



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS “DR. IGNACIO CHÁVEZ”**



**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**TESIS**

---

**“ESTUDIO DE BIOMARCADORES INFLAMATORIOS Y DE ACTIVACION  
PLAQUETARIA EN INFECCIONES VIRALES EMERGENTES EN MEXICO: DENGUE,  
CHIKUNGUNYA Y ZIKA”**

---

**PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA SALUD**

**PRESENTA:**

**Médico Especialista en Urgencias Médico Quirúrgicas  
Georgina Ortiz Martínez**

**Dirección de Tesis:**

**Doctora en Ciencias Químico Biológicas  
Martha Eva Viveros Sandoval**

**Maestro en Ciencias Médicas  
Cleto Álvarez Aguilar**

**Morelia, Michoacán  
Agosto del 2018**



La maestría en Ciencias de la Salud  
De la  
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo  
Pertenece al padrón de posgrado de excelencia del  
CONACyT

La estudiante de la Facultad de Ciencias Médicas y  
Biológicas  
“Dr. Ignacio Chávez”  
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo  
Recibió beca IMSS  
Durante la realización de su tesis de  
Maestría en Ciencias de la Salud  
CVU 737733

El Jurado designado por la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, aprobó la Tesis presentada por:

Médico Especialista en Urgencias Médico Quirúrgicas  
**Georgina Ortiz Martínez**

Para obtener el grado de  
**Maestra en Ciencias de la Salud**

**Doctora en Ciencias Químico Biológicas**  
**Martha Eva Viveros Sandoval**

---

**Maestro en Ciencias Médicas**  
**Cleto Álvarez Aguilar**

---

**Doctora en Ciencias Biología**  
**Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas**

---

**Virginia A. Robinson Fuentes PhD**

---

**Doctor en Ciencias Químico Biológicas**  
**Sergio Gutiérrez Castellanos.**

---

**Dirección de tesis:**

Doctora en Ciencias Químico Biológicas

Martha Eva Viveros Sandoval

Maestro en Ciencias Médicas

Cleto Álvarez Aguilar

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

La presente investigación se realizó en:

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas

“Dr. Ignacion Chávez”

División de Estudios de Posgrado

**COLABORADORES:**

**Dr. Fernando Cain Castañeda Martínez**  
Coordinador Auxiliar de Vigilancia Epidemiológica de la CIAE  
Delegacional Michoacán. IMSS

**MSP. Gloria Alicia Figueroa Aguilar.**  
Laboratorio Estatal de Salud Pública.  
Secretaría de Salud, Michoacán, México.  
Titular del Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Michoacán.

***Dr. Arturo Reyes Sandoval.***  
Nuffield Department of Medicine, Instituto Jenner.  
Universidad de Oxford, UK.

## DEDICATORIA

A Dios, por haberme dado la vida y permitirme llegar a este punto para lograr mis objetivos, además de su infinito amor. Por haberme dado fortaleza para continuar a pesar de las dificultades que se presentaron en mi camino.

A mi madre, por darme la vida, que ha pesar de su enfermedad y apoyo que necesitaba, siempre me motivo a seguir adelante y a acudir a cada uno de los eventos que se requería para continuar mi preparación, por haber estado al pendiente de lo que me hacía falta. Por su infinito amor, por el tiempo que dedico para cuidarme, por todos los valores que me inculco durante su vida y seguramente por seguir cuidándome desde el cielo.

A mi padre por su apoyo y consejos que me ha dado, por sus enseñanzas las cuales me han ayudado a ser una persona de bien, pero más que nada por su amor.

A César por su apoyo incondicional mantenido a través del tiempo, por sus consejos y por su amor que me ha motivado a superar estos retos.

A mi hija Hanna Michell, quien llegó a mi vida justo al inicio de este reto, la cual soporto mis ausencias y a pesar de ello obtuve su amor incondicional, por darme felicidad y alegría en cada uno de mis días.

A mis hermanos Luz y Carlos por ser pilares importantes en mi vida, por su eterno amor que da alegría a mi vida. Por acompañarme en los momentos difíciles.

A Martha Eva, mi profesora y amiga, la cual con sus consejos y enseñanzas me ayudaron a crecer profesionalmente, por su apoyo durante los momentos difíciles que pase durante este periodo.

A mis profesores que me guiaron con sus consejos para mejorar el desarrollo de mi trabajo.

A mis compañeros y amigos con los cuales compartimos momentos y aprendimos a ser mejor estudiantes, profesionales y personas.

Todo este trabajo ha sido posible gracias a ellos.

## AGRADECIMIENTOS

Al IMSS por promover la capacitación del personal y la realización de investigaciones así como por la beca y el apoyo financiero otorgado.

Al Departamento de Epidemiología del IMSS por todas las facilidades brindadas para el desarrollo del estudio.

A la UMSNH por permitir realizar el trabajo necesario y promover la realización de los estudios de investigación.

Al Instituto Jenner de la University of Oxford por el apoyo académico y financiero

A cada uno de mis asesores y maestros por guiarme durante este trayecto, por tener la paciencia necesaria, por corregir mis errores e impregnarme de sus conocimientos.

## INDICE

<b>DEDICATORIA</b>	<b>I</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>II</b>
<b>INDICE</b>	<b>III</b>
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	<b>V</b>
<b>INDICE DE TABLAS</b>	<b>VI</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCION</b>	<b>3</b>
<b>MARCO TEORICO</b>	<b>5</b>
ARBOVIRUS	5
EPIDEMIOLOGIA	5
CARACTERISTICAS DE LOS VIRUS	7
RESPUESTA INMUNE FRENTE A VIRUS	8
PLAQUETAS EN LA RESPUESTA INMUNE ANTE VIRUS	9
RESPUESTA INMUNOLÓGICA EN INFECCION POR DENV	12
RESPUESTA INMUNOLÓGICA EN INFECCIÓN POR CHIKV	13
RESPUESTA INMUNOLÓGICA EN ZIKV	14
MANIFESTACIONES CLÍNICAS	14
DIAGNOSTICO	15
DIAGNOSTICO DIFERENCIAL	17
COMPLICACIONES	18
TRATAMIENTO	19
MEDICION DE LA ACTIVACIÓN PLAQUETARIA	19
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>22</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>23</b>
<b>PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>24</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>24</b>
<b>OBJETIVOS ESPECIFICOS:</b>	<b>24</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>25</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>26</b>
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	26
ASPECTOS ÉTICOS	27

---

<b>RESULTADOS</b>	<b>28</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>37</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>40</b>
<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>42</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>43</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>51</b>
ANEXO 1. ABREVIATURAS	51
ANEXO 2. ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR VECTOR	53
ANEXO 3. CARTA DE APROBACIÓN DE UMSNH	57
ANEXO 4. CARTA DE APROBACIÓN DE IMSS	58

## INDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Distribución de casos de Dengue en Michoacán	7
Figura 2. Estructura del DENV	7
Figura 3. Estructura del ZIKV	8
Figura 4. Estructura del CHICK	8
Figura 5. Distribución de pacientes por tipo de infección	28
Figura 6. Distribución por género y gravidez	29
Figura 7. Distribución de casos positivos por semana epidemiológica	29
Figura 8. Distribución de las ETV por edad	30
Figura 9. Diferencias entre los valores de la citometría hemática	32
Figura 10. Diferencias entre los biomarcadores	34
Figura 11. Correlaciones entre biomarcadores y citometría hemática	36
Figura 12. Respuesta inflamatoria y plaquetaria durante la infección de ZIKV, DENV y CHIKV	41

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diagnóstico diferencial entre Dengue, Chikungunya y Zika	18
Tabla 2. Características demográficas y clínicas en pacientes positivos	31
Tabla 3. Estadística descriptiva de la citometría hemática	32
Tabla 4. Estadística descriptiva de biomarcadores	33
Tabla 5. Correlaciones	36

## RESUMEN

### Título.

Estudio de biomarcadores inflamatorios y de activación plaquetaria en infecciones virales emergentes en México: Dengue, Chikunya y Zika.

### Nombre

Dra. Georgina Ortiz Martínez. M.C.M Cleto Alvarez Aguilar, D.C. Martha Eva Viveros Sandoval. Dr. Fernando Caín Castañeda Martínez, PhD. Arturo Reyes Sandoval, M.S.P Gloria Alicia Figueroa Aguilar.

### Marco Teórico

Las infecciones por arbovirus son un problema de salud pública por las complicaciones que presentan. La respuesta inmune aún no está bien definida, se piensa que las plaquetas participan en esta respuesta. Sin embargo, no hay estudios que determinen su activación en estas infecciones. Nuestro objetivo es investigar la presencia de activación plaquetaria en la respuesta inmune ante infecciones por DENV, CHIKV Y ZIKV.

### Metodología

Se realizó un estudio de casos y controles, se realizó diagnóstico definitivo por qRT-PCR y se evaluaron los biomarcadores mediante ELISA. Se realizó medianas con rangos. Se analizaron las diferencias mediante Kruskal-Wallis con prueba Dunn y se determinó la correlación entre los biomarcadores inflamatorios y activación plaquetaria mediante una prueba de spearman.

### Resultados

Se confirmaron 20 casos a los cuales se les realizó citometría hemática y medición de biomarcadores inflamatorios y plaquetarios. Se encontró elevación modesta de los biomarcadores inflamatorio y plaquetarios medidos, suficiente para eliminar al virus, también indica una activación plaquetaria. De forma significativa encontramos en el grupo de ZIKV disminución de Hb, Hto y linfocitos incremento del VPM, leucocitos, FvW y PF-4. En el grupo de CHIKV disminución de Hb y Hto, incremento de VPM, leucocitos e IL-6. En el grupo de DENV incremento de FvW. Principalmente se encontró asociación positiva entre IL-6 con BT y sP-Selectina. Así como IFN $\gamma$  con BT y FvW. Finalmente, VPM se asoció con incremento de FvW y disminución de PF-4. Lo cual nos indica una asociación entre la respuesta inflamatoria y la activación plaquetaria.

### Conclusiones

Durante la respuesta inmunológica frente a virus se presenta una respuesta similar entre estas arbovirosis, con algunas diferencias entre cada una. Se presenta activación plaquetaria en las tres, con predominio en la respuesta inflamatoria en CHIKV, mayor activación plaquetaria en ZIKV y en DENV se observa principalmente disfunción endotelial.

**Palabras clave:** activación plaquetaria, respuesta inmune, biomarcadores inflamatorios, biomarcadores plaquetarios, ZIKV, DENV, CHIKV.

## **ABSTRACT**

Arbovirus infections are a problem of public health by complications presenting. Immune response is still not well defined, it is thought that platelets are involved in this response. However, there are no studies that determine its activation in these infections. Our goal is to investigate the presence of Platelet Activation in the immune response to infections by DENV, CHIKV and ZIKV.

### **Methodology**

A study of cases and controls was conducted, qRT-PCR was performed for diagnosis and by ELISA biomarkers were evaluated. Differences levels of biomarkers were assessed using Kruskal-Wallis test Dunn and determined the correlation between inflammatory biomarkers and Platelet Activation by spearman test.

### **Results**

We confirmed 20 cases which was performed Cytometry hematic and measurement of platelet and inflammatory biomarkers. We found modest elevation of platelet and inflammatory biomarkers measured, enough to depurate the virus, also indicates a platelet activation. We found significantly decreased of Hb, HCT and lymphocyte, as well as increase the VPM, leukocytes, FvW and PF-4 in the ZIKV group. In the Group of CHIKV we obtain a decrease of Hb and HCT also an increase of VPM, leukocytes and IL-6. In the group of DENV we found an increase of VWF. We next tested the relation between biomarkers and groups, mainly was found a positive association between IL-6 with BT and sP-Selectin. As well as IFN $\gamma$  with BT and FvW. Finally, VPM was associated with VWF increase and PF-4 decrease. Which indicates an association between inflammatory response and platelet activation.

### **Conclusions**

During the immune response against viruses was present a similar response among these Arboviruses, with some differences between each one. Platelet activation occurs in all three, with a predominance in the inflammatory response in CHIKV, more platelet activation in ZIKV and in DENV we observed mainly endothelial dysfunction.

## INTRODUCCION

Las infecciones por arbovirus emergentes Dengue, Chikungunya y Zika se han convertido en un grave problema de salud pública a nivel internacional, debido a que estas enfermedades pueden presentar complicaciones severas. El vector común de estas enfermedades es principalmente el mosquito *Aedes aegypti*, su distribución se ha ampliado, al habituarse a altitudes mayores y menores temperaturas.

