



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

ASOCIACIÓN ENTRE LA MUTACIÓN SNP
G428A EN EL GEN DE LA $\alpha(1,2)$ -
FUCOSILTRANSFERASA 2 Y LA TASA DE
INFECCIÓN POR NOROVIRUS EN UNA
COHORTE DE RECIÉN NACIDOS
PERUANOS

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRA
EN GENÉTICA HUMANA

ANGIE KATIUSHKA TOLEDO CORNEJO

LIMA - PERÚ

2020

ASESORA

Dra. Mónica Jehnny Pajuelo Travezaño

CO ASESOR

Dr. Jorge Enrique Rodríguez Bailón

JURADO DE TESIS

Dr. Michael John Talledo Albuja
PRESIDENTE

Dra. Theresa Jean Ochoa Woodell
VOCAL

Dra. Larisa Otero Vegas
SECRETARIA

DEDICATORIA

En primer lugar, a las personas que me han apoyado a lo largo de mi carrera profesional, mis padres. Por darme ánimos, acompañarme en cada nuevo proyecto, sufrir conmigo los tropiezos propios del mundo de la investigación y por celebrar y sentirse orgullosos de cada nuevo logro alcanzado. En segundo lugar, a mis hermanas por brindarme su paciencia, inmenso amor y sobre todo, compartir conmigo tantas locuras.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Mónica Pajuelo por ser un ejemplo a seguir como mentora, profesional y persona. Agradezco la confianza depositada en mí y su infinita paciencia para explicar, resolver problemas y guiar. Al Dr. Jorge Rodríguez por ser uno de los mejores docentes en genética y por su apoyo como asesor.

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Principales características y diferencias entre las fucosiltransferasas 1, 2 y 3.....	6
Tabla 2. Características de los niños de la cohorte de recién nacidos de la comunidad periurbana de Lima.....	29
Tabla 3. Factores asociados al número de infecciones por NoV en análisis bivariado de la cohorte de recién nacidos de la comunidad periurbana de Lima.....	31
Tabla 4. Factores independientemente asociados a la tasa de incidencia de infección por NoV en análisis de GLM Regresión Binomial Negativa.....	32
Tabla 5. Análisis bivariado del estado secretor y presencia de polimorfismo G428A de FUT2 de los niños de la cohorte de recién nacidos de la comunidad periurbana de Lima.....	33
Tabla 6. Mutaciones de nucleótido único en región codante del gen FUT2.....	34
Tabla 7. Asociación de número de infecciones por NoV y SNPs en análisis bivariado.....	36
Tabla 8. Comparación de características entre niños incluidos y no incluidos en análisis de secuenciamiento exploratorio	55

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Formación de grupos histosanguíneos.....	5
Figura 2. Reconocimiento de Norovirus a los diversos antígenos de los grupos histosanguíneos.....	12
Figura 3. Flujograma del proceso metodológico seguido en el presente estudio.....	17

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	:	Ácido desoxirribonucleico
Ct	:	Umbral de detección
ELISA	:	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima
ETEC	:	Escherichia coli enterotoxigénica
FUT1	:	α 1,2-fucosiltransferasa 1
FUT2	:	α 1,2-fucosiltransferasa 2
FUT3	:	α -1-4 Fucosiltransferasa
GLM	:	Modelo lineal generalizado
HBGAs	:	Antígenos de grupos histosanguíneos
HMOs	:	Oligosacáridos de leche materna
NoV	:	Norovirus
PCR	:	Reacción en cadena de la polimerasa
SaV	:	Sapovirus
SNP	:	Polimorfismo de nucleótido único
TAE	:	Tris/acetato/EDTA

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO	
II.1. Antígenos de grupos histo sanguíneos (HBGAs).....	4
II.2. Polimorfismos del gen FUT2 y estado secretor.....	7
II.3. Norovirus (NoV).....	8
II.4. Infección por Norovirus y su relación con el estado secretor.....	10
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	13
IV. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	14
V. OBJETIVOS	
V.1. Objetivo general.....	16
V.2. Objetivos específicos.....	16
VI. METODOLOGÍA	
VI.1. Descripción de estudio madre.....	18
VI.1.1. Definiciones.....	20
VI.1.2. Operacionalización de variables.....	21
VI.2. Procedimientos y técnicas para el análisis genético	
VI.2.1. Extracción de ADN genómico.....	23
VI.2.2. Genotipificación de SNPG428A.....	24
VI.2.3. Amplificación de la región codante del gen FUT2.....	24
VI.2.4. Equilibrio de Hardy-Weinberg.....	25
VI.2.5. Análisis estadístico.....	26

VI.3. Consideraciones éticas.....	27
VII. RESULTADOS	
VII.1. Características de la cohorte.....	28
VII.2. Frecuencias genotípicas y alélicas.....	28
VII.3. Equilibrio de Hardy-Weinberg.....	30
VII.4. Análisis bivariado de tasa de incidencia de infección por NoV y presencia de polimorfismo G428A de FUT2.....	30
VII.5. Análisis bivariado del estado secretor y presencia de polimorfismo G428A de FUT2.....	33
VII.6. Mutaciones de nucleótido único identificadas en secuenciamiento exploratorio.....	33
VII.7. Asociación exploratoria entre mutaciones en FUT2 y el número de infecciones por NoV.....	36
VIII. DISCUSIÓN.....	38
IX. CONCLUSIONES.....	45
X. LIMITACIONES Y RECOMENDACIONES.....	46
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
XII. ANEXOS	

RESUMEN

El gen FUT2 codifica la enzima $\alpha(1,2)$ -fucosiltransferasa 2 que cataliza la transferencia de una fucosa al residuo de galactosa de las cadenas tipo 2 de los antígenos de grupos histo sanguíneos (HBGAs por sus siglas en inglés) liberados en mucosa y fluidos secretados. Los HBGAs pueden servir de sitio de anclaje para algunos patógenos como Norovirus que se asocia a aproximadamente 18% de casos de gastroenteritis a nivel mundial y es la segunda causa de diarrea severa en niños. El polimorfismo G428A (rs601338) del gen FUT2 genera una mutación sin sentido en el codón 143 lo que produce una proteína no funcional o trunca. Si un individuo no libera HBGAs en secreciones ni células epiteliales, se le denomina no secretor (se). Existe evidencia de que el estado secretor y no secretor serían factores de riesgo o protección ante ciertos patógenos.

Objetivo: Determinar la asociación entre la presencia de los polimorfismos G y A en la posición 428 del gen FUT2 y la tasa de incidencia de infección por Norovirus en niños menores de 1 año en una cohorte de nacimiento de un distrito periurbano de Lima.

Métodos: La genotipificación del SNP G428A del gen FUT2 fue realizada con ARMS-PCR a partir de ADN genómico aislado de muestras de hisopado oral. Los datos para calcular incidencia de NoV y otros datos sociodemográficos fueron obtenidos de un estudio de cohorte de nacimiento de niños bajo vigilancia activa de 1 a 12 meses de edad.

Resultados: No se encontró asociación significativa entre la presencia de SNP G428A y la tasa de infección por NoV. Se identificó 11 mutaciones de nucleótido simple adicionales, de las cuales 2 no han sido reportadas previamente.

Palabras clave: FUT2, HBGAs, Norovirus, cohorte, Perú.

ABSTRACT

The FUT2 gene encodes the enzyme $\alpha(1,2)$ -fucosyltransferase 2 which catalyzes the transfer of a fucose to the galactose residue of type 2 chains of histo blood group antigens (HBGAs) released in mucosa and secreted fluids. HBGAs can serve as an anchoring site for some pathogens such as Norovirus, which is associated with approximately 18% of cases of gastroenteritis in the world and is the second leading cause of severe diarrhea in children. The G428A polymorphism (rs601338) of the FUT2 gene generates a nonsense mutation in codon 143 which produces a non-functional or truncated protein. If an individual does not release HBGAs in secretions or epithelial cells, it is called a non-secretor (se). There is evidence that the secretory and non-secretory status would be a risk factors or protection factor against certain pathogens.

Objective: To determine the association between the presence of polymorphisms G and A at position 428 of the FUT2 gene and the incidence rate of Norovirus infection in children under 1 year of age in a birth cohort of a peri-urban district of Lima.

Methods: SNP G428A genotyping of the FUT2 gene was performed with ARMS-PCR from genomic DNA isolated from oral swab samples. Data to calculate NoV incidence and other sociodemographic data were obtained from a cohort study of the birth of children under active surveillance from 1 to 12 months of age.

Results: No significant association was found between the presence of SNP G428A and the incidence rate of NoV infection. Eleven additional single nucleotide mutations were identified, of which 2 have not been previously reported.

Key words: FUT2, HBGAs, Norovirus, cohort, Peru.

I. INTRODUCCIÓN

Los antígenos de grupos histo sanguíneos (HBGAs por sus siglas en inglés) son oligosacáridos (1) que pueden estar unidos a proteínas o lípidos que se encuentran en la superficie de los glóbulos rojos y el epitelio mucoso (tractos digestivo, respiratorio y genitourinario) o pueden encontrarse de forma libre en fluidos biológicos (saliva, leche) (2). En los tejidos mucosos humanos se encuentra presente la $\alpha(1,2)$ -fucosiltransferasa 2 (FUT2) que es una enzima que cataliza la transferencia de una fucosa al residuo de galactosa de las cadenas tipo 2 de los HBGAs (3–6) liberadas en mucosa y fluidos secretados (7,8). Estas cadenas pueden servir de sitio de anclaje para algunos patógenos (9).

El polimorfismo G428A (rs601338) del gen FUT2 (GeneID: 2524) ocurre en la posición 428 (se⁴²⁸) del gen generando una mutación sin sentido en el codón 143 que cambia el aminoácido triptófano (Trp) por un codón de terminación. Esto forma una proteína no funcional o trunca. Si un individuo es homocigoto para un alelo no funcional de FUT2, no presenta antígenos ABO en secreciones ni células epiteliales, por ello se le denomina no secretor (se). Si presenta al menos un alelo funcional, presenta antígeno ABO y se le denomina secretor (Se) (10). El fenotipo secretor está determinado por variaciones en la secuencia genómica del gen y estudios publicados entre 1995 y 1998 reportaron que los polimorfismos del gen FUT2 tienen un patrón específico según el grupo étnico (11–13).

En estudios previos, se ha demostrado que *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori* y Norovirus se anclan a glicanos fucosilados en células epiteliales (14–18) de los individuos con fenotipo secretor, lo que favorece la infección del hospedero. Además, la gastroenteritis severa causada por Sapovirus estuvo ausente en niños no secretores (19). Por otro lado, los individuos con fenotipo no secretor mostraron susceptibilidad a infecciones por *Streptococcus pneumonia*, *Haemophilus influenza* y Cándida (20–22). Dicha evidencia apunta a que el estado secretor y no secretor (de dichos glicanos) serían factores de riesgo o protección ante estos patógenos (18,23). En un estudio realizado en Estados Unidos, se observó que el efecto protector contra gastroenteritis causada por Rotavirus dado por el fenotipo no secretor por mutación en el gen FUT2 era mayor que el efecto protector dado por la vacunación ante el patógeno.

A nivel mundial, las diarreas son la tercera causa de muerte en niños menores de 5 años, de las cuales, la mayoría ocurre en países en desarrollo (24). Diferentes patógenos causan diarrea en niños, por ejemplo, Norovirus (NoV), Sapovirus (SaV) y *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC).

Debido a que las variaciones genéticas de FUT2 y los fenotipos secretor o no secretor varían de acuerdo al grupo étnico, se considera importante realizar este estudio en la población peruana con el fin de identificar a la población que es naturalmente inmune a contraer y desarrollar infección

por NoV. Obtener resultados favorables, puede contribuir al desarrollo de terapias enfocadas a bloquear los sitios de anclaje presentes en los HBGAs (19). De igual manera, podría brindar información para futuras investigaciones del comportamiento del virus en relación a la genética del hospedero.

