médica* (6a edición). España: Elsevier-Mosby. pp. 509-515.

- Moon, R. Y. (1999). Adenovirus infections. *Pediatrics in Review*, 20(2), 56.
- Peña, R. M., & Conejo, P. R. (2010). Gastroenteritis aguda. *Protocolos de la Asociación Española de Pediatría y Sociedad Española de Urgencias Pediátricas*.
- Pereira Filho, E., da Costa Faria, N. R., Fialho, A. M., de Assis, R. S., Almeida, M. M. S., Rocha, M., ... & Leite, J. P. G. (2007). Adenoviruses associated with acute gastroenteritis in hospitalized and community children up to 5 years old in Rio de Janeiro and Salvador, Brazil. *Journal of medical microbiology*, 56(3), 313-319.
- Parashar, U. D., Bresee, J. S., & Glass, R. I. (2003). The global burden of diarrhoeal disease in children. *Bulletin of the World Health Organization*, 81(4), 236-236.
- Rezaei, M., Sohrabi, A., Edalat, R., Siadat, S. D., Gomari, H., Rezaei, M., & Gilani, S. M. (2012). Molecular epidemiology of acute gastroenteritis caused by subgenus F (40, 41) enteric adenoviruses in inpatient children. *Laboratory Medicine*, 43(1), 10-15.
- Risso-Ballester, J., Cuevas, J. M., & Sanjuán, R. (2016). Genome-Wide Estimation of the Spontaneous Mutation Rate of Human Adenovirus 5 by High-Fidelity Deep Sequencing. *PLoS Pathog*, 12(11), e1006013.
- Raboni SM, Damasio GAC, Ferreira CE, Pereira LA, Nogueira MB, Vidal LR, Almeida SM. 2014. Acute gastroenteritis and enteric viruses in hospitalised children in southern Brazil: etiology, seasonality and clinical outcomes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 109(4), 428-435.
- Roelvink PW, Lizonova A, Lee JG, Li Y, Bergelson JM, Finberg RW, et al. The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *J Virol*. 1998;72(10):7909–15.
- Robinson, C. M., Seto, D., Jones, M. S., Dyer, D. W., & Chodosh, J. (2011). Molecular evolution of human species D adenoviruses. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(6), 1208-1217.

- Rux JJ, Burnett RM. 2004. Adenovirus structure. *Human gene therapy*, 15 (12), 1167-1176
- Russell WC. 2009. Adenoviruses: update on structure and function. *Journal of General Virology*, 90(1), 1-20.
- Sanaei Dashti, A., Ghahremani, P., Hashempoor, T., & Karimi, A. (2016). Molecular Epidemiology of Enteric Adenovirus Gastroenteritis in under-Five-Year-Old Children in Iran. *Gastroenterology research and practice*, 2016.
- Segerman, A., Arnberg, N., Erikson, A., Lindman, K., & Wadell, G. (2003). There are two different species B adenovirus receptors: sBAR, common to species B1 and B2 adenoviruses, and sB2AR, exclusively used by species B2 adenoviruses. *Journal of virology*, 77(2), 1157-1162.
- Sharma, M., Mishra, B., Saikia, U. N., Bahl, A., Ratho, R. K., & Talwar, K. K. (2016). Role of coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) expression and viral load of adenovirus and enterovirus in patients with dilated cardiomyopathy. *Archives of virology*, 161(1), 87-94.
- Shen, C. F., Wang, S. M., Ho, T. S., & Liu, C. C. (2017). Clinical features of community acquired adenovirus pneumonia during the 2011 community outbreak in Southern Taiwan: role of host immune response. *BMC infectious diseases*, 17(1), 196.
- Shisler J, Yang C, Walter B, Ware CF, Gooding LR. The adenovirus E3-10.4K/14.5K complex mediates loss of cell surface Fas (CD95) and resistance to fas-induced apoptosis. *J Virol*.1997;71(11):8299–306.
- Short, J. J., Vasu, C., Holterman, M. J., Curiel, D. T., & Pereboev, A. (2006). Members of adenovirus species B utilize CD80 and CD86 as cellular attachment receptors. *Virus research*, 122(1), 144-153.
- Snyder, J. D., & Merson, M. H. (1982). The magnitude of the global problem of acute diarrhoeal disease: a review of active surveillance data. *Bulletin of the world Health Organization*, 60(4), 605.

- Tan, B., Wu, L. J., Yang, X. L., Li, B., Zhang, W., Lei, Y. S., ... & Wang, H. Z. (2016). Isolation and characterization of adenoviruses infecting endangered golden snub-nosed monkeys (*Rhinopithecus roxellana*). *Virology Journal*, 13(1), 190.
- Tollefson AE, Hermiston TW, Lichtenstein DL, Colle CF, Tripp RA, Dimitrov T, et al. Forced degradation of Fas inhibits apoptosis in adenovirus-infected cells. *Nature*. 1998;392(6677):726–30.
- Tiemessen, C. T., & Kidd, A. H. (1995). The subgroup F adenoviruses. *Journal of general virology*, 76(3), 481-497.
- Victoria, C. G., Bryce, J., Fontaine, O., & Monasch, R. (2000). Reducing deaths from diarrhoea through oral rehydration therapy. *Bulletin of the World Health Organization*, 78(10), 1246-1255.
- Verma, H., Chitambar, S. D., & Varanasi, G. (2009). Identification and characterization of enteric adenoviruses in infants and children hospitalized for acute gastroenteritis. *Journal of medical virology*, 81(1), 60-64.
- Wilhelmi, I., Roman, E., & Sanchez-Fauquier, A. (2003). Viruses causing gastroenteritis. *Clinical microbiology and infection*, 9(4), 247-262.
- Wold WS, Horwitz MS. 2013. Adenoviruses. In DM Knipe, PM Howley, *Fields Virology*, sixth ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, p. 1732-1767.
- Wickham TJ, Carrion ME, Kovesdi I. Targeting of adenovirus penton base to new receptors through replacement of its RGD motif with other receptor-specific peptide motifs. *Gene Ther* 1995;10:750-756.
- Wickham TJ, Mathias P, Cheresch DA, Nemerow GR. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell*. 1993;73(2):309–19.
- Yang, X., Wang, Q., Liang, B., Wu, F., Li, H., Liu, H., ... Song, H. (2017). Un brote de enfermedad respiratoria aguda causada por una ARN II cepa mutación del gen del virus asociado de adenovirus humano 7 en China, 2015. *PLoS ONE*, 12 (2), e0172519. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0172519>

Ziros PG, Kokkinos PA, Allard A, Vantarakis A. 2015. Development and Evaluation of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for the Detection of Adenovirus 40 and 41. *Food and environmental virology*, 7(3), 276-285.