El cuadro clínico tiene muchas similitudes, lo que ha ocasionado confusión para el diagnóstico clínico preciso.

En el presente estudio, se propone estudiar a través de la cuantificación sérica y plasmática de biomarcadores inflamatorios y plaquetarios, la presencia de activación plaquetaria en este grupo de infecciones: Dengue (DENV), Chikungunya (CHIKV) y Zika (ZIKV), lo cual puede deberse a su participación en la respuesta inmune.

La infección por el virus del Dengue (DENV) es un problema mundial que se ha incrementado drásticamente en los últimos años. El DENV es un virus RNA de sentido positivo (Virus del dengue tipo 1 hasta el tipo 4), de la familia Flaviviridae. Existen diferencias en el genotipo del mismo serotipo pero no son clínicamente relevantes. La diversidad antigénica del DENV es importante debido a la falta de inmunidad cruzada a largo plazo entre los 4 tipos de virus, permitiendo infecciones múltiples consecutivas (1). Dichas infecciones múltiples consecutivas se presentan generalmente en la forma severa de la enfermedad.

En México durante el 2015, se confirmaron 4,159 casos de fiebre del dengue, 1,073 casos con dengue hemorrágico, y se confirmaron 4 muertes por dengue. En Michoacán se tuvieron 307 casos de dengue, de los cuales 294 fueron casos de fiebre del dengue y 13 de dengue hemorrágico; los cuales fueron del serotipo 1. Las edades en que se presenta con mayor frecuencia la fiebre del dengue es entre los 10 y 29 años de edad, el dengue hemorrágico se concentra también entre los 10 y 29 años con un pico entre los 15-19 años; sin predominio de género(2).

El (CHIKV) es un arbovirus, de cadena positiva de RNA con tres genotipos. Se ha demostrado que infecta y es transmitido por los mosquitos *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*. Fue identificado en África cerca de los años 1950's y desde entonces ha sido causa de epidemias en el continente Africano, región del Océano Índico y países del sureste de Asia como la India. Otros casos han sido importados a regiones de Norte América, Francia y Japón. La infección por CHIKV actualmente es una enfermedad global desde la expansión del mosquito vector, ya que ha logrado diseminarse a climas templados(3).

En México se presentó desde el 2014, registrándose hasta la semana 10 del 2015 casos autóctonos en las entidades de Chiapas, Guerrero, Oaxaca, Sinaloa y Sonora. Al cierre del 2015 se presentaron 11,577 casos de chikungunya en México, de los cuales 1606 fueron de Michoacán con 1 defunción, con predominio en mujeres hasta 65%. A la semana 43 del 2016 se tienen 621 casos de chikungunya de los cuales 9 son de Michoacán(4).

El virus del Zika (ZIKV), es un mosquito flavivirus, desde el 2007 ha tenido atención internacional; se reportan algunas epidemias, localizadas en las Islas Yap, Estados Federales de Micronesia y recientemente en Brasil, en donde se observó una importante cantidad de embarazadas infectadas, muchas de ellas tuvieron productos con microcefalia. Ambas epidemias han sido atribuidas al genotipo asiático de ZIKV e introducidas por turistas(5).

En el 2015 el ZIKV llegó a México, a la semana 43 del 2016 se han confirmado 694 casos de estos 212 son embarazadas, 56 de los casos son de Michoacán de los cuales 18 son embarazadas y aun no se han documentado malformaciones en los productos(6).

El ZIKV causa una un cuadro autolimitado, parecido a la fiebre del dengue, con una incubación hasta de 10 días. Se han realizado pocos estudios acerca de la respuesta inmune y es muy importante para su uso clínico. Hay pocos estudios de la respuesta inmunológica e inflamatoria en infección por ZIKV(5) por lo que aún faltan estudios para caracterizar la fisiopatología en esta enfermedad.

Los estudios para caracterizar la respuesta inmune en estas infecciones se han llevado a cabo principalmente en Dengue(7–16), seguido de Chikungunya(3) (17–20) con pocos estudios en Zika(5). Sin embargo los resultados que se han encontrado han llegado a ser diferentes en una u otra población, por lo que se requieren más estudios para enriquecer la información y poder establecer el mecanismo de la respuesta inmune e inflamatoria en estas enfermedades, dando la oportunidad de desarrollar tratamientos más específicos y evitar o prevenir complicaciones. Además pocos estudios incorporan a las plaquetas dentro de esta respuesta inmune. Es importante describir esta respuesta en nuestra población para identificar y validar la información encontrada así como para fortalecer los modelos pronósticos construidos con la expresión de diferentes biomarcadores y diferenciar la respuesta inmune en estas infecciones. En el presente estudio se propone estudiar la respuesta inmune inflamatoria a infecciones por arbovirus y determinar si las plaquetas contribuyen a esta respuesta inmunológica.

## MARCO TEORICO

### Arbovirus

Los arbovirus (born virus), son virus transmitidos por artrópodos, esta integrado por 600 familias, de las cuales 80 son patógenos para los humanos. Entre los que destaca: la familia de Flaviviridae, que incluye a los virus del dengue (DENV), zika (ZIKV), fiebre amarilla, virus del Nilo occidental. También encontramos la familia de los Togaviridae, donde se encuentran clasificados el chikunya (CHIKV), virus del bosque Semliki y virus de la encefalitis equina venezolana. Estos virus ocasionan una gran diversidad de manifestaciones clínicas, que varían en severidad, algunas de ellas ocasionando secuelas importantes o la muerte. (21) Tienen una distribución geográfica con predominio en los trópicos(22), sin embargo el calentamiento global está favoreciendo un incremento en las zonas geográficas donde se encuentran estos virus(17).

Los arbovirus por definición tienen al menos dos huéspedes, la mayoría se mantienen en un ciclo complejo que involucra un huésped vertebrado no humano y un artrópodo. Este ciclo generalmente es silencioso y no detectable en la naturaleza hasta que un cambio ambiental permite que el virus escape del ciclo primario a otro huésped vertebrado humano debido a que el hombre invade territorios donde se encuentra anidada esta infección. Pocos arbovirus, causan altos niveles de viremia para poder ser transmitidos de persona a persona por medio de un artrópodo como vector, que puede llegar a ocasionar epidemias. Entre estos arbovirus se encuentra el virus del dengue, zika, fiebre amarilla y chikungunya(22). Estos arbovirus comparten en común la transmisión por la piel a través de la mordida del artrópodo(23).

La alta tasa de transmisión en asociación con la actividad epidémica y la transmisión por diferentes vectores y a diferentes vertebrados en nuevas áreas geográficas puede permitir los cambios genéticos en los patógenos. Estas nuevas cadenas de virus pueden tener mayor potencial y virulencia. Finalmente la pérdida del control del vector y un deterioro en la capacidad de la infraestructura en salud pública han contribuido a la dispersión e incremento de las epidemias (22). El calentamiento global, está provocando que incrementen las zonas geográficas donde se encuentran algunos vectores que transmiten infecciones virales, entre otros (17).

Dengue, Chikungunya y Zika son tres diferentes infecciones virales que tienen en común el vector: *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* (16). Éstas infecciones se han convertido en un grave problema de salud pública en el mundo y en México.

### Epidemiología

Se cuenta con reportes acerca de la infección por DENV desde hace más de 1000 años sin embargo fue hasta 1943, que se logró aislar por primera vez, se han aislado 4 tipos de DENV denominados 1, 2, 3 y 4. El ciclo de vida de este virus involucró la infección de primates no humanos y mosquitos, se cree que la transmisión al humano ocurrió poco

tiempo después para las cuatro tipos (24). Esta enfermedad se diseminó rápidamente por Asia, islas del Pacífico, Europa y África. Se considera que este virus llegó a América desde la llegada de los primeros europeos desde 1635, pero hasta la presentación del Dengue Grave en 1962 fue que se consideró un problema de salud pública. A finales del siglo XX se dispersó de forma acelerada el principal vector de este virus, *Ae. aegypti* debido a la urbanización y globalización(25)(26). En DENV llegó a México desde la década de los 50's, instaurándose la infestación paulatina a lo largo del país. Actualmente contamos con los 4 tipos de virus en el país. En Michoacán se encuentra el tipo 1 y el tipo 2 (26).

Se conoce el primer reporte sobre infección de CHIKV en 1952 en Tanzania, el cual fue reportado por Robinson y Lumsden en 1955(27). Durante el 2004 se reportó un brote en Lamu Island, Kenya en el cual se encontró IgM o IgG positivos para CHIKV en el 75% de la población(28). En el 2005 y 2006 se vieron afectados el 35% de los habitantes de Reunion Islands(29). El CHIKV se diseminó hacia América, presentándose casos en el Caribe, México y Sur América en el 2013. Y en el 2015 Estados Unidos reportó casos positivos(30).

El ZIKAV fue aislado por primera vez en el mono Rhesus, en Uganda, África en 1947, en 1952 se aisló en suero humano. En los años posteriores el virus se fue dispersando a todos los continentes a través de su vector(31). La pandemia se inició en el año 2007 en Micronesia; posteriormente, en el año 2013 se presentó otro brote en la Polinesia Francesa, detectando 10,000 casos(32). En el 2014 se registran los primeros casos en América, los países más afectados por sus complicaciones han sido Brasil y Colombia (33). A finales del 2015 se registraron los primeros casos en México(33). En marzo del 2017 la Organización Mundial de la Salud (OMS) registra su distribución en 84 países, de los cuales 31 han reportado malformaciones congénitas asociados a ZIKAV y 23 han incrementado su incidencia de síndrome de Guillain-Barré(34).

En los últimos años México ha reportado casos de dengue, chikungunya y zika (35). De manera particular, Lázaro Cárdenas es el municipio con mayor número de casos acumulados (Figura 1), siendo una de las principales razones debido a sus características geográficas que han generado el nicho ecológico ideal para la reproducción del vector: sus límites colindan con Guerrero y el Océano Pacífico, dentro de su hidrografía tiene varios ríos, el más importante el río Balsas, y su localización en el eje intertropical favorece un clima cálido-subhúmedo. Además, al ser un puerto con importante actividad comercial se favorece la diseminación de la enfermedad. Históricamente, esta zona ha presentado otras infecciones virales emergentes transmitidas por este vector en los últimos años, como es el caso de Dengue y Chikungunya, registrando entre el 2012 y 2017 un acumulado de 20,421 casos de Dengue no grave y 1,480 casos de Chikungunya, lo cual representa cerca del 40% de los casos acumulados en el Estado.



Figura 1. Distribución de casos de Dengue en Michoacán.

### Características de los virus

El DENV es parte de la familia Flaviviridae, cuenta con cuatro serotipos DENV 1 al 4, con base a criterios biológicos, inmunológicos y moleculares. Consta de una cadena de RNA (Ribonucleic acid) en sentido positivo de 11kb. Este RNA codifica tres proteínas estructurales: proteínas de capsida (C), proteínas de membrana (M) y proteínas de la envoltura (E); el precursor de la proteína M es un fragmento proteolítico llamado prM; también está formado por 7 proteínas no estructurales (NS), denominadas NS1, NS2A/B, NS3, NS4A/B y NS5 las cuales se encuentran involucradas en la replicación del RNA. (36). Figura 2. Las propiedad inmunológicas y antigénicas de este virus, son dadas por las proteínas estructurales: (P, M, E).

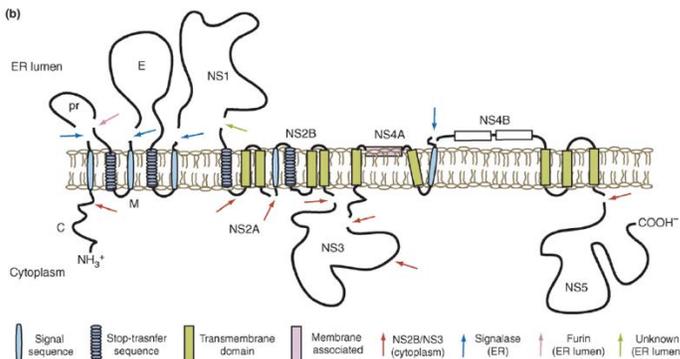


Figura 2 Estructura del DENV. Tomado de P. Rushika y Kuhn RJ(36).