II. MARCO TEÓRICO

II.1. Antígenos de grupos histo sanguíneos (HBGAs)

Inicialmente fueron llamados “antígenos de grupos sanguíneos” porque primero se identificaron en la superficie de los eritrocitos; posteriormente, se demostró que también se encontraban en la mayoría de tejidos epiteliales y secreciones, por lo que se sugirió usar el término “antígenos de grupos histo-sanguíneos” para aquellos antígenos de grupo sanguíneo que se encontraran además, en células diferentes a los eritrocitos (8). Son carbohidratos que para ser sintetizados requieren de glicosiltransferasas específicas (25) que son codificadas por genes polimórficos, por lo tanto, su expresión varía entre tejidos.

La estructura central de los HBGAs puede ser de 4 tipos (Galpl-3GlcNAcpl-R, GalP1MGlcNAcpl-R, Galpl-3GalNAcal-R, Galpl-3GalNAcpl-R.) y a partir de ellas se puede sintetizar antígenos de grupo sanguíneo ABO y Lewis. En humanos, la regulación de la expresión de antígenos ABO requiere de la presencia de dos $\alpha(1,2)$ -fucosiltransferasas (FUT) que son enzimas que catalizan la transferencia de una fucosa al residuo de galactosa de las cadenas tipo 1 y tipo 2 (3–6). La primera es la enzima H que es codificada por el gen *H* (FUT1) y regula la expresión de antígenos ABO en la membrana de los eritrocitos (Figura 1.) (26) y la segunda es la enzima Se que es codificada por el gen *Se* (FUT2) y regula la expresión de los mismos antígenos en mucosa y fluidos secretados (7,8). Por otro lado, la expresión del fenotipo Lewis depende de la acción de

α 3/4-Fucosyltransferasa (FUT3) (26). En la tabla 1 se presenta de forma resumida lo expuesto en esta sección.

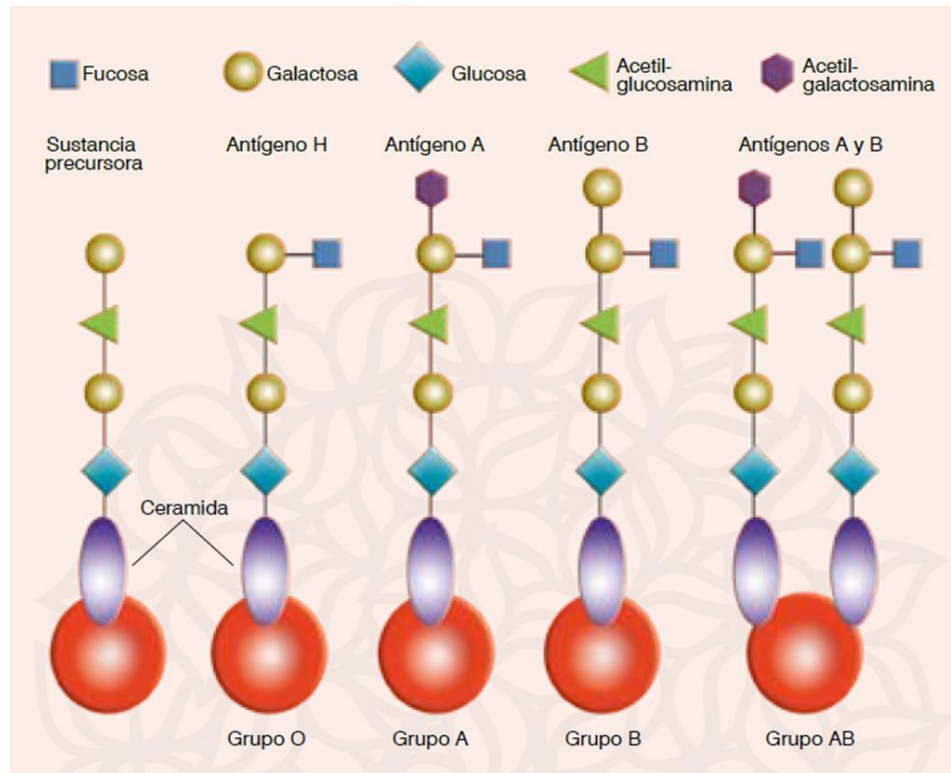


Figura 1. Formación de grupos histosanguíneos. La sustancia precursora de los antígenos de grupo sanguíneo ABO requiere que se incorpore una fucosa para la formación del antígeno H. Posteriormente, pueden ser añadidas la acetil-galactosamina o galactosa para la formación de los antígenos A y B (27).

Tabla 1. Principales características y diferencias entre las fucosiltransferasas 1, 2 y 3.

	FUT1	FUT2	FUT3
Sistema sanguíneo	ABO	ABO	Lewis
Gen	H	Se	Le
Enzima codificada	α 1,2-Fucosiltransferasa	α 1,2-Fucosiltransferasa	α 3/4-Fucosiltransferasa
Genera	Precursor H	H secretado	Precursor H y/o H secretado
Ubicación	Superficie de eritrocitos	Secreciones y tejido mucoso	Superficie de eritrocitos, tejido epitelial y tejido mucoso

II.2. Polimorfismos del gen *FUT2* y estado secretor

El gen *FUT2* (GeneID: 2524) tiene un tamaño de 9 980 pb constituido por un intrón de 6 865 pb y dos exones; el primero tiene un tamaño de 118 pb y es una región codificante no traducida, el segundo tiene un tamaño de 2 995 bp y codifica la proteína $\alpha(1,2)$ -fucosiltransferasa conformada por 343 aminoácidos (28). Esta proteína es una enzima que regula la síntesis de antígeno H, precursor de los antígenos de grupo histo sanguíneo ABO que se encuentran en mucosa y fluidos corporales (10,11). Por lo tanto, el estado secretor de un individuo está asociado a la expresión de antígeno H. Se ha identificado muchas variantes alélicas para este gen, las cuales dan lugar a diferentes fenotipos, tales como, secretor, secretor débil y no secretor. Si un individuo es homocigoto para una variante alélica no funcional de *FUT2*, no sintetiza el antígeno H y, por lo tanto, no presenta antígenos ABO en secreciones ni células epiteliales, por ello se les denomina no secretores (se). Si presentan al menos una forma alélica funcional, sintetizan antígeno H y, por lo tanto, presentan antígenos ABO y se les denomina secretores (Se) (10).

Estudios publicados evidencian que los patrones de polimorfismos presentes son específicos a los grupos étnicos. Por ejemplo, el fenotipo no secretor se encuentra entre 20-30% en poblaciones europeas y africanas (10), cerca del 40% en población India (29), 15% en población de Dinamarca (30) y 12% en población ecuatoriana (31). Con respecto al estado secretor, los polimorfismos más frecuentes son Se^{357} , Se^{480} en

Sudáfrica, región Xhosa (11,12) y Se⁴⁰, Se³⁷⁵, Se⁴⁸¹ en europeos, xhosas y ganeses (12,32). En el caso del fenotipo no secretor, se ha identificado los polimorfismos se⁴²⁸ en europeos, africanos, iraníes (11,12) y ecuatorianos (31), se³⁸⁵ en asiáticos del este y sudeste (26,32–34), se³⁰² en poblaciones Thai y de Bangladesh (34,35) y se⁵⁷¹ en samoanos (34).

II.3. Norovirus (NoV)

Norovirus es miembro de la familia Caliciviridae y se encuentra dividido en seis genogrupos (GI - GVI) de los cuales los genogrupos I, II y IV infectan a humanos (36). El periodo de incubación del virus en personas que desarrollan síntomas de la infección suele variar entre 28.8 y 52 horas (37–39). Se trata de un enteropatógeno humano que causa gastroenteritis con diarrea acompañada por náuseas, vómitos, dolor abdominal y fiebre (40); está asociado a cerca del 18% de casos de gastroenteritis a nivel mundial (41). Además, es la segunda causa de diarrea severa en niños y la principal causa de muertes asociadas a gastroenteritis en adultos mayores de 65 años según estudios realizados en Inglaterra, Gales, Países Bajos y Estados Unidos (42–45).

Según los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de Estados Unidos, NoV es responsable de 21 millones de casos de gastroenteritis aguda y de 71 000 hospitalización anuales (46). En una cohorte de niños en un distrito periurbano de Lima, Perú se observó que,

de los 789 niños seguidos hasta los dos años de edad, 71% presentó al menos un episodio de diarrea asociado a NoV (47).

El genotipo 4 del genogrupo II (GII.4) es el más predominante en Europa y América del Norte, llegando a causar cerca del 70% de los brotes epidémicos (48) que ocurren cada 2 a 4 años (49). En Perú, también ha sido reportado como el agente más frecuente en infecciones en comunidad (47). Debido a su relativa alta tasa de mutación, en relación a otros genotipos se ha propuesto que presenta una evolución parecida a la de los virus gripales (50), razón por la cuál es más fácil que los anticuerpos no lo reconozcan. En un estudio realizado en Ecuador (31), se obtuvo que 60% de los niños de la cohorte del estudio presentaron al menos una infección por NoV durante los primeros tres años de vida, 40% tuvo dos infecciones y 16% tuvo más de 2 infecciones. La incidencia de diarrea causada por NoV fue mayor entre los 6 y 11 meses de edad. Además, se obtuvo que 61% de las muestras fueron positivas para el GII, 34% fue positivo para GI y 5.2% fue positivo para GI y GII.

En Perú, un estudio detectó una prevalencia de NoV del 17.4%, siendo más frecuente en niños con más de un año de edad (51). El GII se encontró en 92% de las muestras positivas para NoV en contraste con el GI que se encontró en el 8% (51). En otro estudio realizado en un distrito periurbano de Lima (47), se encontró que al menos 1 episodio de diarrea asociado a NoV se presentó en 38% y 71% de los niños a la edad de 1 y 2 años,

respectivamente. Adicionalmente, se halló que 75.8%, 23.1% y 1.1% de las muestras fue positiva para GII, GI y combinación GI/GII, respectivamente.

La infección asintomática por NoV es común sobre todo en los niños. En un estudio realizado en una zona periurbana de México, se detectó NoV en 49.2% de muestras de heces de niños asintomáticos. Mientras que en adultos, se ha detectado entre 1.02 y 3.4% de excreción de NoV en manipuladores de alimentos asintomáticos (52,53). En Perú, Saito reportó que durante el primer año de vida, 33% de infecciones fueron asintomáticas, siendo el porcentaje estadísticamente mayor en niños menores de 6 meses (47).

II.4. Infección por Norovirus y su relación con el estado secretor

En un estudio en el que se inoculó NoV a un grupo de voluntarios, un porcentaje no llegó a infectarse a pesar de realizar varias pruebas (54,55), por lo que se sugirió que los HGBAs y el estado secretor podría estar relacionados con la infección por NoV (16,23,56). Posteriormente, en 2008, dos brotes de NoV permitieron asociar fuertemente la presencia de infección y el estado secretor de los individuos debido a que se observó que todas las infecciones sintomáticas ocurrieron en los individuos secretores, mientras que no hubo infección en aquellos no-secretores (57).

Estudios epidemiológicos han demostrado que la infección por NoV depende del estado secretor del individuo y del genotipo y genogrupo del virus ya que individuos no-secretorees debido a mutaciones en FUT2 fueron menos susceptibles a infección sintomática por NoV GI.1, GII.3 y GII.4 (57–59), pero no hubo disminución de susceptibilidad en infección por GI.3 y GII.3 (59,60).