El ZIKV también pertenece a la familia Flaviviridae, está formado por un RNA de cadena positiva. Estudios recientes han observado que su estructura es similar al DENV y Virus del Oeste del Nilo (WNV); sin embargo tiene diferencias estructurales en las glicoproteínas de la envoltura, región importante para la adhesión a los receptores de la célula huésped, lo que puede caracterizar su tropismo celular y manifestación de la enfermedad. Contiene un RNA de 11kb, con múltiples copias de las proteínas de la cápsida, las cuales rodean su

estructura isocáedrica. Consta de cerca de 500 aminoácidos en la E y aproximadamente 75 aminoácidos en la membrana (M). Contiene cerca de 165 aminoácidos formando (prM). Todas ellas ancladas en la membrana lipídica. El genoma también codifica para siete NSp; las cuales se encuentran involucradas en la replicación, ensamble y antagonización de la respuesta innata del huésped a la infección (37). La proteína NS3 tiene un papel importante en la replicación viral (38). Se han observado tres subclases de este virus, el ZIKV de Senegal y las líneas de África del Este y del Oeste.

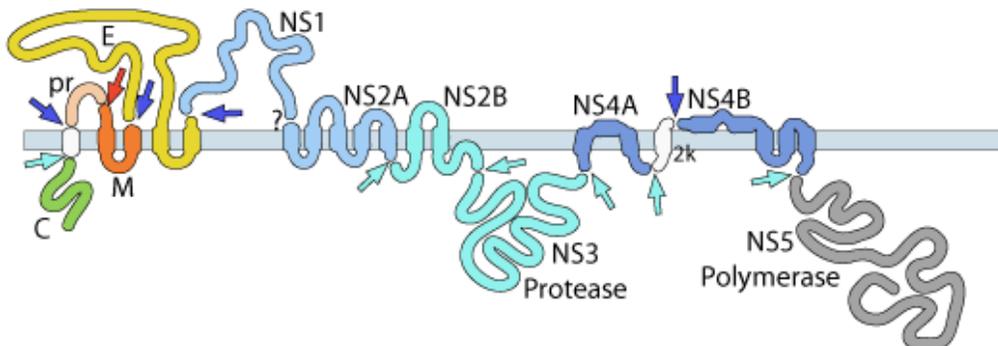


Figura 3. Estructura del ZIKV, tomado de <https://viralzone.expasy.org>(39)

El virus de Chikungunya (CHIKV) es de la familia *Togaviridae*, es un alfavirus de una cadena positiva de RNA, mide 60-70nm diámetro, cuenta con una envoltura de fosfolípidos, tiene una longitud de 11.5kb, está formada por cuatro proteínas no estructurales y tres proteínas estructurales: la cápside y dos glicoproteínas que forman la envoltura E1 y E2, estas últimas forman las espículas en la superficie del virión. E2 se une a receptores celulares desconocidos para entrar a la célula mediante endocitosis, E1 incluye un péptido de fusión que expuesto a pH alto libera la nucleocápside dentro del citoplasma en la célula huésped (40). Se conocen 3 líneas diferentes, Africano del Oeste, el Asiático, Africano del Sur, Centro y Este (ECSA) y el linaje del Océano Índico.

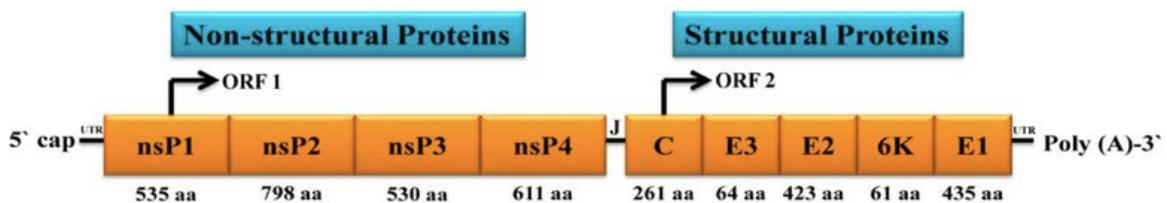


Figura 4. Estructura del CHIKV. Tomado de Jain Jaspreet et al(41).

### Respuesta inmune frente a virus

Los eventos inmunológicos tempranos que ocurren en la piel tienen gran influencia en la severidad de la infección viral(23).

Aunado a la inoculación del virus por la picadura del mosquito, también se inocula saliva o extractos de las glándulas salivales(SGEs), lo cual induce mayor velocidad en la viremia,

alta carga viral y mayor morbilidad comparada con la inoculación en ausencia de los factores derivados del mosquito, ya que modulan eventos en el sitio de la infección. Esto se ha demostrado en la picadura por *Ae. Aegypti* con los arbovirus DENV, CHIKV, fiebre de las montañas rocosas y virus del valle Caché en ratones(42–44).

El mosquito perfora la piel y encuentra los vasos sanguíneos por medio de su probóscide, inyecta su saliva que contiene una amplia variedad de biomoléculas (SGEs) que varían entre especies, en *Ae. Aegypti* se han encontrado vasodilatadores e inhibidores de la coagulación(45), las SGEs junto con los patógenos ocasionan diversos efectos fisiológicos en el huésped entre ellos el incremento del flujo sanguíneo y vasodilatación por la histamina, otras SGEs estimulan el sistema inmunológico activando el sistema del complemento, mastocitos, macrófagos, células dendríticas y Natural Killer. (23,45,46).

El mastocito activado se degranula, liberando citocinas, quimiocinas, mediadores lipídicos e histamina a su vez activa el endotelio vascular aumentando permeabilidad de los vasos sanguíneos y pérdidas de plasma en la piel, aumenta la expresión de moléculas de adhesión facilitando la migración de leucocitos principalmente neutrófilos(23).

Los macrófago y células endoteliales activadas expresan CCL2, regulando la migración de monocitos, basófilos, linfocitos T y NK los cuales expresan CCR2 o CCR3(47). Los macrófagos activados secretan IL1B y TNFalfa activando al endotelio, este último también activa a neutrófilos.

De forma simultánea, las SGEs y la picadura del mosquito inducen que las Células T expresen IL10(23), lo que favorece un ambiente antiinflamatorio transitorio aunado a la presencia de células susceptibles al virus, facilitando que los virus infecten fibroblastos, células dendríticas o macrófagos que habitan en la dermis(23).

Las CD dérmicas migran a través del drenaje linfático para inducir una respuesta inmune adaptativa. Así los virus llegan a los nódulos linfáticos, a través de los cuales se transporta y afecta a otros órganos. La diseminación del virus puede ser acelerada por las SGEs que inducen pérdida de plasma dentro de la piel exacerbando la severidad de la enfermedad(42).

La reacción inflamatoria por la picadura del mosquito varía entre los individuos, debido a predisposición genética o hipersensibilidad. En ratones se observó que aquellos con hipersensibilidad expresa citoquinas Th2 como IL-4, observando que los pacientes con hipersensibilidad e IL4 tienen mayor predisposición a infección a arbovirus(48).

### **Plaquetas en la respuesta inmune ante virus**

Debido al trauma tisular, el factor tisular activa la protrombina y la convierte en Trombina, siendo este el activador plaquetario más potente(45). Al activarse las plaquetas se activan receptores y liberan biomoléculas de gránulos alfa, gránulos densos y gránulos lisosomales. Las plaquetas activadas generan diversas acciones en favor de la respuesta inmunológica, también actúa sobre otras células para incrementar su función inmunológica(49).

Las plaquetas activadas detectan PAMP's a través de los TLR (receptores tipo Toll), se cree que el TLR4 favorece la secreción de citoquinas y activación de diferentes células inmunológicas, inducen la interacción plaqueta-neutrófilos a través de la expresión de ligandos CD62P-PSGL1, GPIIb/IIIa, CD11B-CD18(50) y genera NETs (trampas extracelulares de neutrófilos) y consecuente fagocitosis de bacterias, debido a esta interacción también se generan especies reactivas de oxígeno (ROS) con efecto bactericida, aunque también generan daño endotelial(49) (50). La unión plaqueta-neutrófilo. Las plaquetas también expresan MHC1 tanto intracelular como extracelular, para presentar antígeno a los linfocitos T CD8+ y activarlos.

Las plaquetas activadas liberan el contenido de sus gránulos; los gránulos densos liberan ADP y ATP, estimulando los receptores P2X1 y P2Y12 lo cual activa las plaquetas expectantes e intensifica la liberación de gránulos alfa, también incrementa la generación de PMPs y quinocidinas.

Algunas de las proteínas liberadas participan contra infecciones virales, como HDPS (host defense peptides: péptidos de defensa del hospedero), B-defensinas y PMPs (Proteínas microbicidas plaquetarias) que neutralizan al virus, citocinas inflamatorias y las quinocidinas (quimiocinas microbicidas) con potente acción contra virus, bacterias y protozoarios; con efecto dual como quimiocina y proteína efectora microbicida, ya que realiza funciones inmunorreguladores como quimiotaxis y activación de células de defensa del huésped complementarias y de adhesión proteolítica(49).

Las plaquetas activadas expresan CD40L o también conocido como CD154. El cual se une al CD40 de la célula endotelial activándola y liberando moléculas de adhesión, como ICAM1, VCAM y CCL2. Después de la activación las plaquetas se liberan micropartículas vesiculares, las cuales liberan mediadores solubles, entre ellos el sCD40L este estimula la secreción de IL17 quien induce la expresión de E-selectina y P-selectina y consecuente liberación de FT e IL6. La P-Selectina favorece el reclutamiento de neutrófilos al sitio de la infección. Por otro lado también promueve la activación plaquetaria mediante ADP por vía extracelular ERK2 o MAPKI. Así mismo favorece la polarización del leucocito T a Th1 o Th 17. La liberación de IL-6 durante la inflamación favorece la maduración de los megacariocitos para formar proplaquetas y estimular la activación plaquetaria(51).

Se ha observado que en ausencia de plaquetas o cuando el CD40L o sCD40L disminuye el número de antígenos específicos de los linfocitos T, disminuyendo la respuesta inmunológica. También disminuye el cambio de isotipo de los linfocitos T. Las plaquetas no son necesarias para la formación de linfocitos en el centro germinal cuando hay grandes cantidad de linfocitos T CD4 helper. La serotonina derivada de las plaquetas puede inhibir la migración de los linfocitos T pero también pueden ocasionar vasodilatación y favorecer el rodamiento de los linfocitos T CD8.

La interacción CD40-CD40L ocasiona diferentes efectos en la inmunidad adaptativa: Se ha observado que incrementa la respuesta de las células T CD8+ y promueve su respuesta. Induce la maduración y activación de las Células dendríticas, favorece la adhesión de los linfocitos al endotelio y subsecuente migración a los sitios de inflamación, facilitan la

maduración y diferenciación de los linfocitos B y del cambio de isotipo, ocasionando una producción sostenida de IgG y lo cual aumenta la formación de leucocitos B en el centro germinal. La interacción entre plaqueta y Células Dendríticas ocasiona la liberación de citoquinas IL-10 y disminuye IL-12p y TNF $\alpha$ . Colabora en producción de CD80-CD86.

Los leucocitos T internalizan IgG, ocasionando que las plaquetas expresen CD40L o CCL5, con lo que facilita la inmunidad mediada por células T y protege de bacterias patógenas. Se ha observado que la presencia de CCL5 incrementa la respuesta de los linfocitos Th1 en HCV. Las plaquetas liberan PF4, el cual disminuye la apoptosis de monocitos e incrementa su diferenciación a macrófagos. PF4 incrementa la adhesión neutrófilo-célula endotelial activándolos y liberando su contenido.

Sin embargo, la activación plaquetaria en infecciones virales puede tener efectos adversos, ya que CXCL4 en HIV incrementa la infección de macrófagos y la fibrosis hepática. CCL5 incrementa el reclutamiento de leucocitos y favorece su infección. Los gránulos densos secretan 5HT, ocasionando disminución de la citotoxicidad de los linfocitos T y favorece mayor infección por HCV y HBV. La interacción leucocito-plaqueta facilita la infección de los leucocitos, incrementando su activación y la inflamación. La activación de plaquetas favorece la activación de más plaquetas, lo cual incrementa el efecto procoagulante(51).

Durante la activación plaquetaria se incrementa MIP-1 $\alpha$  el cual ocasiona liberación de histamina de los basófilos y también actúa como quimiotáctico para Linfocitos T. TGF-B también liberado por plaquetas actúa como inmunosupresor, inhibiendo o estimulando a los neutrófilos.

Durante las infecciones virales se puede observar trombocitopenia inducida por virus, lo cual se explica por diferentes mecanismos ya sea por disminución en la producción de plaquetas o por aumento en la destrucción plaquetaria(51).

La infección viral puede afectar la secreción de citocinas del huésped, alterando la producción de EPO(52–54). Disminución de EPO por destrucción de hepatocitos (55). Infección de las células madre hematopoyéticas ocasionando disminución de CFU y consecuente disminución de plaquetas (56). Infección de megacariocitos alterando su función y proliferación(57)(58).

En otras infecciones virales las plaquetas desempeñan también un papel importante. Tsegaye y cols. demostraron que la activación plaquetaria que conduce a liberación de CXCL4 (también llamado factor plaquetario 4) inhibe la infección por HIV-1 de células T in vitro(59). Cocci y cols. identificaron otra quimiocina plaquetaria, CCL5 (también conocida como RANTES), como un muy importante factor supresor de HIV (60).

Las plaquetas activadas promueven el anclaje y activación de neutrófilos a través de la expresión de selectinas, entre las que destaca el CD40L (o CD154) y de citocinas y quimiocinas inflamatorias. El CD154 expresado por plaquetas puede interactuar con su receptor, CD40 en células endoteliales regula la expresión de moléculas de adhesión como ICAM1, VCAM1 Y CCL2, reclutando leucocitos a sitios de inflamación, además esta interacción CD40-CD154 promueve la activación de monocitos y células dendríticas, lo

que lleva a una presentación de antígeno incrementada. Por otro lado, las plaquetas activadas liberan a circulación CD154 soluble el cual es un indicador del grado de activación plaquetaria; este mediador induce la expresión de selectinas E y P, y la liberación de IL-6 y factor tisular (TF) (61,62) el CD154 liberado de plaquetas puede también promover la diferenciación de células B y el switch de isotipo en inmunoglobulinas (63).

La participación de plaquetas en las infecciones virales ha sido estudiada recientemente como es el caso de DENV, VIH, VHC; sin embargo su colaboración en infecciones por CHIKV y ZIKV aún no ha sido descrita (63–65).

### **Respuesta inmunológica en infección por dengue**

El DENV es inoculado en la piel, se sabe que infecta a células dendríticas residentes a través de DC-SIGN(66) y a los macrófagos por su Receptor de manosa(66). Los PAMPs son reconocidos de forma intracelular por TLR3 o bien a nivel intracitoplasmático por medio de MDA5 o RIG-1. Estos receptores desencadenan una respuesta que produce la liberación de algunas citoquinas como  $TNF\alpha$ , IFN I, IFN $\gamma$ , IL6, VEGFA. El IFN $\alpha$  activa a las NKT. Este ambiente proinflamatorio activa células estromales y endoteliales sin necesidad de estar infectadas y se favorece el reclutamiento de leucocitos, NK y Linfocitos T(67)(68).

Las Células dendríticas se dirigen a los nódulos linfáticos, en donde el virus puede trasladarse y producir la viremia. Por otra parte las Células dendríticas presentan el Ag a Linfocitos T(69). Aun sin la cooperación de Linfocitos T helper, los linfocitos B se activan. Los LB naive se dirigen hacia los nódulos germinales y producen linfocitos B de memoria y plasmoblastos. Los primeros se localizan en órganos linfoides. Las células plasmáticas se localizan en la médula ósea y forman anticuerpos contra las proteínas E, PrM y NS1 del DENV. Sin embargo pueden tener reacción cruzada con cualquier otro de los serotipos(70)(71).

Los Ac anti-NS1, induce muerte celular mediada por complemento y una trombocitopenia acelerada. Activa las células endoteliales, incrementando la permeabilidad vascular, se incrementa la E-Selectina lo que conduce a activación plaquetaria e incremento en la adhesión plaquetaria y a su vez activación de la cascada de la coagulación, en la cual la producción de trombina produce mayor activación plaquetaria(51).

Los monocitos que reconocen al DENV, produce factor activador plaquetario, activando las plaquetas y ocasionando apoptosis plaquetaria en dengue severo. En infecciones severas se desencadena la cascada de coagulación por vía del Factor tisular, generando trombina y activando las plaquetas y subsecuente depuración por medio de la vía del PAR (receptor activador de proteasas), el cual es un importante modulador la respuesta inmune innata en la infección vira(51,71).

Las plaquetas reconocen partículas virales unidas a inmunoglobulinas como IgG las cuales interactúan con GpIIb/IIIa y posteriormente activa el receptor Fc $\gamma$ RII, el cual ocasiona agregación plaquetaria que se ve incrementada por CXCL4(51,71).

En julio de 2015, Symon y cols. demostraron que el DENV se une a la superficie plaquetaria a través de dos receptores para DENV: HSP y DC-SIGN, estos virus pueden reproducirse en su interior para después ser liberados a la circulación y seguir replicándose. Este mecanismo podría ser similar en otros virus de RNA de cadena sencilla, pero aún faltan estudios que lo demuestren(72).

Algunos estudios han demostrado que las plaquetas de pacientes infectados por DENV muestran una capacidad de activación incrementada al compararlas con plaquetas de sujetos sanos; así como signos de disfunción mitocondrial y mayor activación de apoptosis mediada por caspasas (11).

Las plaquetas activadas y su apoptosis, generan micropartículas plaquetarias, las cuales fueron estudiadas por Punyadee y cols. encontrando que pueden ser un biomarcador que puede predecir el dengue severo. Además encontraron que las plaquetas incorporan a su superficie proteínas virales como la proteína E y NS1 del DENV (9).

### **Respuesta inmunológica en infección por chikv**

Se conoce poco acerca de la respuesta inmunológica, al igual que con otros arbovirus, el virus tras ser inoculado en la piel infecta a los fibroblastos, células musculares y osteoblastos. Los receptores que captan al CHIKV son los TLR3, TLR7, RIG-1, MDA5; estos desencadenan cambios en ensamblajes moleculares hasta inducir una traslocación de IRF3 y de IFN (interferón) tipo I  $\alpha/\beta$ (73). Los cuales van a favorecer una respuesta inflamatoria al favorecer la liberación de IL-6 y MCP-1 (CCL2) este último conduce a la formación de Macrófagos derivados de monocitos. El Macrófago migra a los tejidos y produce IL6, TNF $\alpha$  y GM-CSF(74). A su vez el IFN  $\alpha$  activa a las NK(75)(76). El IFN I a su vez produce una elevada expresión de prostaglandinas y subsecuente incremento de tromboxano A2, el cual actúa como potente activador plaquetario(77).

Como parte de la respuesta inmune celular también se libera IFN $\gamma$  el cual estimula la liberación de IL-10 y RANTES (Regulador de la activación, expresión y secreción de linfocitos T normales). IL-10 contribuye a la activación de linfocitos B y cambio de isotipo a IgG(78)(79). Por su parte RANTES activa los linfocitos T. La IL 4 y 7 colaboran en la activación de los linfocitos B (20,80,81) . La IL-12 coopera en la activación de los NK(82)(83).

En cuanto a la respuesta inmune adaptativa varios estudios han observado participación de los linfocitos T CD8+(78), se ha observado en los casos crónicos la presencia de grandes cantidades de CD4+(84), estos migran a la capsula articular y liberan IFN $\gamma$ (85). Los Linfocitos T reguladores parecen tener gran importancia en el proceso de la resolución de la enfermedad(86). Por su parte los linfocitos B generan anticuerpos contra las proteínas de envoltura, lo que bloquea varios pasos del ciclo de vida del virus(87).

## Respuesta inmunológica en zikv

Una vez que el mosquito inocula el ZIKV en el ser humano, los receptores TLR3, RIG-1 y MDA-5 de los fibroblastos lo reconocen y fagocitan, en su interior este virus evade la respuesta celular y se replica por mecanismo que aún no están bien definidos(88). Estos receptores desencadenan cambios moleculares que activan una respuesta por IFN I, activan CCL5. Se libera IL1 $\beta$  y AIM2 activando las vías del inflamosoma(89).

## Manifestaciones clínicas

En la infección por DENV, se incuba por 3-7 días, los síntomas aparecen de forma súbita, observándose 3 fases, la *fase febril*, con temperatura  $>38.5^{\circ}\text{C}$ , acompañado de cefalea, vomito mialgias, dolor articular, algunas veces rash macular, en ocasiones puede observarse petequias y/o equimosis y hepatomegalia. Los niños son menos sintomáticos en esta etapa. Los hallazgos de laboratorio incluye trombocitopenia y leucopenia de leve a moderada; frecuentemente con elevación de transaminasas como la Aspartato Amino Transferasa (AST) y Alanino Amino Transferasa (ALT). Después de esta fase la mayoría de los pacientes se recuperan sin complicaciones. La *fase crítica*, se presenta con mayor frecuencia en niños y adultos jóvenes, que desarrollan un síndrome de pérdida vascular, caracterizado por hemoconcentración, hipoproteinemia, derrame pleural, ascitis, disminución de la amplitud del pulso, colapso vascular, hipotensión, shock por dengue y muerte. La *fase de recuperación*, se caracteriza por la reversión de la alteración en la permeabilidad vascular, ésta revierte espontáneamente a las 48-72 horas, con una importante mejoría sintomática. Puede aparecer un segundo rash maculopapular leve a moderado, con lesiones pruriginosas, que se resuelven en 1-2 semanas con descamación de las lesiones (1).

La infección por CHIKV es de inicio súbito y normalmente se autolimita en 5-7 días, está caracterizado por una aparición súbita de fiebre alta, rash exantemático, cefalea, náusea, vómito, mialgias y artralgias que van de leves a severas. La palabra Chikungunya significa “doblarse” debido a la postura que es tomada por los pacientes infectados por Chikungunya con dolores articulares severos. La fase aguda dura alrededor de 2 semanas y el dolor articular puede persistir meses o años. Hay pocos estudios acerca de la respuesta inmune y actualmente no hay terapéutica específica disponible(40), estos síntomas tienden a ser más severos en los pacientes que ya sufren de condiciones artríticas crónicas, los ancianos y pacientes con comorbilidades inflamatorias (90). La infección aguda puede dejar como secuela síntomas crónicos de poliartalgia que persisten durante semanas e incluso años. Durante la infección se presenta *trombocitopenia* moderada y de manera muy interesante se han reportado una correlación positiva entre la trombocitopenia y diferentes biomarcadores con la severidad de la enfermedad (19,91–93). También se ha descrito su asociación con el síndrome de Bernard Soulier en los bebés nacidos de madres con infección por CHIKV; este síndrome es una *alteración plaquetaria* en la cual se encuentra ausente la glicoproteína Ib y IX de la superficie plaquetaria, condicionando trombocitopenia severa e incluso hemorragias (94).

Para el ZIKV el periodo de incubación aún no está bien definido, pero se cree que es similar a otros flavivirus, menor a una semana. Los síntomas comunes son exantema macular o papular, fiebre, artritis o artralgias, conjuntivitis no purulenta, mialgias, cefalea, dolor retroocular, edema y vomito. Otros síntomas que se han observado son hematospermia, inflamación de manos y tobillos, sangrado subcutáneo. En algunas regiones geográficas se relaciona con síndrome de Guillain-Barré, meningoencefalitis mielitis aguda y microcefalia. (95).

## Diagnostico

En México se utilizan las definiciones operacionales que ha establecido la DGE.

### Dengue

*Caso sospechoso de Fiebre por Dengue o Dengue no Grave:* Toda persona de cualquier edad que resida o proceda de una región en la que haya transmisión de la enfermedad y que presente cuadro febril inespecífico o compatible con infección viral.

*Caso probable de Fiebre por Dengue o Dengue Grave:* Todo caso sospechoso que presente fiebre y dos o más de las siguientes características: cefalea, artralgias, mialgias, exantema, dolor retro-ocular. En menores de 5 años, el único signo a considerar puede ser la fiebre.

*Caso confirmado de Fiebre por Dengue o Dengue no Grave:* Todo caso probable en el que se confirme infección reciente por virus de dengue mediante técnicas de laboratorio, esté asociado epidemiológicamente a otro caso confirmado o no se disponga de resultado de laboratorio.

*Caso probable de Fiebre Hemorrágica por Dengue o Dengue grave:* Toda persona que además de un cuadro probable de Fiebre por Dengue, desarrolle fiebre y una o más de las siguientes características: datos de fuga de plasma, o datos de fragilidad capilar, o hemorragias, o trombocitopenia menor a 100,000 plaquetas por mm<sup>3</sup> o hemoconcentración con uno a más de los siguientes datos: incremento del hematocrito en un 20% o más en la fase aguda; decremento de hematocrito en al menos 20% después del tratamiento; tendencia del hematocrito en muestras secuenciales (por ejemplo 40, 43, 45 etc.); relación hematocrito/hemoglobina sugestivo 3.2 a 3.4, indicativo 3.5 o mayor; o hipoalbuminemia.