Un estudio realizado en Ecuador, encontró que el estado no secretor confería protección ante infección por NoV del genotipo GII.4, sin embargo había mayor infección por otros genotipos diferentes a G.II (31). La limitante de ese estudio fue la baja de frecuencia de colección de muestras de infecciones asintomáticas lo que genera una subestimación de la real presencia de infecciones por NoV.

Se ha demostrado que la unión de NoV a los HBGAs es dependiente del genotipo y genogrupo del virus, además del tipo de glicosacárido presente en los HBGAs. Por ejemplo, en la figura 2, se observa que NoV es capaz de reconocer los glicosacáridos de los antígeno A, B, O y Lewis (61).

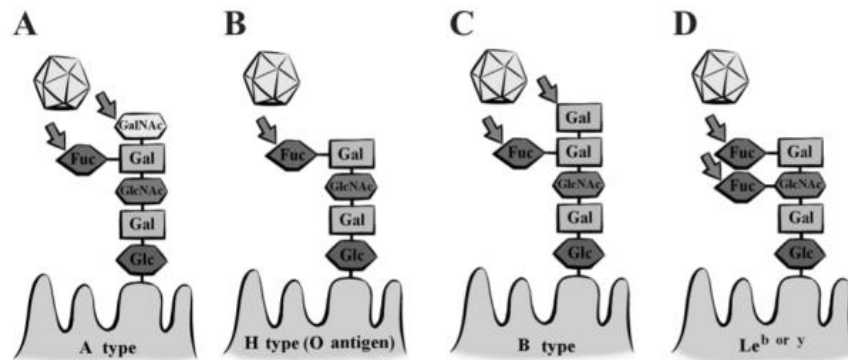


Figura 2. Reconocimiento de Norovirus a los diversos antígenos de los grupos histosanguíneos. Norovirus reconoce (A) la fucosa y N-acetilgalactosamina en el antígeno A. (B) También, reconoce la fucosa en el antígeno O. (C) Puede unirse a la fucosa y galactosa en el antígeno B. (D) En los grupos sanguíneos Lewis b o y, puede adherirse a las fucosas (61).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Conociéndose que en una cohorte de niños seguidos hasta los dos años de edad en un distrito periurbano de Lima, 71% presentó al menos un episodio de diarrea asociada a NoV (47) y que 33% de infecciones fueron asintomáticas durante el primer año de vida, sería importante conocer si existe inmunidad natural asociada al genotipo y estado secretor en FUT2.

Son escasos los estudios realizados en países en vías de desarrollo, sobre todo en Latinoamérica. Sólo se ha realizado un estudio en Ecuador en el que explora la asociación entre el estado secretor de FUT2 en los individuos y su asociación a la presencia de infección por NoV. Por esta razón se conoce poco sobre el proceso de infección del virus en poblaciones latinoamericanas. En ese estudio se encontró que todas las infecciones por NoV GII.4 se presentaron en individuos secretores, mientras que infección por otros genotipos se presentaban en no secretores (31). Sus limitaciones fueron que la frecuencia de colección de muestras de rutina fue cada seis meses lo que hace posible que no se haya detectado infecciones asintomáticas subestimando la tasa de infecciones por NoV. Además, tuvieron pérdidas temporales de seguimiento lo que deja abierta la posibilidad de que no se haya detectado todas las infecciones sintomáticas.

IV. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Según un estudio de la fase 3 del Proyecto 1000 genomas, la ancestría de la población peruana proviene, principalmente, de nativos americanos. En menor proporción, se detectó ancestría europea y la ancestría africana fue poco detectada (62). Además, el análisis de segmentos genómicos determinó que los peruanos presentan mayor afinidad con los pueblos indígenas locales como quechuas y aymara (63).

La mutación G428A es una de las más comunes y ha sido encontrada en población Ecuatoriana que tiene un fuerte componente nativo americano en su ancestría (64,65). Esta mutación es importante porque genera una proteína trunca y hace que la actividad de FUT2 sea completamente nula a diferencia de otras mutaciones reportadas (23,66,67). Además, existe evidencia de resistencia a infección por NoV cuando esta mutación está presente (58,68).

Considerando que la población nativo americana ha sido poco estudiada a nivel genético y que el estado secretor y la variabilidad genética del FUT2 son específicas a los grupos étnicos, es relevante realizar este estudio en la población peruana. La información será útil para identificar población naturalmente inmune a desarrollar infección por NoV y contribuirá al conocimiento del comportamiento del virus en relación a la genética del hospedero lo que puede contribuir al desarrollo de terapias enfocadas a bloquear los sitios de anclaje presentes en los HBGAs (19). Conocer la

historia de la infección por NoV, así como su diseminación es importante para generar con éxito una vacuna (69).

V. OBJETIVOS

V.1. Objetivo general

VI.1.2. Determinar la asociación entre la presencia de los polimorfismos G y A en la posición 428 del gen FUT2 y la tasa de infección por Norovirus en niños menores de 1 año en una cohorte de nacimiento de un distrito periurbano de Lima.

V.2. Objetivos específicos

VI.2.2. Estimar la variabilidad genética de los polimorfismos G y A en la posición 428 del gen FUT2 en una cohorte de recién nacidos peruanos de una cohorte de un distrito periurbano de Lima.

VI.2.2. Evaluar la relación entre la presencia de polimorfismos del gen *FUT2* y el estado secretor.

VI.2.3. Determinar si la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg.

VI. METODOLOGÍA

Este es un estudio observacional, se genotificó el SNP G428A del gen FUT2 a partir de muestras de hisopado oral en niños menores de 12 meses. Luego, se asoció la presencia del SNP con los datos de incidencia de norovirus y otros datos sociodemográficos de los niños provenientes de un estudio de cohorte de nacimiento al que denominaremos estudio madre.

El flujograma de la figura 3 muestra el orden secuencial de los procesos realizados para la genotipificación de G428A de FUT2. Posteriormente, se desarrolla detalladamente cada uno de ellos. Los datos de infecciones por NoV, estado secretor, grupo sanguíneo y otros datos utilizados para el análisis estadístico fueron obtenidos del estudio madre.

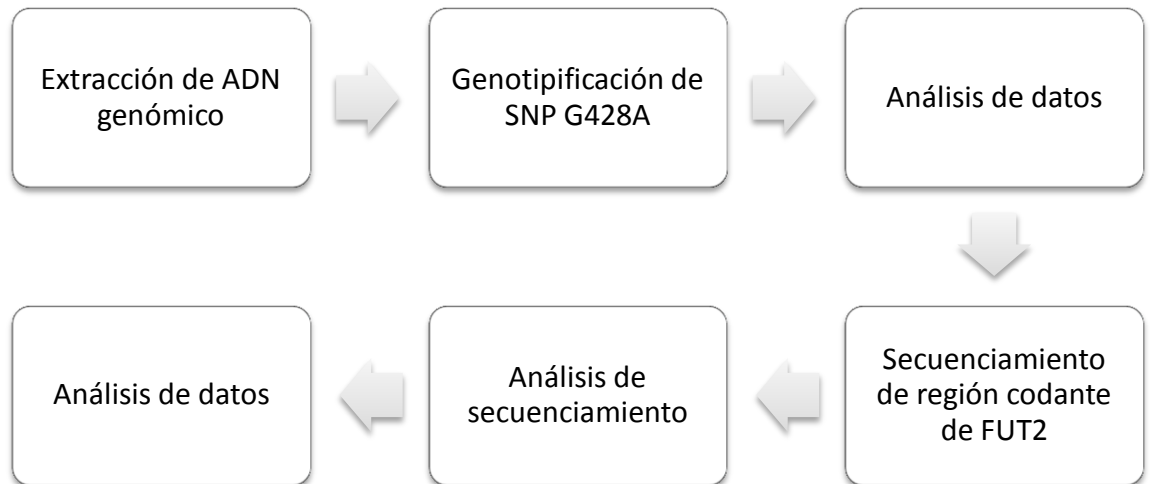


Figura 3. *Flujograma del proceso metodológico seguido en el presente estudio.*

VI.1. Descripción de estudio madre

En 2016, el grupo de trabajo sobre norovirus en Perú implementó un estudio longitudinal de cohorte llamado “La infección natural de Norovirus y Sapovirus en una cohorte de nacimiento en una comunidad periurbana del Perú”. Este estudio madre realizó vigilancia activa en niños desde su nacimiento hasta los dos años y tenía por objetivos específicos 1) caracterizar la epidemiología de Norovirus y Sapovirus en niños peruanos, 2) evaluar inmunidad protectora adquirida a Norovirus y Sapovirus en un área de exposición frecuente.

El diseño de este estudio permitiría resolver algunas limitantes encontradas en el estudio realizado en Ecuador. En primer lugar, la vigilancia a los niños fue diaria lo que reduce la posibilidad de pasar por alto o perder muestras de episodios de diarrea. Además, el análisis de muestras de rutina fue mensual por lo que se pudo identificar las infecciones asintomáticas.

La cohorte fue reclutada de las zonas VII, IX, X, XI y Edirberto Ramos del distrito de Villa El Salvador (población de 492000 habitantes). En el distrito, aproximadamente 94% de los hogares cuenta con agua potable suministrada por red pública dentro de la vivienda y el 3.7% no cuenta con agua por red pública. Además, cerca del 6% de hogares elimina sus residuos en tanque séptico, letrinas o no cuenta con instalaciones de saneamiento (70). La cohorte estuvo conformada por 321 niños recién

nacidos a los cuales se les hizo seguimiento desde aproximadamente 1 mes de nacidos hasta cumplir los dos años de edad, sin embargo, el análisis para el presente trabajo de investigación se realizó con la información obtenida hasta el primer año de edad.

Se realizó un tamizaje inicial en la comunidad con el fin de identificar a las mujeres embarazadas e invitarlas a formar parte del estudio. Si las mujeres tenían interés en participar, se les visitó en fechas aproximadas al parto para reclutarlas. El reclutamiento se hizo de manera escalonada, aproximadamente 25 recién nacidos por mes durante 15 meses.

Criterios de inclusión:

- Niño nacido dentro de los 28 días al reclutamiento.
- Vivir en el área de estudio.
- Padre, madre o tutor deben haber dado consentimiento informado.

Criterios de exclusión:

- Presencia de enfermedad grave que requiera hospitalización.
- Presencia de condición grave o crónica informada o documentada.
- Enfermedades congénitas.
- VIH/SIDA en la madre o el niño.
- Fibrosis quística diagnosticada por médico.
- Embarazo múltiple.

- Pesos al nacer menor a 1500 gramos
- Aceptar parcialmente la participación en el muestreo o entrevista al reclutamiento
- Incapacidad de padre o tutor para dar consentimiento informado

Se realizó visitas diarias a cada casa para registrar presencia o ausencia de diarrea en el niño, así como el estado de lactancia materna.

Las muestras de sangre para determinar el grupo sanguíneo fueron colectadas al sexto mes de edad y el hisopado oral se colectó al reclutamiento. Las muestras de heces se colectaban semanalmente. Además, cuando el niño presentaba gastroenteritis, se colectaba muestra de heces dentro de las 48 horas de producido el episodio.

La detección de NoV en heces, el análisis de grupo sanguíneo, y las encuestas fueron realizados como parte del estudio madre.

VI.1.1. Definiciones

Diarrea: 3 o más deposiciones líquidas o semi líquidas por día según criterio de madre o cuidador.

Episodio de gastroenteritis: El primer día de presentación de diarrea fue considerado el inicio del episodio de gastroenteritis. El último día de

diarrea fue considerado el fin del episodio, siempre y cuando estuviera seguido de 2 días consecutivos sin diarrea.