*Caso confirmado de Fiebre Hemorrágica por Dengue o Dengue grave:*

Toda persona con cuadro probable de Fiebre Hemorrágica por Dengue confirmado por laboratorio que además presente lo siguiente:

Datos de fuga de plasma, con al menos los siguientes datos:

- Clínica: edema, piel moteada, ascitis o derrame pleural
- Laboratorio: elevación del 20% en etapa aguda o disminución del 20% en etapa de convalecencia o elevación del hematocrito o hemoglobina en forma secuencial (a partir del tercer día) o hipoalbuminemia.
- Gabinete: ultrasonido (líquido peri-visceral y en cavidad abdominal o torácica) o radiología (derrame pleural o ascitis).
- Datos de fragilidad capilar: prueba de torniquete positiva (petequias, equimosis, hematomas), trombocitopenia menor a 100,000 plaquetas por mm<sup>3</sup>.

*Caso probable de Síndrome de Choque por Dengue (SCHD) o Dengue Grave:* Toda persona con cuadro de F(96)D o FHD y que presente súbitamente datos de insuficiencia circulatoria, alteraciones en el estado de conciencia, tensión arterial disminuida o estado de choque profundo.

*Caso confirmado de Síndrome de Choque por Dengue o Dengue Grave:*

Todo caso probable de SCHD en el que se confirme infección reciente por virus de dengue mediante técnicas de laboratorio(96).

### **Chikungunya**

*Caso sospechoso de Fiebre Chikungunya.* Toda persona que presente cuadro febril agudo más la presencia de poliartralgias severas o artritis de comienzo agudo y que se identifique asociación epidemiológica.

*Asociación Epidemiológica.* Presencia del vector *Aedes aegypti* o *Aedes Albopictus*, antecedente de visita o residencia en áreas de transmisión en las dos semanas previas al inicio del cuadro clínico. Existencia de casos confirmados en la localidad.

*Caso confirmado de Fiebre Chikungunya.* Todo caso sospechoso con resultado positivo a virus Chikungunya mediante alguna de las siguientes pruebas de laboratorio específicas: Detección de ARN viral mediante RT-PCR en tiempo real en muestras de suero tomado en los primeros cinco días de inicio de la fiebre. Detección de anticuerpos IgM en muestra de suero a partir de sexto día de iniciada la fiebre(4).

### **Zika**

*Caso Probable de Zika* al paciente que presenta exantema (generalmente maculopapular y pruriginoso) y dos o más de los siguientes signos o síntomas: fiebre, cefalea, conjuntivitis (no purulenta/hiperemia), artralgias, mialgias, edema periarticular, prurito, dolor retroocular; la sintomatología dura entre 2-7 días. (95,97). En los estudios de laboratorio pueden o no elevarse en el suero los valores de AST y ALT. Es importante identificar asociación epidemiológica:

- Vectores *Aedes aegypti* o *Aedes Albopictus*.
- Visita o residencia en áreas de transmisión en las dos semanas previas al inicio del cuadro clínico, o existencia de casos confirmados en la localidad.
- Antecedente de contacto sexual sin protección en las 2 semanas previas a la aparición de síntomas, con una persona que en las 8 semanas previas al contacto sexual tenga antecedente de residencia o viaje a un área con transmisión local del ZIKV o con presencia de vectores.

*Caso Probable de Zika en una mujer embarazada,* se define como toda mujer embarazada que presente dos o más de los siguientes signos o síntomas: fiebre, exantema, conjuntivitis no purulenta, cefalea, mialgias, artralgias, dolor retroocular, que se identifique asociación epidemiológica.

*Caso confirmado de Zika,* todo caso probable con resultado positivo a ZIKV mediante la detección de RNA viral detectado en RT-PCR en muestras de suero tomadas en los primeros cinco días de iniciado el cuadro clínico.

*Caso descartado de Zika,* todo caso en que no se demuestre evidencia de ZIKV por técnicas de laboratorio avaladas por el InDRE (97).

### **Pruebas de laboratorio**

La viremia coincide con el momento de las presentación de las manifestaciones clínicas.

El diagnóstico por las manifestaciones clínicas no es específico. Debido a esto, el diagnóstico confirmatorio es mediante aislamiento viral, ya sea por RT-PCR o qRT-PCR y se apoya con diagnósticos indirectos. En México se confirma el diagnóstico mediante

algoritmos establecidos por el INDRE (Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica) y autorizados por la OMS (Organización Mundial de la Salud).

En el caso del Dengue los Ac IgM se detectan tras la caída de la fiebre o de la viremia. Sus niveles más altos se encuentran entre el día 14 al 20 y puede durar 30 a 60 días. Se reducen gradualmente y aparecen los Ac IgG. Durante los primeros 5 días puede detectarse Ag NS1 mediante ELISA, sin embargo un resultado negativo no excluye la enfermedad. Las muestras para el aislamiento viral dependen de la fase clínica del paciente, pueden tomarse de suero, plasma o tejidos(98).

En la infección por CHIKV durante los 5 primeros días se realiza qRT-PCR, durante la fase de convalecencia se realiza determinación de Ac IgM mediante estuche comercial y MAC-ELISA(99).

En los casos de pacientes infectados por ZIKV durante los primeros 5 días se realiza qRT-PCR en suero. En los casos de Síndrome de Guillain Barré se puede realizar de saliva hasta el día 17 de inicio de la parálisis. También se aceptan muestras de LCR, tejido postmortem y líquido amniótico. La detección en orina hasta por 15 días después de iniciar la infección sirve de apoyo para la vigilancia epidemiológica. Para detectar coinfecciones, en México el 10% de los casos positivos y el 5% de los casos negativos serán procesados para DENV y CHIKV(97).

### **Diagnostico diferencial**

Es importante destacar, las principales diferencias entre estas enfermedades para un correcto diagnóstico (96,97,100)

**Tabla 1**  
*Diagnóstico Diferencial entre Dengue, Chikungunya y Zika*

CARACTERÍSTICA	DENGUE	CHIKUNGUNYA	ZIKA
Virus	Flavivirus	Alfavirus RNA	Flavivirus
Vector	Aedes aegypti	Aedes aegypti	Aedes aegypti
Incubación	4-7 días (3-14 días)	3-7 días (1-12)	3-12 días
Dolores articulares	Artralgias intensas	Intensos y debilitantes asimétricos más frecuente en manos y pies. Tumefacción asociada a tenosinovitis	Dolor menos intenso, generalmente en extremidades, edema de miembros inferiores
Mialgias	++	+	presentes
Artralgias	+/-	+++	Presentes
Cefalea	++ Retroorbital, frontal	++	presente
Rash	Exantema maculopapular, escarlatiniforme, petequias rojo brillante	++ 2-5 días después de la fiebre, exantema maculopapular en tronco y extremidades, puede afectar, palmas, plantas y rostro.	Exantema maculopapular pruriginoso (sarpullido) intenso –Síntoma distintivo
Discrasias sanguíneas	++	+/-	-
Shock	+	-	-
Vómito	presente	+ /++ 4-59%	Poco frecuente
Nauseas	presente	++ 50-69%	Poco frecuente
Conjuntivitis	Puede presentar	+ /++ 3-56%	No purulenta, con fofobia
Diarrea	Presente	-	Poco frecuente
Dolor o eritema faríngeo	Puede presentarse	-	-
Persistencia de síntomas	Consta de diferentes fases	Más de 3 meses	Cuando hay compromiso neurológico
Complicaciones	Dengue hemorrágico, falla orgánica (pulmón, corazón, hígado, riñón, sistema nervioso central).	No frecuente Dolor por meses o años	Compromiso neurológico, debilidad muscular (Síndrome de Guillain-Barré)
Diagnóstico diferencial	Zika	Dengue	Dengue/Chikungunya
Pruebas serológicas	Aislamiento viral ELISA IgG e IgM Inmunocromatografía rápida RT-PCR	RT-PCR ELISA IgG, IgM	PCR en tiempo real y aislamiento en sangre. Diagnóstico serológico difícil por reacción cruzada con otros Flavivirus.
Tratamiento	Analgesicos (paracetamol), hidratación	Sintomático	Reposo, hidratación, analgésicos para control de dolor
Leucopenia	+++	++	-
Neutropenia	+++	+	-
Linfopenia	++	+++	-
Hematocrito elevado	++	-	-
Trombocitopenia	+++	+> 100,000/mm3	-
VSG y Proteína C reactiva		elevado	-

+++ 70-100% de los pacientes

++ 40-69% de los pacientes

+ 10-39% de los pacientes

Recuperado del Centro Nacional de transfusión sanguínea. SSA 2017

## Complicaciones

Durante el desarrollo de la enfermedad ocasionada por DENV, después de la fase aguda 3-7 días, la fiebre desciende por debajo de 37.5°C, con lo que puede haber aumento de la

permeabilidad vascular e incremento de los niveles del hematocrito. Esto marca el inicio de la fase crítica, debida a extravasación de plasma y puede asociarse a hemorragia. Se acompaña por leucopenia, neutropenia y linfocitosis, seguido de trombocitopenia. Los pacientes que presentan una importante extravasación presentan hipovolemia e hipoperfusión que pueden llegar al choque, falla orgánica y la muerte. Esta fase puede durar de 48-72 horas para después pasar a una fase de recuperación(98).

En la infección por CHIKV las complicaciones en la fase aguda son raras, pero pueden incluir conjuntivitis, uveítis, iridociclitis, retinitis. Se ha documentado la necesidad de hospitalizar pacientes con chikungunya severo, asociado a pacientes de edad avanzada, neonatos, pacientes con problemas cardiovasculares, neurológicos o con presencia de comorbilidades como Diabetes, los cuales son factores de riesgo independientes para severidad(101). Los casos severos de chikungunya son raros afortunadamente, estos pueden presentar encefalitis, miocarditis, hepatitis o falla orgánica múltiple; estos tienen alta tasa de mortalidad. El mayor problema del chikungunya ha sido las complicaciones crónicas, asociadas con artralgias y artritis, con cuadros muy similares a Artritis Reumatoide y hasta el 50% de los paciente afectados pueden presentar incapacidad persistente(40,101).

Los pacientes con infección por ZIKV pueden cursar asintomáticos o tener manifestaciones leves, sin embargo se ha asociado con complicaciones nuerológicas importantes, lo que la ha colocado como un problema de salud emergente. En el 2013 se le encontró cmo causante de Guillain Barre, meningoencefalitis y purpura trombocitopénica autoinmune. Después del 2015 Brasil notifico un incremento en los casos de microcefalia, el cual se incremento en otros países de América, para posteriormente denominarlo síndrome congénito(97). Estas complicaciones pueden ocasionar incpaciad funcional o incluso la muerte.

## **Tratamiento**

No existe un tratamiento específico aprobado por la FDA para limitar la infección viral y prevenir sus complicaciones en ninguna de las tres arbovirosis. Se limita a un tratamiento sintomático

## **Medicion de la activación plaquetaria**

Existen diferentes maneras de medir la activación plaquetaria, el más sencillo consiste en evaluar el volumen plaquetario medio, el cual se incrementa cuando las plaquetas se encuentran activadas. Otro método es la cuantificación de biomarcadores: moléculas producidas por las plaquetas durante la fase de activación y liberadas a circulación (102,103).

La activación plaquetaria involucra un cambio en la forma plaquetaria, agregación plaquetaria y liberación de algunos constituyentes. Puede medirse cuantitativamente al evaluar los cambios en forma y aumento en agregación plaquetaria. También puede medirse niveles urinarios o séricos de productos metabólicos de las plaquetas, como lo son los compuestos de los granulos alfa, tromboglobulina beta, factor plaquetario 4, Tromboxano B2(103).

La activación plaquetaria se encuentra involucrada en la patogénesis de diferentes enfermedades, aterosclerosis y enfermedad cerebrovascular. Esta se encuentra influenciada por diabetes mellitus, tabaquismo, hipertensión y anticonceptivos orales(103).

Entre las biomoléculas que pueden medirse, encontramos:

- La sP-selectina es un receptor, rico en cisteína y altamente glicosilada, se encuentra en la membrana de los gránulos alfa de las plaquetas y en la membrana de los cuerpos Weible-Palade de las células del endotelio vascular. Sólo las plaquetas activadas expresan P-selectina en su membrana plasmática, actuando como receptores para neutrófilos y monocitos, mediante un correceptor denominado PSGL-1 que se encuentra en leucocitos o GP-1B en células endoteliales. Al ejercer su acción se libera para ser soluble sP-Selectina el cual continúa ejerciendo sus efectos, este receptor favorece el rodamiento de leucocitos y plaquetas para su posterior migración al sitio de la lesión tisular. Favorece la liberación de quimiocinas plaquetarias y de adhesión plaquetaria (104)(103). Hasta el momento los niveles de sP-selectina no correlacionan con la severidad del padecimiento. La sP-selectina no se ve influenciada por anticoagulantes o trastornos renales, por lo que resulta un marcador útil. Puede medirse con citometría de flujo utilizando fluorescencia activada o por ELISA (103).
- Beta-tromboglobulina (BT). Se encuentra contenida en los gránulos alfa y es específica de las plaquetas(103). Es específica para evaluar la activación plaquetaria.(105)(106) Los valores normales van de 10-65mg/ml no correlaciona con la cantidad de plaquetas activadas(107). Tiene una vida media en vivo de 84-414 minutos, es de eliminación renal, por lo que en pacientes con falla renal, puede observarse incrementada. Son específicas para plaquetas; son detectadas tanto en megacariocitos como en plaquetas con el uso de métodos de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa. Se sugieren como medio para detectar aumento en la actividad plaquetaria in vivo(103). PAF4 y Tromboglobulina beta se liberan en cantidades similares en las plaquetas; pero en plasma se encuentra mayor cantidad de tromboglobulina beta probablemente debido a que PAF4 se une rápidamente a las células endoteliales(103). BT tiene efectos quimiotácticos principalmente para fibroblastos y en segundo lugar para neutrófilos(108).
- PF-4. Es también conocida como CXCL4. Es liberada por los granulos alfa de las plaquetas principalmente, por lo que se relaciona con activación plaquetaria. Es antagonista de la heparina. Al unirse a sitios específicos de la superficie plaquetaria, modula la agregación y secreción plaquetaria, inducida por bajos niveles de agonistas plaquetarios, induce la adhesión firme del neutrófilo al endotelio a través de L-Selectina, inhibe la proliferación de células endoteliales(103) por FS-EC y bloquea VEGF. Promueve la degranulación de neutrofilos. Favorece la función del leucocito a través de LFA-1. Recluta e incrementa la vida del monocito y favorece su diferenciación a macrófago, quienes dicen hacia un perfil 4b. Induce la fagocitosis y la generación de ROS. Disminuye la megacariocitopoyesis. Se ha

observado que en VIH inhibe la infección al interactuar con la glucoroteína 120(109). La vida media in vitro es de 7-11 horas. Sin embargo en vivo, es de 20 minutos ya que rápidamente se une a las células endoteliales. Los niveles pueden verse incrementados en pacientes que reciben tratamiento con heparina. Es el mejor marcador en pacientes con falla renal, ya que no se ve afectada su eliminación. PAF4 tiene una vida media corta en el plasma, ya que se une rápidamente a las células endoteliales, los valores normales van de 10-65mg/ml y se encuentra aumentados en pacientes en tratamiento con heparina.

- sCD40L o sCD154. La proteína CD40L transmembranal es expresada por diversas células: Linfocitos T, Natural Killer, Células dendríticas, Monocitos, Macrófagos, Células endoteliales, células del músculo liso, células epiteliales y plaquetas. La porción libre sCD40L es liberada por plaquetas activadas principalmente, aunque también por linfocitos T. Este receptor soluble continúa ejerciendo su acción. Tiene diversos efectos endócrinos, paracrinos y autocrinos al interactuar con células que presentan CD40. Entre sus acciones están la quimiotaxis y activación del leucocito, favorece la expresión de diversos mediadores de la inflamación, también se encuentra involucrado en la liberación de mediadores que favorecen la reparación tisular, tiene efectos en la inmunidad innata: estimula la agregación plaquetaria, fagocitos y producción de proteínas del complemento e interferon  $\alpha$ , favorece la expresión de receptores TLR, induce la maduración de células dendríticas; regular varios pasos de la inmunidad adaptativa entre ellos: favorece la expresión de MHC-I, actúa como coestimulador de los linfocitos T, coopera en la activación de linfocitos B mediador por TLR, favorece la producción de Ac por los linfocitos B y cambio de isotipo, contribuye en la estimulación del centro germinal, incrementa la respuesta de los linfocitos T CD8+(110).
- FvW Es una molécula de alto peso molecular, sintetizado en células endoteliales, reguladora de procesos hemostáticos e involucrada recientemente como regulador negativo de angiogénesis, proliferación celular de células del músculo liso, tiene un papel proinflamatorio en algunos padecimientos e induce apoptosis de células neoplásicas. Ha sido utilizado como marcador de la función endotelial e integridad(111).

## JUSTIFICACIÓN

Las infecciones por virus emergentes DENV, CHIKV Y ZIKAV son un importante problema de salud pública en México. Estas infecciones comparten una respuesta inflamatoria a corto plazo que produce síntomas clínicos que pueden ser difíciles de diferenciar en la etapa aguda. Sin embargo, en el mediano y largo plazo, así como en la reinfección, la respuesta inflamatoria de cada una de ellas desencadena secuelas y complicaciones muy diversas, tales como dengue hemorrágico por DENV, artritis crónica por CHIKV y complicaciones neurológicas o síndromes autoinmunes por ZIKAV. Los mecanismos de respuesta inmune aún no están dilucidados en su totalidad, por todo lo anterior, es de gran importancia el llevar a cabo estudios que ayuden a describir en forma más precisa la respuesta inflamatoria en cada una de estas enfermedades. No existen suficientes estudios acerca del papel que desempeñan diversas moléculas inflamatorias en estas infecciones; en los últimos años se han identificado a las plaquetas como células que participan en la respuesta inmunológica a diversos agentes infecciosos, capaces de liberar también diferentes moléculas y mediadores inflamatorios y de activación celular. La trombocitopenia es un rasgo clínico frecuente en infecciones virales por arbovirus e incluso existen estudios en los que se ha relacionado con la severidad de la enfermedad. La trombocitopenia parece ser causada por consumo de las plaquetas posterior a la activación de las mismas. El conocimiento generado mediante el presente proyecto permitirá obtener información que permita identificar de manera específica moléculas que pudieran constituir blancos terapéuticos, así como determinar la forma en que las plaquetas están contribuyendo a la respuesta inmunológica que generan las infecciones por arbovirus. Los resultados en la cuantificación de biomarcadores podrían además ser de utilidad para diferenciar estas infecciones en la fase aguda.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las infecciones por DENV, CHIKV y ZIKAV presentan diferencias importantes en cuanto a la respuesta inmune que generan, a las complicaciones asociadas a ellas así como en su evolución hacia la cronicidad. La respuesta inmunológica que involucra a las plaquetas por estas infecciones no ha sido suficientemente estudiada, existe evidencia científica de que las plaquetas están involucradas en la respuesta inmune hacia DENV y en el último año se descubrió que las plaquetas son incluso capaces de replicar este virus, sin embargo, no existen estudios que involucren plaquetas en las infecciones por CHIKV o ZIKAV. El tratamiento actual de las infecciones por arbovirus es únicamente paliativo y sintomático, por ello, es necesario llevar a cabo estudios que amplíen el conocimiento de la respuesta inmunológica mediada por estas infecciones y de manera preferente involucren células que tradicionalmente no han sido tomadas en cuenta en este campo, tales como las plaquetas, las cuales parecen desempeñar un papel muy importante en la respuesta del huésped ante infecciones virales

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Existe activación plaquetaria en la respuesta inmune a infecciones por arbovirus: DENV, CHIKV Y ZIKAV en la fase aguda?

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Diferenciar la activación plaquetaria con liberación de biomarcadores en la fase aguda ante los diferentes arbovirus: DENV, CHIKV Y ZIKV.

### **OBJETIVOS ESPECIFICOS:**

1. Cuantificar y detectar diferencias de los biomarcadores inflamatorios y plaquetarios: TNF- $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-6, IL-10, CD40L, P-selectina, FP-4,  $\beta$ -tromboglobulina y FvW entre cada una de estas enfermedades y los controles.
2. Determinar la correlación entre los biomarcadores inflamatorios y los de activación plaquetaria.

## HIPÓTESIS

### **Hipótesis de investigación**

Existen diferencias en la liberación de biomarcadores de activación plaquetaria durante la fase aguda ante los diferentes arbovirus: DENV, CHIKV y ZIKV

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio de casos y controles, observacional, prospectivo y transversal, se realizó de Diciembre del 2016 a Diciembre del 2017 en La ciudad de Lázaro Cárdenas en el HGZ/UMF 12 de Lázaro Cárdenas; se detectaron pacientes dentro de los 5 primeros días de síntomas, con diagnóstico probable de ZIKAV, DENV, CHIKV sin contemplaron criterios de exclusión. Se les realizó un estudio epidemiológico para recabar datos clínicos y se realizó consentimiento informado. Se tomaron muestras en tubo seco, tubo con citrato y un tubo con EDTA, se realizaron BHC a todos los pacientes; las muestras se centrifugaron a 3,500xg a 4°C para obtener suero y plasma respectivamente, se almacenará en crioviales de polipropileno y se conservarán a -80°C dentro de la primera hora de su toma en la Jurisdicción de Lázaro Cárdenas, se transportaron en embalaje triple al Laboratorio de Hemostasia y Biología Vascular de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo de acuerdo a la Guía sobre la reglamentación relativa al Transporte de Sustancias Infecciosas 2009-2010 de la OMS, donde continuaron su conservación a -80°C. Posteriormente se envió suero al Instituto de Investigaciones Médicas Biológicas, de la Universidad de Veracruz, donde se les realizó RT-PCR para detectar el RNA viral de las tres infecciones, se seleccionaron los casos positivos. Posteriormente se eligieron donadores de sangre del HGR1 de Morelia, Michoacán que cumplen con los requisitos de donación y se parearon con los pacientes por género y grupo de edad. Se realizaron ELISAS para biomarcadores inflamatorios y plaquetarios TNF- $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-6, IL-10, CD40L, P-selectina, FP-4,  $\beta$ -tromboglobulina y FvW en el Laboratorio de Hemostasia Vascular de la Facultad de Medicina, UMSNH en los pacientes y en los controles.

### Análisis Estadístico

Se utilizó el paquete estadístico SPSS v23.0.0.2, GraphPrism 6.0 y Microsoft Excel 15.32. Inicialmente realizamos una prueba de Kolmogorov-Smirnov encontrando una distribución no paramétrica. Se obtuvieron medianas y rangos. Para variables categóricas se utilizarán frecuencias y porcentaje.

- Se realizó Kruskal-Wallis y Prueba de Dunn para encontrar las diferencias entre las tres infecciones y los controles. Se reportó el nivel alfa menor de 0.05 como una cifra estadísticamente significativa asociada.
- Para analizar la correlación entre los biomarcadores inflamatorios y de activación plaquetaria se realizará una correlación de spearman y se reporta el valor rs con una p significativa <0.05.

### Aspectos éticos

Se reservó el anonimato para todos los pacientes participantes en cuanto a su nombre y condiciones particulares, los datos personales de todos los individuos se manejaron con confidencialidad de acuerdo a las exigencias internacionales como el Código de Nuremberg y normativas Nacionales y éticas que se establecen en investigación para la salud en su Título quinto, Capítulo único del artículo 100 de la Ley General de Salud. Este estudio se realizó de acuerdo con la guía tripartita con los lineamientos para las Buenas Prácticas Clínicas según lo definió la Conferencia Internacional de Armonización y con base en los principios éticos subyacentes en las disposiciones contenidas en materia de Investigación para la Salud. Reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación para la Salud y de acuerdo con los principios Éticos establecidos en la Declaración de Helsinki (según se revisó por la 64a Asamblea General de la Asociación Médica Mundial en la Fortaleza, Brasil, octubre 2013).

Los investigadores responsables proporcionaron a las autoridades correspondientes del IMSS (CNIC) y de la UMSNH los reportes de resultados, avances, actualizaciones y otra información, de acuerdo a los requerimientos regulatorios o procedimientos de la misma.

El protocolo fue autorizado por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina y al Comité Nacional de Investigación en Salud (CNIC).

Por lo anterior se clasificó como un estudio de riesgo mínimo.

## RESULTADOS

Para caracterizar la respuesta inmune temprana y evaluar la activación plaquetaria durante las infecciones por enfermedades transmitidas por vector (ETV): ZIKV, DENV y CHIKV, se evaluó por ELISA y comparamos los niveles de biomarcadores inflamatorios en suero: IL-6, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-10 y biomarcadores de activación plaquetaria en plasma: PF-4(CXCL-4), FvW, sP-sel, sCD40L (sCD154) y BT.

Este estudio se realizó en Lázaro Cárdenas, Michoacán, se incluyeron aquellos pacientes que se encontraban en los primeros 7 días del inicio de los síntomas. Se obtuvieron muestras de 92 pacientes, a los cuales se les realizó RT-PCR para las 3 infecciones.