Infección por NoV: Presencia del virus en heces detectada por qPCR. Se consideró episodios diferentes cuando se detectó diferente genotipo del virus. Si un mismo genotipo era detectado a los 30 días de presentarse un episodio, pero en el intervalo hubo al menos dos muestras negativas, se consideró un nuevo episodio, caso contrario, se requirió un intervalo de 60 días para considerar una nueva infección.

Infección sintomática: Cuando hay presencia de virus en heces colectadas 48 horas antes o después del episodio de diarrea.

Infección asintomática: Cuando no hay presencia de síntomas dentro de los 30 días anteriores o posteriores a la fecha en la que se tomó la muestra positiva que definió el inicio de infección.

Episodio indefinido: Si una muestra de no diarrea es positiva para NoV, pero la diarrea se presenta dentro de los 30 días anteriores o posteriores.

VI.1.2. Operacionalización de variables

La presencia de NoV en las muestras de heces se realizó en el estudio madre mediante qPCR con el fin de identificar una región del genoma que corresponde a la cápside del virus. Se consideró positiva aquella muestra que tuvo Ct menor o igual a 37 para GI y menor o igual a 38 para GII (33). El equipo utilizado fue el LighCycler 480 System (Roche, Alemania). Si bien se colectó muestras semanales rutinarias de heces, para el análisis se seleccionó una muestra por mes.

Se ha definido la variable dependiente numérica discreta “el número de infecciones por Norovirus por niño-año”. En el numerador se consideró el total de infecciones positivas para Norovirus tanto sintomáticas como asintomáticas (de acuerdo a la definiciones descritas en la sección VI.2) durante el primer año de edad de cada niño. En el denominador se incluyó el tiempo de seguimiento del niño medido en niño-año sin incluir los días en los que hubo presencia de diarrea.

La variable independiente se categorizó como “Presencia de SNP” cuando hay presencia de al menos un nucleótido mutante y como “Ausencia de SNP” si hay presencia de dos nucleótidos silvestres.

Bajo peso al nacer se consideró cuando el niño pesó menos de 2.5 kg al nacimiento. Esta variable se categorizó en peso al nacer mayor o igual a 2.5 kg y menor a 2.5 kg.

Para el estado secretor se consideró que un individuo no es secretor cuando no se puede detectar el antígeno H en muestras de saliva. La detección se hizo mediante la prueba de ELISA y en la base de datos se colocó “no secretor” cuando el antígeno no fue detectado y “secretor” cuando sí fue detectado.

El grupo sanguíneo se determinó mediante prueba de aglutinación en la que la muestra fue mezclada con anticuerpos de sangre tipo A y tipo B y se

observó si había aglutinación o no. Si la muestra de sangre reaccionó con el anticuerpo tipo A, el grupo sanguíneo es A; si la sangre reaccionó con el anticuerpo tipo B, el grupo sanguíneo es B; si la sangre reaccionó con ambos anticuerpos, fue AB y si no reaccionó con ninguno, fue O. El Rh se determinó mezclando la sangre con anticuerpo para factor Rh. Al igual que en el caso anterior, la aglutinación indicó factor Rh+.

Se consideró lactancia materna predominantemente exclusiva cuando el niño no consumió ningún otro tipo de alimento al menos el 80% del tiempo durante los primeros seis meses de vida. Se categorizó esta variable en lactancia exclusiva mayor o igual a 80% del tiempo y menor al 80%.

VI.2. Procedimientos y técnicas para el análisis genético

VI.2.1. Extracción de ADN genómico

Se realizó a partir de muestras de hisopado oral que fueron descongeladas a temperatura ambiente, pasadas por vórtex y centrifugadas por 5 segundos. Para la extracción de ADN genómico se usó el High Pure PCR Template Preparation Kit de Roche siguiendo las indicaciones del fabricante. La concentración de ADN aislado en cada muestra fue cuantificada por espectrofotometría con un espectofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) a una longitud de onda de 260nm.

VI.2.2. Genotipificación de SNP G428A

La amplificación de la región de interés se realizó mediante PCR convencional en un T100 Thermal Cycler (Bio-Rad) y el gen de betaglobina humana (250bp) fue usado como control positivo (Fw: 5'-ACACAACCTGTGTTCACTAGC -3' y Rv: 5'-GGAAAATAGACCAATAGGCAG -3'). La reacción fue llevada a cabo en un volumen de reacción final de 20 ul que contenía 2 ul de ADN extraído, buffer 1X, 0.2mM de dNTPs, 1.25mM MgCl₂, 0.5uM de primer forward, 0.5uM de primer reverse y 0.04U/ul de taq polimerasa y agua libre de nucleasas. Para identificar el SNP silvestre se usó el primer forward 5'-AGTACGTCCGCTTCACCGGCTACCCCTGCTCCCG-3' y para identificar SNP mutante se usó el primer forward 5'-AGTACGTCCGCTTCACCGGCTACCCCTGCTCCGA-3'. En ambas reacciones, el primer reverse fue 5'-GGCTGCCTCTGGCTTAAAG-3'. Los parámetros térmicos fueron 1 ciclo de 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de 95°C por 45 segundos, 60°C por 45 segundos y 72°C por 45 segundos, 1 ciclo de 72°C por 5 minutos. La integridad y amplificación del ADN fue confirmada por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en TAE 1X.

VI.2.3. Amplificación de la región codante del gen FUT2

La región codante del gen *FUT2* (RefSeqGene: NG_007511.1) fue amplificada mediante PCR convencional en un T100 Thermal Cycler (Bio-Rad) y el gen de betaglobina humana (250bp) fue usado como control positivo (Fw: 5'- ACACAACCTGTGTTCACTAGC -3' y Rv: 5'-

GGAAAATAGACCAATAGGCAG -3'). La reacción fue llevada a cabo en un volumen de reacción final de 40 ul que contenía 4 ul de ADN extraído, buffer 1X, 0.2mM de dNTPs, 1.25mM MgCl₂, 0.5uM de primer forward (5'-ACACACCCACACTATGCCTGCAC-3'), 0.5uM de primer reverse (5'-ACTTGCAGCCCAACGCATCTT-3') y 0.04U/ul de taq polimerasa y agua libre de nucleasas. Los parámetros térmicos fueron 1 ciclo de 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de 95°C por 45 segundos, 60°C por 45 segundos y 72°C por 45 segundos, 1 ciclo de 72°C por 5 minutos. La integridad y amplificación del ADN fue confirmada por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en TAE 1X.

Los productos de PCR fueron secuenciados por Macrogen USA usando el primer forward 5'-CCAGCTAACGTGTCCCGTTTTCC-3' y el primer reverse 5'-TGCCTCCCTCAAGATGAGTGCC-3'.

La selección de niños para el análisis de secuenciamiento de la región codante del gen FUT2 fue al azar. Se seleccionó 85 niños.

VI.2.4. Equilibrio de Hardy-Weinberg

Para el cálculo del equilibrio de Hardy-Weinberg, se procedió con los siguientes cálculos:

$$GG + GA + AA$$

$$P^2 + 2pq + q^2 \text{ (ec.1)}$$

Cálculo de frecuencias alélicas observadas:

$$G = G^2 + (2GA/2) \text{ ____ (ec.2)}$$

$$A = A^2 + (2GA/2) \text{ ____ (ec.3)}$$

Cálculo de frecuencias genotípicas esperadas:

$$p^2 + 2pq + q^2 \text{ ____ (ec.4)}$$

Cálculo de equilibrio de Hardy-Weinberg:

$$\sum(\text{observados-esperados})^2/\text{esperados} \text{ ____ (ec.5)}$$

Si Chi^2 calculado $>$ Chi^2 tabulado, entonces no hay equilibrio de Hardy-Weinberg.

VI.2.5. Análisis estadístico

La asociación cruda de la presencia o ausencia de nucleótidos mutantes con el número de infecciones por NoV se estimó con la prueba estadística Mann-Whitney.

Se utilizó modelos lineales generalizados para explicar la relación entre la presencia de nucleótidos mutantes con tasa de infección por NoV ajustando por las variables sexo, bajo peso al nacer, grupo sanguíneo, lactancia durante los primeros 6 meses de vida.

Los resultados del secuenciamiento de la región codante de FUT2 fueron alineados con DNA Baser y analizados con el software MEGA7 con el fin de identificar polimorfismos. El software en línea Translate Tool de Expasy fue usado para traducir la secuencia de ADN en la secuencia de aminoácidos de la proteína.

VI.3. Consideraciones éticas

El estudio madre (SIDISI: 65178) y el presente estudio cuenta con aprobación del Comité Institucional de Ética de la UPCH (CIE-UPCH). La confidencialidad de los participantes del estudio, los resultados de las pruebas y otra información han sido codificadas. No se dará a conocer datos personales en la publicación ni presentación de resultados.

Los datos genéticos obtenidos no serán usados en otros estudios no relacionados a la investigación madre.

VII. RESULTADOS

VII.1. Características de la cohorte

La cohorte fue seguida durante dos años, pero en este análisis se consideró los datos colectados hasta el primer año de edad. La cohorte estuvo conformada por 321 niños de los cuales 48.6% fueron varones. Bajo peso al nacer se presentó en 3.2% de los niños. De los 321 niños, el 49.8 6% (CI: 44.02 – 55.64) recibió leche materna exclusiva al menos 80% de los días de vigilancia durante los primeros seis meses de vida. Veintidós niños fueron alimentados con fórmula o alimentos complementarios. Los niños presentaron 4 tipos de grupo sanguíneo (O+, O-, A+ y B+) siendo el más representativo el grupo O+. Cuatro (1.6%; CI: 0.4 – 4.1) de los niños fue no secretor (Tabla 2.). La tasa de incidencia global de infección por NoV fue 1.42 niño-año. La tasa de incidencia global de infección sintomática por NoV fue 0.37 niño-año y para la asintomática fue 0.90 niño-año.

VII.2. Frecuencias genotípicas y alélicas

La frecuencia genotípica fue 81.5% (CI: 76.5 – 85.8) homocigotos silvestres (G/G), 18.2% (CI: 13.9 – 23.1) heterocigotos (G/A) y 0.4% (CI: 8.9×10^{-5} – 1.9) homocigoto mutante (A/A). Las frecuencias alélicas en la cohorte fueron 0.91 para el alelo G y 0.09 para el alelo A

Tabla 2. Características de los niños de la cohorte de recién nacidos de la comunidad periurbana de Lima

Características	321 (%)†
Sexo	
Hombre	156 (48.6)
Mujer	165 (51.4)
Peso al nacer	
≥2.5 kg.	301 (96.8)
<2.5 kg.	10 (3.2)
Lactancia en los primeros 6 meses	
Exclusiva ≥80%	149 (49.8)
Exclusiva <80%	150 (50.2)
Grupo sanguíneo	
O+	217 (78.6)
O-	4 (1.5)
A+	35 (12.7)
B+	20 (7.2)
Estado secretor	
No secretor	4 (1.6)
Secretor	245 (98.4)
Genotipo	
Homocigoto silvestre	233 (81.5)
Heterocigoto	52 (18.2)
Homocigoto mut	1 (0.4)

†Los valores de lactancia, grupo sanguíneo, estado secretor y genotipo pueden no sumar 321 debido a los datos perdidos.

VII.3. Equilibrio de Hardy-Weinberg

Las frecuencias alélicas se calcularon a partir de las frecuencias fenotípicas presentadas en la tabla 2. Se encontró que la frecuencia del alelo G y A es 0.91 y 0.09, respectivamente. Posteriormente, se calculó el equilibrio de Hardy-Weinberg en comparación a las frecuencias alélicas esperadas según el proyecto de los 1000 genomas, al carecer de información para poblaciones amerindias. No se encontró equilibrio de Hardy-Weinberg en la población estudiada. Los cálculos se encuentran en el anexo 1.