De los 92 casos probables, tuvimos 45(48.0%) pacientes de género masculino y 47(51.1%) del género femenino y 8(17%) embarazadas.

La certeza del diagnóstico clínico en los casos positivos por qRT-PCR fue del 45%. Confirmamos 20 casos (21.73%), de los cuales 10(50%) fueron de ZIKV, 5(25%) de CHIKV, 3(15%) de DENV y 2(10%) de CHIKV/ZIKV, como se observa en la Grafica 5. Incluimos 20 controles aptos para donación de sangre, residentes de Michoacán.

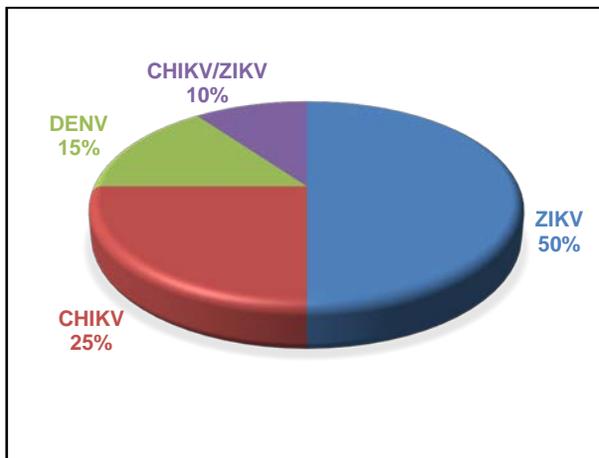


Figura 5. Distribución de pacientes por tipo de infección. Del total de casos probables, se confirmó el 21.73%. En esta figura se muestra la distribución de los casos confirmados por qRT-PCR.

De los casos positivos, encontramos 4 pacientes del género masculino y 16 del género femenino, de las cuales 6(30%) cursaban con embarazo, a las cuales no se les detectó anomalías fetales. Presentando un predominio del género femenino en una relación 1:4, como se observa en la figura 6, en donde también describimos la distribución de las infecciones en el grupo de embarazadas.

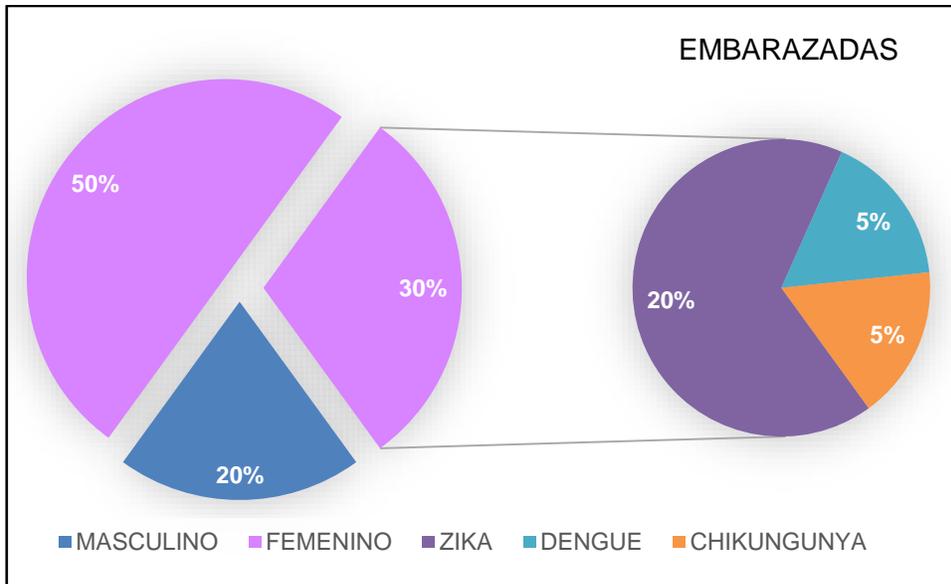


Figura 6. Distribución por género y gravidez. Se observa la distribución por género de los pacientes confirmados con ETV y en el subgráfico el diagnóstico en las mujeres embarazadas

Al realizar este estudio se observaron dos picos de aumento en la incidencia de casos, a la SE (semana epidemiológica) 28 y un aumento progresivo con un cenit en la semana 41 como se muestra en la Figura 7.

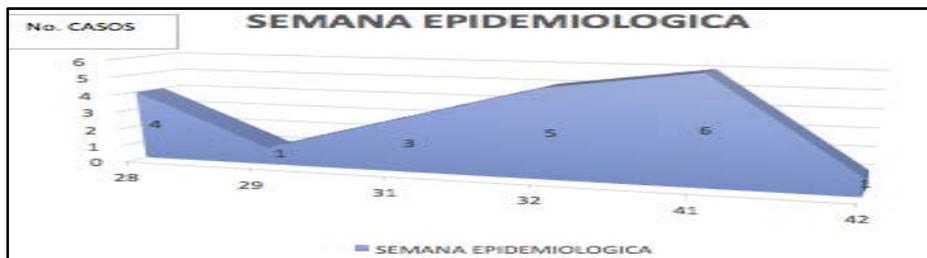


Figura 7. Distribución de casos positivos por Semana epidemiológica

En la figura 8 observamos como ZIKV al presentar la mayoría de los casos, se distribuye en todos los grupos de edad. DENV se presentó en adolescentes, jóvenes y adultos de mediana edad. El CHIKV se presentó principalmente en jóvenes y adultos de mediana edad.

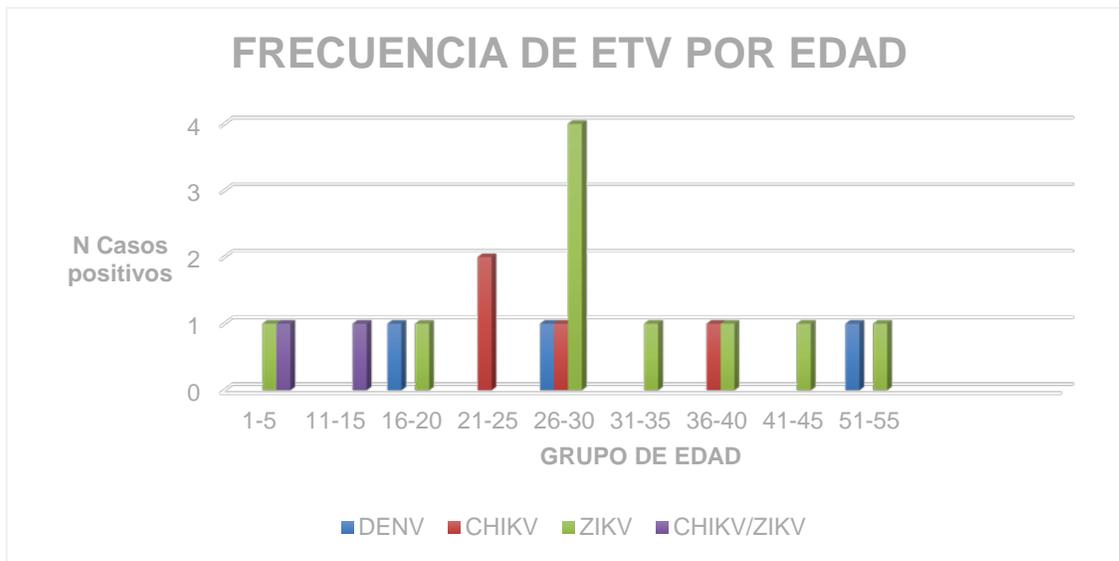


Figura 8. Distribución de las ETV por edad. El rango de edad entre los casos positivos fue de los 2 a los 61 años, siendo el rango de edad 26-30 el más frecuente

Los datos demográficos y clínicos que encontramos en nuestro estudio, los presentamos en la *tabla 2*. Las tres enfermedades comparten diferentes manifestaciones clínicas, en contraste a ZIKV y CHIKV los pacientes con infección por DENV presentan una sintomatología más modesta. Entre los datos clínicos más frecuentes en los pacientes con ZIKV encontramos fiebre, artralgias y exantema. En los pacientes con DENV se caracterizan por fiebre, cefalea, mialgias y artralgias. Finalmente, los pacientes con CHIKV presentan con mayor frecuencia fiebre, cefalea, mialgias, artralgias, dolor de espalda, dolor retroocular y náuseas.

**Tabla 2**  
*Características demográficas y clínicas en pacientes positivos*

Característica	Zika n=10 (%)	Dengue n=3 (%)	Chikungunya n=7 (%)	Chik/zik n=2 (%)
Mediana edad	27	29	26	10
Rango edad	2-54	20-53	21-60	5-15
Genero (M/F)	1/9	0/3	1/4	2/0
Embarazo	4 (40)	1 (33.33)	1	
Las guacamayas	5 (50)	1 (33.33)	1	2 (100)
Lázaro cárdenas	5 (50)	2 (66.67)	3	
Fiebre	7 (70)	3 (100)	6 (85.71)	2 (100)
Cefalea	6 (60)	3 (100)	6 (85.71)	1 (50)
Mialgias	4 (40)	2 (66.67)	5 (71.43)	1 (50)
Artralgias	7 (70)	2 (66.67)	5 (71.43)	
Artritis	2 (20)	1 (33.33)		
Dolor de espalda	3 (30)	1 (33.33)	6 (85.71)	2 (100)
Dolor retroocular	5 (50)		6 (85.71)	2 (100)
Exantema	7 (70)		3 (42.86)	1 (50)
Prurito	2 (20)		2 (28.57)	
Vómito	2 (20)	1 (33.33)	3 (42.86)	1 (50)
Náuseas	4 (40)	1 (33.33)	6 (85.71)	2 (100)
Diaforesis			2 (28.57)	
Escalofríos	3 (30)		4 (57.14)	1 (50)
Fotofobia	2 (20)		4 (57.14)	1 (50)
Dolor abdominal	3 (30)		4 (57.14)	1 (50)
Diarrea	1 (10)			
Conjuntivitis	4 (40)	1 (33.33)	1 (14.29)	
Congestión nasal	3 (30)		4 (57.14)	
Tos	2 (20)	1 (33.33)	4 (57.14)	1 (50)
Faringitis	4 (40)		3 (42.86)	
Alteración del gusto	3 (30)		2 (28.57)	
Rigidez de nuca	1 (10)			
Debilidad muscular	1 (10)		2 (28.57)	
Otitis	1 (10)			
Petequias			1 (20)	1 (50)

### CITOMETRIA HEMATICA

Se consideró un grupo control del banco de sangre del HGR1 de Morelia, se les realizaron biomarcadores y citometría hemática a los 5 grupos, obtuvimos los datos descritos en la *Tabla 3*, estos resultados se analizaron mediante una prueba de Kruskal-Wallis y posteriormente se aplicó la prueba de Dunn para encontrar diferencias entre los grupos. Encontramos valores bajos de Hb y Hto en el grupo de ZIKV ( $p < 0.005$ ) y en el grupo CHIKV ( $p < 0.05$ ) en comparación al grupo control. Se observó aumento del VPM en el grupo de CHIKV en comparación al grupo control ( $p < 0.005$ ). Los leucocitos se mantuvieron elevados en el grupo CHIKV ( $p = 0.05$ ) y de ZIKV ( $p = 0.05$ ) en comparación al grupo ZIKV/CHIKV. Los linfocitos disminuyeron en el grupo de ZIKV en comparación al grupo control ( $p < 0.05$ ) como se muestra en la *Figura 9*.