VII.4. Análisis bivariado de tasa de incidencia de infección por NoV y presencia de polimorfismo G428A de FUT2

En el análisis bivariado crudo, se observa que no hay diferencia significativa entre el número de infecciones por NoV y la presencia del polimorfismo G428A o con respecto a las otras variables analizadas (Tabla 3.).

Mediante el análisis bivariado por GLM regresión binomial negativa, no se encontró asociación estadísticamente significativa entre la tasa de incidencia de infección por NoV con respecto la variable de exposición de interés. Sin embargo, es importante resaltar que la dirección de asociación del IRR se mantiene al ajustar el modelo por sexo, bajo peso al nacer, grupo sanguíneo y lactancia materna (Tabla 4.).

Tabla 3. Factores asociados al número de infecciones por NoV en análisis bivariado de la cohorte de recién nacidos de la comunidad periurbana de Lima

Variables	Número de infecciones por NoV/niño-año*	p
Sexo		0.833**
Masculino	1 (0-2)	
Femenino	1 (0-2)	
Bajo peso al nacer		0.691**
≥ 2.5 kg.	1 (0-2)	
< 2.5 kg.	1.5 (0-2)	
Grupo sanguíneo		0.785†
O+	1 (0-2)	
O-	1 (0-2)	
A+	1 (0-2)	
B+	0.5 (0-2.5)	
Lactancia en los primeros 6 meses		0.653†
Exclusiva $\geq 80\%$	1 (0-2)	
Exclusiva $< 80\%$	1 (0-2)	
Estado secretor		0.238**
No secretor	0.5 (0-1)	
Secretor	1 (0-2)	
Genotipo		0.664**
Presencia SNP mut	1 (0-2)	
Ausencia SNP mut	31(0-2)	

* Mediana (RIC)

** El valor p fue obtenido mediante la prueba de Mann-Whitney.

† El valor p fue obtenido mediante la prueba de Kruskal-Wallis.

Tabla 4. Factores independientemente asociados a la tasa de incidencia de infección por NoV en análisis de GLM Regresión Binomial Negativa.

Variables	Análisis bivariado			Regresión múltiple		
	IRR	IC 95%	p	IRR	IC 95%	p
Sexo						
Masculino	Ref.			Ref.		
Femenino	1.00	0.79-1.29	0.963	1.21	0.94-1.57	0.140
Bajo peso al nacer						
≥2.5 kg.	Ref.					
<2.5 kg.	1.26	0.61-2.61	0.527	1.21	0.61-2.44	0.591
Grupo sanguíneo						
A+	Ref.			Ref.		
B+	0.84	0.46-1.56	0.589	0.93	0.47-1.80	0.819
O+	0.88	0.62-1.23	0.448	0.95	0.66-1.37	0.796
O-	0.63	0.22-1.75	0.372	0.63	0.15-2.69	0.535
Lactancia en los primeros 6 meses						
Exclusiva ≥80%	Ref.			Ref.		
Exclusiva <80%	1.04	0.81-1.35	0.744	1.10	0.85-1.41	0.478
Genotipo						
Ausencia de SNP	Ref.			Ref.		
Presencia de SNP	0.98	0.75-1.28	0.889	0.98	0.72-1.32	0.878

IRR: Razón de tasa de incidencia. IC 95%: Intervalo de confianza al 95%

Regresión múltiple incluyó 231 observaciones

VII.5. Análisis bivariado del estado secretor y presencia de polimorfismo G428A de FUT2

El análisis bivariado indica que existe asociación significativa entre la presencia del polimorfismo y el estado secretor (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis bivariado del estado secretor y presencia de polimorfismo G428A de FUT2 de los niños de la cohorte de recién nacidos de la comunidad periurbana de Lima

Variables	Secretor N (%)	No secretor N (%)	P**
Genotipo			0.029
Ausencia SNP mut	184 (100)	0 (0.0)	
Presencia SNP mut	36 (94.7)	2 (5.3)	

** El valor p fue obtenido mediante la prueba exacta de Fisher
Análisis incluyó 222 observaciones.

VII.6. Mutaciones de nucleótido único identificadas en secuenciamiento exploratorio

Se seleccionó 85 muestras al azar para el secuenciamiento exploratorio. Las características de este grupo de niños son similares a las características de la cohorte, por lo tanto, es representativa de la cohorte (Anexo 2).

Tras realizar el secuenciamiento Sanger de la región codante del gen FUT2, se encontró un total de 12 mutaciones de nucleótido simple. Tres fueron silenciosas, de las cuales 2 (C216T y A171G) estuvieron presentes en 16 (18.8%) niños y la tercera en 44 (51.8%). Una producía mutación sin sentido (G428A) y las demás, fueron de cambio de sentido. La mutación en la posición 171 de la región codante se encontró en 16 (18.8%) de los individuos. Además, las mutaciones en posiciones en 216 (rs681343) y 357 (rs281377) fueron muy frecuentes (Tabla 6).

Tabla 6. Mutaciones de nucleótido único en región codante del gen FUT2.

Posición polimorfismo	Mutación en ADN	Tipo de mutación	Cambio de aminoácido	# individuos	
171	GCA por GCG	Silenciosa	-	16	No reportado
178	CGC por TGC	Cambio de sentido	R>C	4	rs575344194
216	TAC por TAT	Silenciosa	-	16	rs681343
271	ACC por GCC	Cambio de sentido	T>A	1	rs1280783513
281	CCC por CAC	Cambio de sentido	P>H	1	No reportado
302	CCG por CTG	Cambio de sentido	P>L	4	rs200157007
316	GCC por ACC	Cambio de sentido	A>T	1	rs534316263
357	AAC por AAT	Silenciosa	-	44	rs281377
403	CGC por TGC	Cambio de sentido	R>C	1	rs201915844
428	TGG por TAG	Sin sentido	W>STOP	16	rs601338
739	GGT por AGT	Cambio de sentido	G>S	11	rs602662
841	GGG por AGG	Cambio de sentido	G>R	4	rs548111243

VII.6. Asociación exploratoria entre mutaciones en FUT2 y el número de infecciones por NoV

Se analizó si cada mutación presente en el gen FUT2 estaría asociada al número de infecciones por NoV. En el análisis bivariado crudo, se observa que no hay diferencia significativa entre el número de infecciones por NoV con respecto a cada mutación (Tabla 7.).

Tabla 7. Asociación de número de infecciones por NoV y SNPs en análisis bivariado

SNP	Número de infecciones por NoV/niño-año*	P**
A171G		0.454
Silvestre	1 (0-2)	
Mutante	1 (1-2)	
C178T		0.068
Silvestre	1 (0-2)	
Mutante	0 (0-0.5)	
C216T		0.454
Silvestre	1 (0-2)	
Mutante	1 (1-2)	
A271G		0.090
Silvestre	1 (0-2)	
Mutante	4 (4-4)	
C281A		0.932
Silvestre	1 (0-2)	
Mutante	1 (1-1)	
C302T		0.199

Silvestre	1 (0-2)	
Mutante	2.5 (1-3)	
G316A		
Silvestre	1 (0-2)	0.090
Mutante	4 (4-4)	
C357T		0.453
Silvestre	1 (0-2)	
Mutante	1 (0-2)	
C403T		0.150
Silvestre	1 (0-2)	
Mutante	3 (3-3)	
G428A		0.454
Silvestre	1 (0-2)	
Mutante	1 (1-2)	
G739A		0.892
Silvestre	1 (0-2)	
Mutante	1 (1-2)	
G841A		0.068
Silvestre	1 (0-2)	
Mutante	0 (0-0.5)	

*Mediana (RIC)

** El valor p fue obtenido mediante la prueba de Mann-Whitney.

Análisis incluyó 85 niños

VIII. DISCUSIÓN

La información sobre la variabilidad genética del SNP G428A del gen FUT2 se obtuvo de 286 niños de la cohorte en seguimiento en Villa El Salvador. El 81.5% (95% IC: 76.5 - 85.8%) fue homocigoto silvestre (se^{428}) y 0.4% (95% IC: 8.9×10^{-5} - 1.9%) fue homocigoto mutante. Este resultado difiere con lo reportado en la población caucásica, ecuatoriana y nicaragüense, en las que el 20%, 12% y 4% fue homocigoto mutante respectivamente (31,32,71). Además, el porcentaje de homocigotos silvestres fue mayor al reportado en Ecuador (44%) y Nicaragua (53.6%) (31,71). Esta diferencia podría deberse a que, si bien las poblaciones ecuatoriana y nicaragüense tienen un fuerte componente nativo americano en su ancestría, el porcentaje es menor al reportado en Perú (34%, 41% vs. 86%) (62,64,65,72). Además, en el estudio realizado por Toscanini et al., según los perfiles de Yfiler y PPY23, se pudo asignar con más del 90% de probabilidad la ancestría europea a 61% de la población ecuatoriana estudiada (65). En población nicaragüense, se ha observado 45% de ancestría europea mediante el análisis de CYP2D6, CYP2C9 Y CYP2C19 (72). En Lima, se ha reportado 14.3% de ancestría europea (73). El alto porcentaje de ancestría europea en poblaciones ecuatorianas y nicaragüenses podría explicar la presencia de homocigotos mutantes del SNP G428A que es común en población caucásica (20%). Este resultado es consistente con que la distribución genotípica del SNP varía según etnicidad.

Las frecuencias alélicas en la cohorte fueron 0.91 para el alelo G y 0.09 para el alelo A, encontrándose en desequilibrio de Hardy-Weinberg con respecto a las frecuencias alélicas esperadas reportadas en el proyecto 1000 genomas. Esto se debe a que las condiciones para lograr el equilibrio genético, no se encuentran presentes en la población de estudio. En primer lugar, la población no era infinitamente grande y no todos los individuos tenían la misma probabilidad de apareamiento al azar. Además, la población está sometida a migración. Según el Instituto Nacional de Estadística e Informática, en 2007, Villa El Salvador presentó saldo negativo de intercambio migratorio intrametropolitano (74).

El fenotipo no secretor se presenta cuando hay mutación homocigota mutante ya que no se produce el antígeno H, precursor de los HBGAs y por ende, no habría sitio de unión para que NoV inicie la infección. El fenotipo no secretor se encuentra en cerca del 40% en población India (29) y 15% en población de Dinamarca (30). El estado secretor se presentó en 98.4% (CI: 95.9 – 99.6) de los niños de esta cohorte, el cual es un poco mayor al reportado en Ecuador (88%; CI: 82.5 – 92.5) (31). Este resultado es consistente con lo reportado en un estudio en el que se encontró que mesoamericanos eran más secretores que blancos o negros (96% vs. 74%, $p < 0.001$) (75). Recientemente, un estudio estimó que de 70 personas peruanas, 4 eran no secretoras (5.7%); sin embargo, la estimación se realizó *in silico* en base a las mutaciones encontradas en FUT2 ya que no contaron con muestras para examinar el estado secretor (76). En el

presente estudio, la pérdida de niños identificados como no secretores fenotípicos hace posible la subestimación de la frecuencia alélica del SNP mutante. Quizá, la baja frecuencia del fenotipo no secretor se deba a la homogeneidad de la población con respecto a la ancestría de los pobladores de Villa El Salvador. En el censo realizado en 2017, de acuerdo a la autoidentificación étnica, 5.3% de las personas encuestadas considera que tiene ascendencia blanca (población con mayor frecuencia de no secretores), mientras que 66.2% se considera de origen mestizo (77). Cabe resaltar que este trabajo de investigación forma parte de un estudio madre cuyo muestreo fue realizado para responder a objetivos diferentes, por lo tanto no se tuvo en consideración la ascendencia de los participantes. No contar con una muestra más heterogénea causa que las distribuciones genotípica y fenotípica de la población no se encuentren representadas en la cohorte.

En este estudio se encontró asociación entre la presencia de SNP mutante y el estado no secretor del individuo ($p=0.029$), sin embargo, es importante mencionar que este resultado no debería ser concluyente debido a que sólo 4 (1.6%) individuos fueron no secretores y el resultado podría estar influenciado por el azar o por la presencia de sesgo de selección.

Por otro lado, el efecto protector del SNP mutante y el estado no secretor ante infecciones por NoV GII ha sido demostrado por varios estudios realizados en Suecia, China, Japón y Dinamarca (30,67,78,79), no

obstante, en Ecuador e Israel no se encontró esta asociación (31,80). En el presente estudio se colectó muestras con mayor frecuencia y se tuvo vigilancia diaria de los niños que permitió identificar más episodios de diarrea e infecciones asintomáticas, pero tampoco se encontró la asociación. En las poblaciones ecuatoriana e israelí, el porcentaje de individuos no secretores es bajo en comparación con las poblaciones caucásicas. En la cohorte seguida por este estudio, de los 4 niños no secretores, sólo 1 fue homocigoto mutante para el SNP G428A. Debido a que no se encontró asociación con respecto a la mutación en la posición 428, se realizó secuenciamiento exploratorio de la región codante del gen de FUT2 con el fin de identificar otras mutaciones. Se consideró importante realizar este paso porque en estudios previos se ha demostrado que SNPs en este gen no necesariamente anulan la actividad de la fucosiltransferasa, pero la reducen generando un fenotipo secretor débil que también ha sido asociado a disminución de infecciones por NoV (81,82). Cabe resaltar que todas las mutaciones encontradas en el presente estudio son heterocigotas y debería investigarse el efecto de estas en la expresión de la fucosiltransferasa.

Se encontró tres mutaciones puntuales silenciosas, de las cuales 2 (C216T y A171G) estuvieron presentes en 16 (18.8%) de los 85 individuos analizados por secuenciamiento Sanger y la tercera (C357T) en 44 (51.8%). La mutación silenciosa en la posición 171 en el que ocurre el cambio del triplete A por G, no se ha reportado previamente. La mutación

silenciosa en la posición 216 en el que ocurre el cambio del C por T (rs681343), se ha identificado como variante con fuerte desequilibrio de ligamiento con la variación rs601338 ($r^2=0.9993$) (83) que es la analizada en el presente estudio. Esta mutación ha sido asociada a la infección de oído en niños en una población descendiente de europeos (84) y a la enfermedad de Behcet en población tunecina (85). De igual manera, la mutación silenciosa en la posición 357 en el que ocurre el cambio del C por T (rs281377) se ha identificado como variante con fuerte desequilibrio de ligamiento con la variaciones rs601338 ($r^2=0.84$) y rs602662 ($r^2=0.57$) (86). A su vez, ha sido asociada a disminución de la expresión de antígenos Lewis a y b, cuando se encuentran presentes otras mutaciones en FUT2 y FUT3 (78). Adicionalmente, se encontró en población china, que la presencia de las mutaciones rs281377 y rs601338 estaba asociada a la predisposición de padecer colitis ulcerosa (87). Otro SNP que se presentó con alta frecuencia (12.9%) fue rs602662 que corresponde a un cambio de nucleótido G por A en la posición 739 del gen FUT2 lo que genera una mutación cambio de sentido por el cambio del aminoácido glicina (G) por serina (S) en la proteína. Esta mutación también se encuentra en fuerte desequilibrio de ligamiento con rs601338 ($r^2 = 0.72$) (88). Esta mutación está asociada a enfermedades respiratorias y gastrointestinales (89), así como a la disminución o ausencia de actividad enzimática de FUT2 (90). Adicionalmente, se ha observado que individuos con genotipo GG o GA, presentan mayor riesgo a tener bajos niveles de vitamina B12 en plasma (88). El SNP rs200157007 presenta un cambio de nucleótido C por T en la

posición 302, lo que genera un cambio del aminoácido prolina (P) por leucina (L). Se ha asociado a infección sintomática por ETEC en niños con fenotipo Lewis a no secretor en Bangladeshi (91). Las mutaciones rs575344194 (C178T), rs534316263 (G316A), rs201915844 (C403T) y rs548111243 (G841A) se han reportado recientemente en población peruana y se estima que tienen impacto en la función de la proteína, sin embargo, aún no han sido caracterizadas (76).

Ninguna de las mutaciones tuvo asociación estadísticamente significativa con el número de infecciones por NoV, pero el resultado puede deberse a que todas fueron heterocigotas y el efecto en la función de la proteína causado por la mutación podría estar ocultándose por la función del alelo silvestre. Además, la presencia de desequilibrio de ligamiento, hace que no pueda determinarse mediante análisis de asociación directa, el rol supuestamente funcional de los alelos (86).

Es posible que los resultados obtenidos en la cohorte de niños en el estudio no hayan sido significativos porque existen otras variables confusoras que no se han considerado en el análisis. Existe diferentes oligosacáridos que sirven como punto de anclaje para microorganismo como los HBGAs que están presentes en la superficie de eritocitos. La presencia de estos HBGAs está mediada por las α 1,2-Fucosiltransferasa (FUT1) y α 3/4-Fucosiltransferasa (FUT3) para el sistema ABO y Lewis, respectivamente. Se ha reportado que mutaciones en el gen FUT3 podría influir en las tasas

de infección de diversos patógenos (78). Otro factor a considerar es la presencia de oligosacáridos de leche materna (HMOs), los cuales podrían actuar como punto de anclaje para algunos patógenos presentes en la superficie intestinal del niño (92). La proporción de estos varía entre mujeres y está asociada al grupo sanguíneo Lewis (FUT3) y estado secretor (FUT2) de la madre (93–95).

Por otro lado, es importante discurrir otros alimentos que el niño haya consumido durante los primeros seis meses de vida ya que se ha asociado gastroenteritis aguda consumo de alimentos o líquidos contaminados con patógenos virales (96,97).

IX. CONCLUSIONES

- No se encontró asociación significativa entre la presencia de SNP G428A del gen FUT2 y la tasa de incidencia de infección por NoV.
- La frecuencia genotípica es 81.5% (95% IC: 76.5 – 85.8%) homocigotos silvestres (G/G), 18.2% (95% IC: 13.9 – 23.1%) heterocigotos (G/A) y 0.4% (95% IC: 8.9×10^{-5} – 1.9%) homocigoto mutante (A/A).
- La frecuencias alélicas en la cohorte fue 0.91 para el alelo G y 0.09 para el alelo A.
- Se encontró asociación entre la presencia de SNP mutante y el estado no secretor del individuo ($p=0.029$).
- La población no se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg.

X. LIMITACIONES Y RECOMENDACIONES

Una limitación importante fue la pérdida de seguimiento de individuos no secretores fenotípicos ya que se retiraron del estudio y no se pudo obtener información sobre la tasa de infección por NoV. Debido a esto, puede existir subestimación de la frecuencia alélica del SNP mutante y la frecuencia genotípica de individuos homocigotos mutantes.

No fue posible realizar análisis de equilibrio y desequilibrio de ligamiento debido a que la metodología utilizada no permitía identificar si los alelos fueron heredados por el padre o la madre. No se pudo identificar haplotipos ni analizar la posible interacción entre SNPs.

Es necesario realizar estudios adicionales de los polimorfismos del gen FUT2 para determinar si existe asociación con el estado secretor; y este a su vez, ser analizado para asociarse a la tasa de incidencia de infección. Se debe considerar en el análisis los polimorfismos en los genes FUT1 y FUT3, así como el grupo sanguíneo Lewis.

En el análisis de asociación, debe considerarse el consumo de fórmula y otros alimentos durante los primeros seis meses de vida

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Watkins WM. Chapter 5 Biosynthesis 5. Molecular Basis of Antigenic Specificity in the ABO, H and Lewis Blood-Group Systems. In: Montreuil J, Vliegenthart JFG, Schachter H, editors. *New Comprehensive Biochemistry* [Internet]. Elsevier; 1995 [cited 2018 Aug 2]. p. 313–90. (Glycoproteins; vol. 29). Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167730608605979>
2. Tan M, Xia M, Chen Y, Bu W, Hegde RS, Meller J, et al. Conservation of Carbohydrate Binding Interfaces — Evidence of Human HBGA Selection in Norovirus Evolution. *PLoS One* [Internet]. 2009 Apr 1 [cited 2018 Aug 2];4(4). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2660415/>
3. Oriol R. Genetic control of the fucosylation of ABH precursor chains. Evidence for new epistatic interactions in different cells and tissues. *J Immunogenet.* 1990 Oct;17(4–5):235–45.
4. Kumazaki T, Yoshida A. Biochemical evidence that secretor gene, *Se*, is a structural gene encoding a specific fucosyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1984 Jul;81(13):4193–7.
5. Le Pendu J, Cartron JP, Lemieux RU, Oriol R. The presence of at least two different H-blood-group-related beta-D-gal alpha-2-L-fucosyltransferases in human serum and the genetics of blood group H substances. *Am J Hum Genet.* 1985 Jul;37(4):749–60.
6. Shirato H, Ogawa S, Ito H, Sato T, Kameyama A, Narimatsu H, et al. Noroviruses Distinguish between Type 1 and Type 2 Histo-Blood Group Antigens for Binding. *J Virol.* 2008 Jan 11;82(21):10756–67.
7. Oriol R, Le Pendu J, Mollicone R. Genetics of ABO, H, Lewis, X and related antigens. *Vox Sang.* 1986;51(3):161–71.
8. Clausen H, Hakomori S. ABH and related histo-blood group antigens; immunochemical differences in carrier isotypes and their distribution. *Vox Sang.* 1989;56(1):1–20.
9. Hooper LV, Gordon JI. Glycans as legislators of host–microbial interactions: spanning the spectrum from symbiosis to pathogenicity. *Glycobiology.* 2001 Jan 1;11(2):1R-10R.
10. Ferrer-Admetlla A, Sikora M, Laayouni H, Esteve A, Roubinet F, Blancher A, et al. A natural history of FUT2 polymorphism in humans. *Mol Biol Evol.* 2009 Sep;26(9):1993–2003.
11. Kelly RJ, Rouquier S, Giorgi D, Lennon GG, Lowe JB. Sequence and expression of a candidate for the human Secretor blood group alpha(1,2)fucosyltransferase gene (FUT2). Homozygosity for an enzyme-inactivating nonsense mutation commonly correlates with the non-secretor phenotype. *J Biol Chem.* 1995 Mar 3;270(9):4640–9.

12. Liu Y, Koda Y, Soejima M, Pang H, Schlaphoff T, du Toit ED, et al. Extensive polymorphism of the FUT2 gene in an African (Xhosa) population of South Africa. *Hum Genet.* 1998 Aug;103(2):204–10.
13. Koda Y, Soejima M, Liu Y, Kimura H. Molecular basis for secretor type alpha(1,2)-fucosyltransferase gene deficiency in a Japanese population: a fusion gene generated by unequal crossover responsible for the enzyme deficiency. *Am J Hum Genet.* 1996 Aug;59(2):343–50.
14. Stapleton A, Nudelman E, Clausen H, Hakomori S, Stamm WE. Binding of uropathogenic *Escherichia coli* R45 to glycolipids extracted from vaginal epithelial cells is dependent on histo-blood group secretor status. *J Clin Invest.* 1992 Sep;90(3):965–72.
15. Borén T, Falk P, Roth KA, Larson G, Normark S. Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science.* 1993 Dec 17;262(5141):1892–5.
16. Marionneau S, Ruvoën N, Le Moullac-Vaidye B, Clement M, Cailleau-Thomas A, Ruiz-Palacois G, et al. Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology.* 2002 Jun;122(7):1967–77.
17. Magalhães A, Rossez Y, Robbe-Masselot C, Maes E, Gomes J, Shevtsova A, et al. Muc5ac gastric mucin glycosylation is shaped by FUT2 activity and functionally impacts *Helicobacter pylori* binding. *Scientific Reports.* 2016 May 10;6:25575.
18. Ikehara Y, Nishihara S, Yasutomi H, Kitamura T, Matsuo K, Shimizu N, et al. Polymorphisms of two fucosyltransferase genes (Lewis and Secretor genes) involving type I Lewis antigens are associated with the presence of anti-*Helicobacter pylori* IgG antibody. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001 Sep;10(9):971–7.
19. Payne DC, Currier RL, Staat MA, Sahni LC, Selvarangan R, Halasa NB, et al. Epidemiologic Association Between FUT2 Secretor Status and Severe Rotavirus Gastroenteritis in Children in the United States. *JAMA Pediatr.* 2015 Nov;169(11):1040–5.
20. Blackwell CC, Jónsdóttir K, Hanson M, Todd WT, Chaudhuri AK, Mathew B, et al. Non-secretion of ABO antigens predisposing to infection by *Neisseria meningitidis* and *Streptococcus pneumoniae*. *Lancet.* 1986 Aug 2;2(8501):284–5.
21. Blackwell CC, Jonsdottir K, Hanson MF, Weir DM. Non-secretion of ABO blood group antigens predisposing to infection by *Haemophilus influenzae*. *Lancet.* 1986 Sep 20;2(8508):687.
22. Thom SM, Blackwell CC, MacCallum CJ, Weir DM, Brettle RP, Kinane DF, et al. Non-secretion of blood group antigens and susceptibility to infection by *Candida* species. *FEMS Microbiol Immunol.* 1989 Jun;1(6–7):401–5.

23. Lindesmith L, Moe C, Marionneau S, Ruvoen N, Jiang X, Lindblad L, et al. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nat Med*. 2003 May;9(5):548–53.
24. Liu L, Johnson HL, Cousens S, Perin J, Scott S, Lawn JE, et al. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet*. 2012 Jun 9;379(9832):2151–61.
25. Watkins WM. Blood-group substances. *Science*. 1966 Apr 8;152(3719):172–81.
26. Henry S, Oriol R, Samuelsson B. Lewis histo-blood group system and associated secretory phenotypes. *Vox Sang*. 1995;69(3):166–82.
27. García A, Alberto C. Sistema de grupo sanguíneo ABO. *Medicina & laboratorio*. 2009;15(7–8):329–47.
28. Yip SP, Lai SK, Wong ML. Systematic sequence analysis of the human fucosyltransferase 2 (FUT2) gene identifies novel sequence variations and alleles. *Transfusion*. 2007 Aug;47(8):1369–80.
29. Menon VK, George S, Sarkar R, Giri S, Samuel P, Vivek R, et al. Norovirus Gastroenteritis in a Birth Cohort in Southern India. *PLoS One* [Internet]. 2016 Jun 10 [cited 2019 Jun 4];11(6). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4902233/>
30. Kindberg E, Åkerlind B, Johnsen C, Knudsen JD, Heltberg O, Larson G, et al. Host Genetic Resistance to Symptomatic Norovirus (GGII.4) Infections in Denmark. *J Clin Microbiol*. 2007 Aug;45(8):2720–2.
31. Lopman BA, Trivedi T, Vicuña Y, Costantini V, Collins N, Gregoricus N, et al. Norovirus Infection and Disease in an Ecuadorian Birth Cohort: Association of Certain Norovirus Genotypes With Host FUT2 Secretor Status. *J Infect Dis*. 2015 Jun 1;211(11):1813–21.
32. Koda Y, Tachida H, Pang H, Liu Y, Soejima M, Ghaderi AA, et al. Contrasting patterns of polymorphisms at the ABO-secretor gene (FUT2) and plasma alpha(1,3)fucosyltransferase gene (FUT6) in human populations. *Genetics*. 2001 Jun;158(2):747–56.
33. Yu LC, Yang YH, Broadberry RE, Chen YH, Chan YS, Lin M. Correlation of a missense mutation in the human Secretor alpha 1,2-fucosyltransferase gene with the Lewis(a+b+) phenotype: a potential molecular basis for the weak Secretor allele (Sew). *Biochem J*. 1995 Dec 1;312 (Pt 2):329–32.
34. Soejima M, Pang H, Koda Y. Genetic variation of FUT2 in a Ghanaian population: identification of four novel mutations and inference of balancing selection. *Ann Hematol*. 2007 Mar;86(3):199–204.
35. ENCODE Project Consortium, Birney E, Stamatoyannopoulos JA, Dutta A, Guigó R, Gingeras TR, et al. Identification and analysis of functional elements in 1% of the

- human genome by the ENCODE pilot project. *Nature*. 2007 Jun 14;447(7146):799–816.
36. Green K. Y. *Caliciviridae: the noroviruses*. In: *Fields virology*. 5th ed. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams and Wilkins; 2007. p. 949–80.
 37. Götz H, Ekdahl K, Lindbäck J, de Jong B, Hedlund KO, Giesecke J. Clinical spectrum and transmission characteristics of infection with Norwalk-like virus: findings from a large community outbreak in Sweden. *Clin Infect Dis*. 2001 Sep 1;33(5):622–8.
 38. Adler JL, Zickl R. Winter vomiting disease. *J Infect Dis*. 1969 Jun;119(6):668–73.
 39. Lee RM, Lessler J, Lee RA, Rudolph KE, Reich NG, Perl TM, et al. Incubation periods of viral gastroenteritis: a systematic review. *BMC Infect Dis*. 2013 Sep 25;13:446.
 40. Tseng CY, Chen CH, Su SC, Wu FT, Chen CC, Hsieh GY, et al. Characteristics of norovirus gastroenteritis outbreaks in a psychiatric centre. *Epidemiol Infect*. 2011 Feb;139(2):275–85.
 41. Ahmed SM, Hall AJ, Robinson AE, Verhoef L, Premkumar P, Parashar UD, et al. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2014 Aug;14(8):725–30.
 42. Harris JP, Edmunds WJ, Pebody R, Brown DW, Lopman BA. Deaths from Norovirus among the Elderly, England and Wales. *Emerg Infect Dis*. 2008 Oct;14(10):1546–52.
 43. Hall AJ, Curns AT, McDonald LC, Parashar UD, Lopman BA. The roles of *Clostridium difficile* and norovirus among gastroenteritis-associated deaths in the United States, 1999-2007. *Clin Infect Dis*. 2012 Jul;55(2):216–23.
 44. van Asten L, Siebenga J, van den Wijngaard C, Verheij R, van Vliet H, Kretzschmar M, et al. Unspecified gastroenteritis illness and deaths in the elderly associated with norovirus epidemics. *Epidemiology*. 2011 May;22(3):336–43.
 45. van Asten L, van den Wijngaard C, van Pelt W, van de Kasstelee J, Meijer A, van der Hoek W, et al. Mortality attributable to 9 common infections: significant effect of influenza A, respiratory syncytial virus, influenza B, norovirus, and parainfluenza in elderly persons. *J Infect Dis*. 2012 Sep 1;206(5):628–39.
 46. Rha B, Burrer S, Park S, Trivedi T, Parashar UD, Lopman BA. Emergency Department Visit Data for Rapid Detection and Monitoring of Norovirus Activity, United States. *Emerg Infect Dis*. 2013 Aug;19(8):1214–21.
 47. Saito M, Goel-Apaza S, Espetia S, Velasquez D, Cabrera L, Loli S, et al. Multiple norovirus infections in a birth cohort in a Peruvian Periurban community. *Clin Infect Dis*. 2014 Feb;58(4):483–91.
 48. Fankhauser RL, Monroe SS, Noel JS, Humphrey CD, Bresee JS, Parashar UD, et al. Epidemiologic and molecular trends of “Norwalk-like viruses” associated with

- outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis.* 2002 Jul 1;186(1):1–7.
49. Siebenga JJ, Vennema H, Renckens B, de Bruin E, van der Veer B, Siezen RJ, et al. Epochal evolution of GGII.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006. *J Virol.* 2007 Sep;81(18):9932–41.
 50. Donaldson EF, Lindesmith LC, Lobue AD, Baric RS. Norovirus pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations. *Immunol Rev.* 2008 Oct;225:190–211.
 51. Rivera FP, Ochoa TJ, Ruiz J, Medina AM, Ecker L, Mercado E, et al. Norovirus prevalence in “pathogen negative” gastroenteritis in children from periurban areas in Lima, Peru. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2011 Dec;105(12):734–6.
 52. Jeong AY, Jeong HS, Lee JS, Park YC, Lee SH, Hwang IG, et al. Occurrence of Norovirus Infections in Asymptomatic Food Handlers in South Korea. *J Clin Microbiol.* 2013 Feb;51(2):598–600.
 53. Yu J-H, Kim N-Y, Lee E-J, Jeon I-S. Norovirus infections in asymptomatic food handlers in elementary schools without norovirus outbreaks in some regions of Incheon, Korea. *J Korean Med Sci.* 2011 Jun;26(6):734–9.
 54. Gary GW, Anderson LJ, Keswick BH, Johnson PC, DuPont HL, Stine SE, et al. Norwalk virus antigen and antibody response in an adult volunteer study. *J Clin Microbiol.* 1987 Oct;25(10):2001–3.
 55. Parrino TA, Schreiber DS, Trier JS, Kapikian AZ, Blacklow NR. Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent. *N Engl J Med.* 1977 Jul 14;297(2):86–9.
 56. Hutson AM, Atmar RL, Graham DY, Estes MK. Norwalk virus infection and disease is associated with ABO histo-blood group type. *J Infect Dis.* 2002 May 1;185(9):1335–7.
 57. Tan M, Jin M, Xie H, Duan Z, Jiang X, Fang Z. Outbreak studies of a GII-3 and a GII-4 norovirus revealed an association between HBGA phenotypes and viral infection. *J Med Virol.* 2008 Jul;80(7):1296–301.
 58. Carlsson B, Kindberg E, Buesa J, Rydell GE, Lidón MF, Montava R, et al. The G428A Nonsense Mutation in FUT2 Provides Strong but Not Absolute Protection against Symptomatic GII.4 Norovirus Infection. *PLOS ONE.* 2009 May 18;4(5):e5593.
 59. Van Trang N, Vu HT, Le NT, Huang P, Jiang X, Anh DD. Association between norovirus and rotavirus infection and histo-blood group antigen types in Vietnamese children. *J Clin Microbiol.* 2014 May;52(5):1366–74.
 60. Nordgren J, Kindberg E, Lindgren P-E, Matussek A, Svensson L. Norovirus Gastroenteritis Outbreak with a Secretor-independent Susceptibility Pattern, Sweden. *Emerg Infect Dis.* 2010 Jan;16(1):81–7.

61. Kato K, Ishiwa A. The role of carbohydrates in infection strategies of enteric pathogens. *Trop Med Health*. 2015 Mar;43(1):41–52.
62. Harris DN, Song W, Shetty AC, Levano KS, Cáceres O, Padilla C, et al. Evolutionary genomic dynamics of Peruvians before, during, and after the Inca Empire. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2018 10;115(28):E6526–35.
63. Homburger JR, Moreno-Estrada A, Gignoux CR, Nelson D, Sanchez E, Ortiz-Tello P, et al. Genomic Insights into the Ancestry and Demographic History of South America. *PLOS Genetics*. 2015 Dec 4;11(12):e1005602.
64. Burgos G, Garzón-Salazar A, Maldonado-Uquillas KM, Ávila C, Toscano MA, Paz-Cruz E. A look of paternal ancestry in a sample of Ecuadorian “MESTIZO” population analyzed through PowerPlex Y23. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 2019 Dec 1;7(1):534–6.
65. Toscanini U, Gaviria A, Pardo-Seco J, Gómez-Carballa A, Moscoso F, Vela M, et al. The geographic mosaic of Ecuadorian Y-chromosome ancestry. *Forensic Science International: Genetics*. 2018 Mar 1;33:59–65.
66. Le Pendu J, Ruvoën-Clouet N, Kindberg E, Svensson L. Mendelian resistance to human norovirus infections. *Seminars in Immunology*. 2006 Dec 1;18(6):375–86.
67. Thorven M, Grahn A, Hedlund K-O, Johansson H, Wahlfrid C, Larson G, et al. A homozygous nonsense mutation (428G-->A) in the human secretor (FUT2) gene provides resistance to symptomatic norovirus (GGII) infections. *J Virol*. 2005 Dec;79(24):15351–5.
68. Rougemont A de, Ruvoen-Clouet N, Simon B, Estienney M, Elie-Caille C, Aho S, et al. Qualitative and Quantitative Analysis of the Binding of GII.4 Norovirus Variants onto Human Blood Group Antigens. *J Virol*. 2011 Jan 5;85(9):4057–70.
69. Rockx B, De Wit M, Vennema H, Vinjé J, De Bruin E, Van Duynhoven Y, et al. Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study. *Clin Infect Dis*. 2002 Aug 1;35(3):246–53.
70. Censos Nacionales 2017 – XII de Población, VII de Vivienda y III de Comunidades Indígenas [Internet]. [cited 2020 Jun 22]. Available from: <http://censo2017.inei.gob.pe/>
71. Bucardo F, Carlsson B, Nordgren J, Larson G, Blandon P, Vilchez S, et al. Susceptibility of children to sapovirus infections, Nicaragua, 2005-2006. *Emerging Infect Dis*. 2012 Nov;18(11):1875–8.
72. Rodrigues-Soares F, Peñas-Lledó EM, Tarazona-Santos E, Sosa-Macías M, Terán E, López-López M, et al. Genomic Ancestry, CYP2D6, CYP2C9, and CYP2C19 Among Latin Americans. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2020;107(1):257–68.
73. Sandoval JR, Salazar-Granara A, Acosta O, Castillo-Herrera W, Fujita R, Pena SD, et al. Tracing the genomic ancestry of Peruvians reveals a major legacy of pre-Columbian ancestors. *Journal of Human Genetics*. 2013 Sep;58(9):627–34.

74. Perú: Migración Interna reciente y el Sistema de Ciudades 2001 - 2007. Instituto Nacional de Estadística e Informática; 2008.
75. Currier RL, Payne DC, Staat MA, Selvarangan R, Shirley SH, Halasa N, et al. Innate Susceptibility to Norovirus Infections Influenced by FUT2 Genotype in a United States Pediatric Population. *Clin Infect Dis*. 2015 Jun 1;60(11):1631–8.
76. Soejima M, Koda Y. Genetic variation of FUT2 in a Peruvian population: identification of a novel LTR-mediated deletion and characterization of 4 nonsynonymous single-nucleotide polymorphisms. *Transfusion*. 2019;59(7):2415–21.
77. PERÚ - INEI:: Provincia de Lima: Resultados Definitivos de los Censos Nacionales 2017 [Internet]. [cited 2020 Jun 22]. Available from: https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones_digitaless/Est/Lib1583/
78. Hu D, Zhang D, Zheng S, Guo M, Lin X, Jiang Y. Association of Ulcerative Colitis with FUT2 and FUT3 Polymorphisms in Patients from Southeast China. *PLoS One* [Internet]. 2016 Jan 14 [cited 2019 Nov 21];11(1). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4713070/>
79. Shirato-Horikoshi H, Ogawa S, Wakita T, Takeda N, Hansman GS. Binding activity of norovirus and sapovirus to histo-blood group antigens. *Arch Virol*. 2007;152(3):457–61.
80. Halperin T, Vennema H, Koopmans M, Kahila Bar-Gal G, Kayouf R, Sela T, et al. No association between histo-blood group antigens and susceptibility to clinical infections with genogroup II norovirus. *J Infect Dis*. 2008 Jan 1;197(1):63–5.
81. Liu P, Wang X, Lee J-C, Teunis P, Hu S, Paradise HT, et al. Genetic Susceptibility to Norovirus GII.3 and GII.4 Infections in Chinese Pediatric Diarrheal Children. *Pediatr Infect Dis J*. 2014 Nov;33(11):e305–9.
82. Nordgren J, Sharma S, Kambhampati A, Lopman B, Svensson L. Innate Resistance and Susceptibility to Norovirus Infection. *PLOS Pathogens*. 2016 Apr 26;12(4):e1005385.
83. Tian C, Hromatka BS, Kiefer AK, Eriksson N, Noble SM, Tung JY, et al. Genome-wide association and HLA region fine-mapping studies identify susceptibility loci for multiple common infections. *Nat Commun*. 2017 19;8(1):599.
84. Pickrell JK, Berisa T, Liu JZ, Séguirel L, Tung JY, Hinds DA. Detection and interpretation of shared genetic influences on 42 human traits. *Nat Genet*. 2016;48(7):709–17.
85. Kamoun M, Ben Dhifallah I, Karray E, Zakraoui L, Hamzaoui K. Association of small ubiquitin-like modifier 4 (SUMO4) polymorphisms in a Tunisian population with Behçet’s disease. *Clin Exp Rheumatol*. 2010 Aug;28(4 Suppl 60):S45–49.

86. Folseraas T, Melum E, Rausch P, Juran BD, Ellinghaus E, Shiryayev A, et al. Extended Analysis of a Genome-Wide Association Study in Primary Sclerosing Cholangitis Detects Multiple Novel Risk Loci. *J Hepatol*. 2012 Aug;57(2):366–75.
87. Aheman A, Luo H-S, Gao F. Association of fucosyltransferase 2 gene variants with ulcerative colitis in Han and Uyghur patients in China. *World J Gastroenterol*. 2012 Sep 14;18(34):4758–64.
88. Hazra A, Kraft P, Selhub J, Giovannucci EL, Thomas G, Hoover RN, et al. Common variants of FUT2 are associated with plasma vitamin B12 levels. *Nat Genet*. 2008 Oct;40(10):1160–2.
89. Barton SJ, Murray R, Lillycrop KA, Inskip HM, Harvey NC, Cooper C, et al. FUT2 gene variants and reported respiratory and gastrointestinal illnesses during infancy. *J Infect Dis*. 2019 Feb 15;219(5):836–43.
90. Serpa J, Mendes N, Reis CA, Santos Silva LF, Almeida R, Le Pendu J, et al. Two new FUT2 (fucosyltransferase 2 gene) missense polymorphisms, 739G→A and 839T→C, are partly responsible for non-secretor status in a Caucasian population from Northern Portugal. *Biochem J*. 2004 Nov 1;383(Pt 3):469–74.
91. Mottram L, Wiklund G, Larson G, Qadri F, Svennerholm A-M. FUT2 non-secretor status is associated with altered susceptibility to symptomatic enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in Bangladeshis. *Sci Rep [Internet]*. 2017 Sep 6 [cited 2019 Mar 29];7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5587594/>
92. Ballard O, Morrow AL. Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatr Clin North Am*. 2013 Feb;60(1):49–74.
93. Kobata A. Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins. *Eur J Biochem*. 1992 Oct 15;209(2):483–501.
94. Thurl S, Munzert M, Henker J, Boehm G, Müller-Werner B, Jelinek J, et al. Variation of human milk oligosaccharides in relation to milk groups and lactational periods. *Br J Nutr*. 2010 Nov;104(9):1261–71.
95. Chaturvedi P, Warren CD, Altaye M, Morrow AL, Ruiz-Palacios G, Pickering LK, et al. Fucosylated human milk oligosaccharides vary between individuals and over the course of lactation. *Glycobiology*. 2001 May;11(5):365–72.
96. Vidal R, Solari V, Mamani N, Jiang X, Vollaire J, Roessler P, et al. Caliciviruses and Foodborne Gastroenteritis, Chile. *Emerg Infect Dis*. 2005 Jul;11(7):1134–7.
97. Zanini B, Ricci C, Bandera F, Caselani F, Magni A, Laronga AM, et al. Incidence of Post-Infectious Irritable Bowel Syndrome and Functional Intestinal Disorders Following a Water-Borne Viral Gastroenteritis Outbreak. *American Journal of Gastroenterology*. 2012 Jun;107(6):891–899.

XII. Anexos

Anexo 1

Equilibrio de Hardy-Weinberg para los SNPs A y G de la posición 428 del gen FUT2

$$GG + 2GA + AA$$

$$P^2 + 2pq + q^2$$

$$0.8147 + 0.1818 + 0.0035 \text{ ____ (ec.1)}$$

Cálculo de frecuencias alélicas observadas:

$$G = G^2 + (2GA/2)$$

$$G = 0.8147 + (0.1818/2) = 0.9056 \text{ ____ (ec.2)}$$

$$A = A^2 + (2GA/2)$$

$$A = 0.0035 + (0.1818/2) = 0.0944 \text{ ____ (ec.3)}$$

Cálculo de frecuencias genotípicas esperadas:

$$p^2 + 2pq + q^2$$

$$(0.68)^2 + 2*0.68*0.32 + (0.32)^2$$

$$0.46 + 0.44 + 0.10 \text{ ____ (ec.4)}$$

$$(0.46*286) + (0.44*286) + (0.10*286)$$

$$(131.6) + (125.8) + (28.6)$$

Cálculo de equilibrio de Hardy-Weinberg:

$$\sum(\text{observados-esperados})^2/\text{esperados}$$

$$(233-131.6)^2/131.6 + (52-125.8)^2/125.8 + (1-28.6)^2/28.6$$

$$78.1 + 43.3 + 26.6 = 148 \text{ ____ (ec.5)}$$

$$\text{Chi}^2 \text{ calculado} > \text{Chi}^2 \text{ tabulado}$$

$$148 > 3.84$$

Conclusión: En la población estudiada, no hay equilibrio de Hardy-Weinberg

Anexo 2

Tabla 8. Comparación de características entre niños incluidos y no incluidos en análisis de secuenciamiento exploratorio

Variables	Incluidos (N=85) N(%)	No incluidos (N=236) N(%)	P
Sexo			0.150*
Masculino	47 (55.3)	109 (46.2)	
Femenino	38 (44.7)	127 (53.8)	
Bajo peso al nacer			0.733**
≥2.5 kg.	81 (96.4)	220 (96.9)	
<2.5 kg.	3 (3.6)	7 (3.1)	
Grupo sanguíneo			0.866**
O+	58 (78.4)	159 (78.7)	
O-	1 (1.3)	3 (1.5)	
A+	11 (14.9)	24 (11.9)	
B+	4 (5.4)	16 (7.9)	
Lactancia en los primeros 6 meses			0.766*
Exclusiva ≥80%	40 (51.3)	109 (49.3)	
Exclusiva <80%	38 (48.7)	112 (50.7)	
Estado secretor			1.00**
No secretor	1 (1.5)	3 (1.6)	
Secretor	65 (98.5)	180 (98.4)	
Genotipo			0.678*
Presencia SNP mut	68 (80.0)	165 (82.1)	
Ausencia SNP mut	17 (20.2)	36 (17.9)	

* El valor p fue obtenido mediante la prueba de Chi2.

** El valor p fue obtenido mediante la prueba exacta de Fisher.