**Tabla 3**  
Estadística descriptiva de la citometría hemática

BHC	DENV		CHIKV		ZIKV		CHIKV/ZIKV		CONTROL	
	Mediana	Rango	Mediana	Rango	Mediana	Rango	Mediana	Rango	Mediana	Rango
Hb g/dl	10.6	10.1-11.1	12.9	7-13.8	12.7	14.1-16.5	15.3	14.1-16.5	15.1	10-17.4
Hto%	33.8	32.2-35.4	40.1	21.4-42.6	39.3	19.1-42.6	47.25	42.8-51.7	44.4	35.3-49.8
Plaquetas (x1000)/uL	248.500	231-266	225	111-308	271	219-457	193	121-265	224	161-388
Leucocitos (x1000)/uL	8.3	7.5-9.1	8.7	6-15.1	8.6	3.8-22.4	4.95-	4.4-5.5	6.9	5.4-9.5
VPM	10.9	9.6-12.2	12.1	11-12.5	11.2	9.3-11.6	12.4	12.2-12.6	8.6	7.7-13.2
Linfocitos (x1000)/uL	1.91	1.89-1.93	1.66	1.44-2.29	1.39	.66-3	1.4	1.1-1.7	2.02	1.3-3.27
Monocitos (x1000)/uL	480	470-490	960	350-21,700	495	250-880	1400	1100-1700	600	1300-3270
Basófilos (x1000)/uL	.35	.1-6	.3	.2-6	.3	.1-5			.6	.3-8
Neutrófilos (x1000)/uL	5.785	4.9-6.67	6.07	3.3-10.6	5.52	2.07-20.06	19.3	12.1-26.5	4.22	2.71-7.1

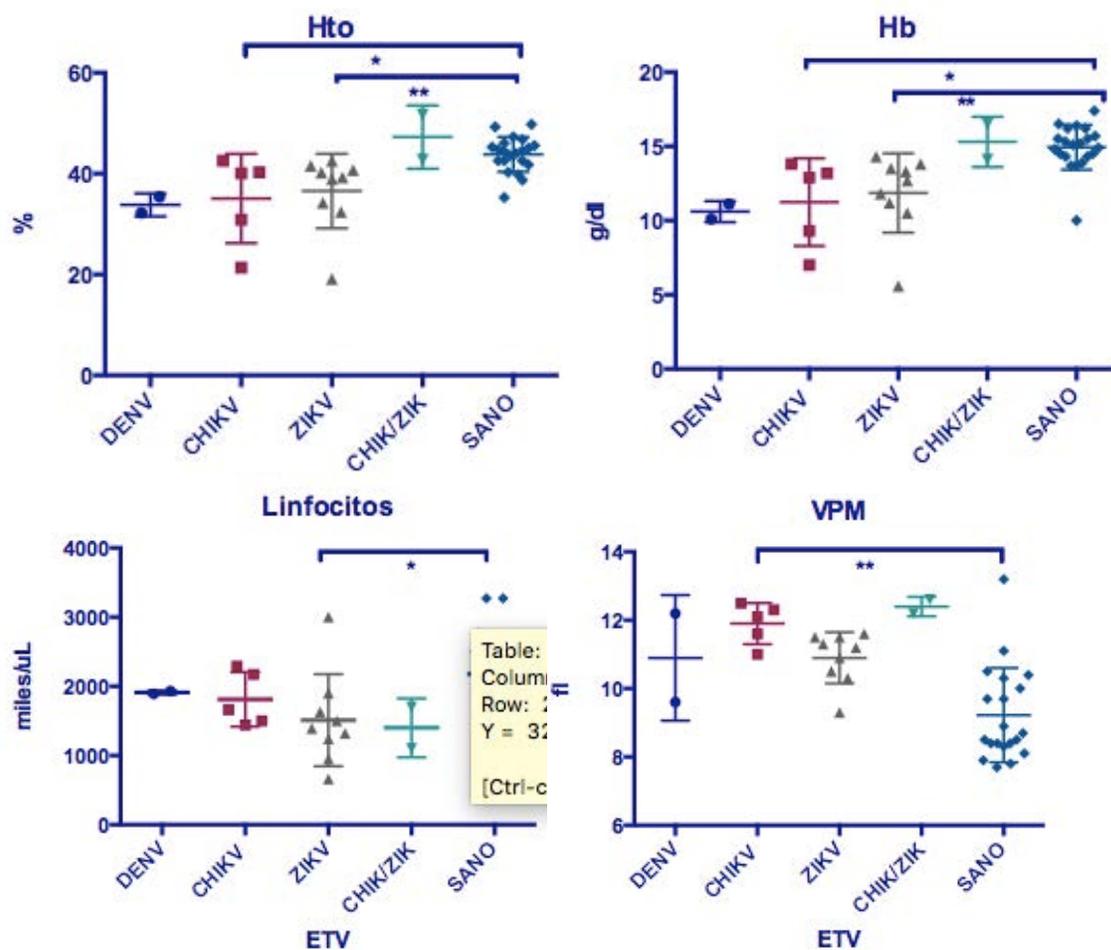


Figura 9. Diferencias entre los valores de citometría hemática. Se compararon las medias entre los grupos de DENV, CHIKV, ZIKV, CHIK/ZIK y se comparó con el grupo control, solo se muestran las que resultaron significativas. Los puntos en la gráfica representan individuos. Se realizó una prueba de Kruskal-Wallis, el valor de p se representado por: \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.005$ . También se pueden observar los valores de las medianas, mínimos y máximos.

### ELEVACION DE BIOMARCADORES EN ETV AGUDA

A los casos positivos para alguna ETV y al grupo control se les realizó ELISA para determinar niveles de biomarcadores inflamatorios y plaquetarios, describimos los datos generales en la tabla 3, figura 5 y 6. Obtuvimos una distribución no paramétrica, por lo que se realizó Kruskal-Wallis y Prueba de Dunn. Nuestro estudio reveló un incremento en las concentraciones de FvW en el grupo de ZIKV comparado con el grupo control ( $p < 0.008$ ) y en el grupo de DENV contra el grupo control ( $p < 0.046$ ) figura 6. Seguido por IL-6 en pacientes infectados por CHIKV en comparación con el grupo control ( $p < 0.03$ ) figura 5. PF-4 se encontró más alto en el grupo de ZIKV en comparación al grupo de CHIKV.

En el resto de los biomarcadores no se logra demostrar diferencia con este método.

**Tabla 4**  
*Estadística descriptiva de biomarcadores inflamatorios y plaquetarios*

CITOQUINAS	Denv		CHIKV		ZIKV		CHIKV/ZIKV		CONTROL	
	Mediana	Rango	Mediana	Rango	Mediana	Rango	Mediana	Rango	Mediana	Rango
IL-6 pg/ml	3	1.1-12.7	14.1	4-61.1	4	0-101	2.35	0-4.7	.5	0-12.7
TNF $\alpha$ pg/ml	8	7.8-93	11	6-21.2	8.65	3.6-40.4	10.1	7.4-12.8	8.8	4.2-19.4
IFN $\gamma$ pg/ml	49.5	44-448.62	52.5	43-61.5	37.27	15.92-118.5	46.25	39-53.5	34	4.38-85.92
IL-10 pg/ml	5.35	1.71-26.62	2.77	.95-23.83	9.29	1.86-45.97	3.3	2.02-4.59	9.41	.95-25.46
BT pg/ml	5.18	5.13-27.93	5.16	5.13-8.01	5.49	5.25-114.12	5.69	5.18-6.20	5.31	5.12-5.88
PF-4 pg/ml	18.02	14.08-23.7	14.02	0-14.88	20.12	11.34-24.93	16.3	15.87-16.76	20.15	11.18-25.27
s-CD40L ng/ml	1	.5-4.5	2.5	1.5-6.5	3.5	0.5-8	7.75	5.5-10	5.5	1-12
sP-selectina ng/ml	241.6	168.3-199.7	337.4	204-1191.2	213.75	74.9-445	338.35	227.2-449.5	265	116.3-634.6
FvW ng/ml	181	88-368	147	0-198	160	8-403	173	166-180	54	0-323

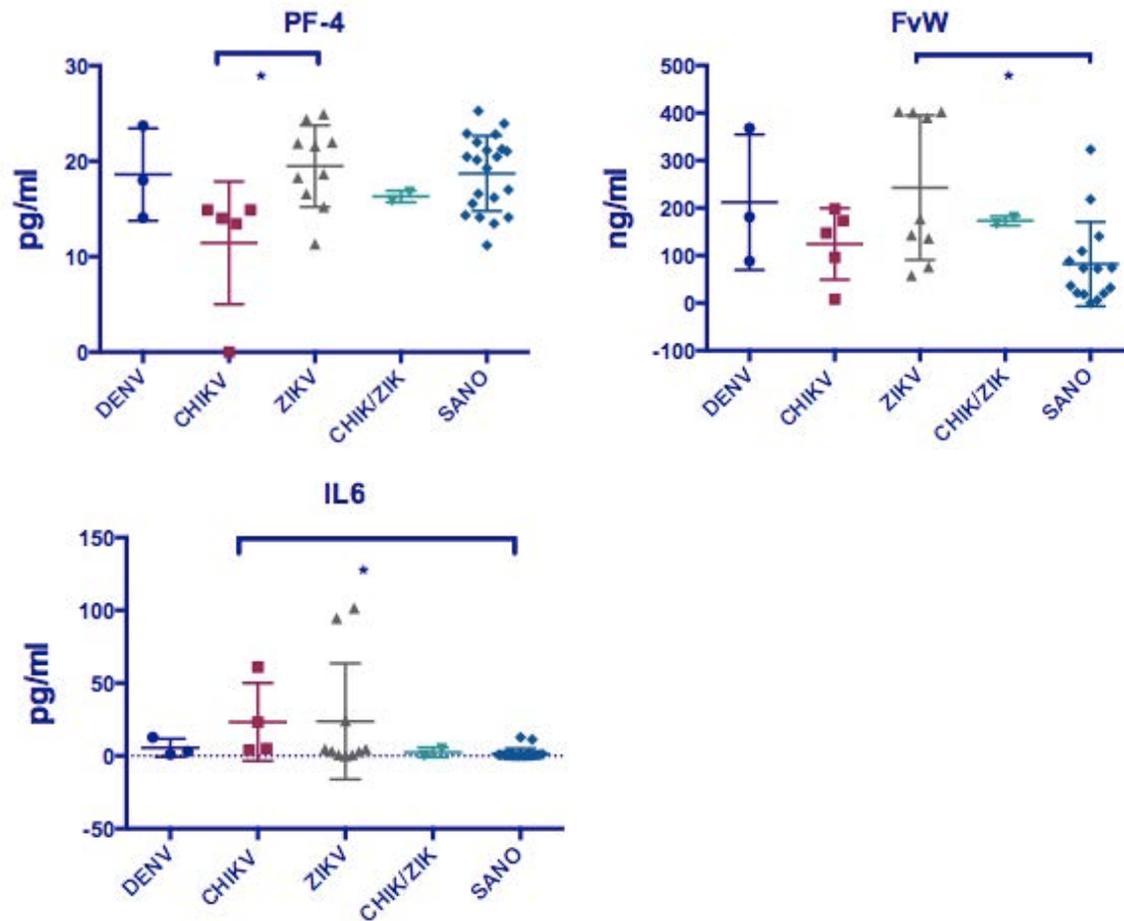


Figura 9. Diferencias entre los biomarcadores inflamatorios y plaquetarios . Se compararon las medias entre los grupos de DENV, CHIKV, ZIKV, CHIK/ZIK y se comparó con el grupo control, solo se muestran las que resultaron significativas. Los puntos en la gráfica representan individuos. Se realizó una prueba de Kruskal-Wallis, el valor de p se representado por: \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.005$ . También se pueden observar los valores de las medianas, mínimos y máximos.

### CORRELACIONES ENTRE BIOMARCADORES Y CITOMETRIA HEMATICA

Se realizó correlación de spearman para investigar si los niveles séricos o plasmáticos de cada uno de los biomarcadores, presentaban correlación entre sí y entre los valores de la citometría hemática, las que resultaron seignificativas  $p < 0.05$  se describen en la *tabla 5*.

Encontramos una asociación entre el incremento de la concentración de IL6 con un aumento en BT y sP-selectina así como una disminución en la cantidad de linfocitos. El aumento en la concentración de BT se asoció con un incremento en la concentración de IFN $\gamma$ , y leucocitos. A su vez el incremento de IFN $\gamma$  se asoció con un aumento de TNF $\alpha$ , FvW y neutrófilos. El incremento de TNF $\alpha$  se correlaciono con elevación en la concentración de IL-10. Y las concentraciones bajas de IL-10 se asociaron con aumento en la cantidad de basófilos e incremento del hematocrito. Por último, el incremento de VPM se relacionó con incremento de IFN $\gamma$ , FvW y con la disminución de IL10 y PF4 como se muestra en la *Figura 11*.

Tabla 5		
Correlaciones		
Variables	rs	p
Basófilos-IL10	-.492	.017
Linfocitos-IL6	-.417	.009
IL10-TNF $\alpha$	.5	.001
IFN-TNF $\alpha$	.796	.000
sCD40L-Plaquetas	.306	.05
sCD40L-TNF $\alpha$	-.314	.048
VPM-IL10	-.561	.000
VPM-IFN $\gamma$	.321	.050
VPM-PF4	-.342	.035
VPM-FvW	.335	.046
BT-Leucocitos	.575	.000
IFN $\gamma$ -BT	.338	.031
IFN $\gamma$ -FvW	.359	.027
BT-IL6	.317	.046
sPsel-IL6	.322	.043

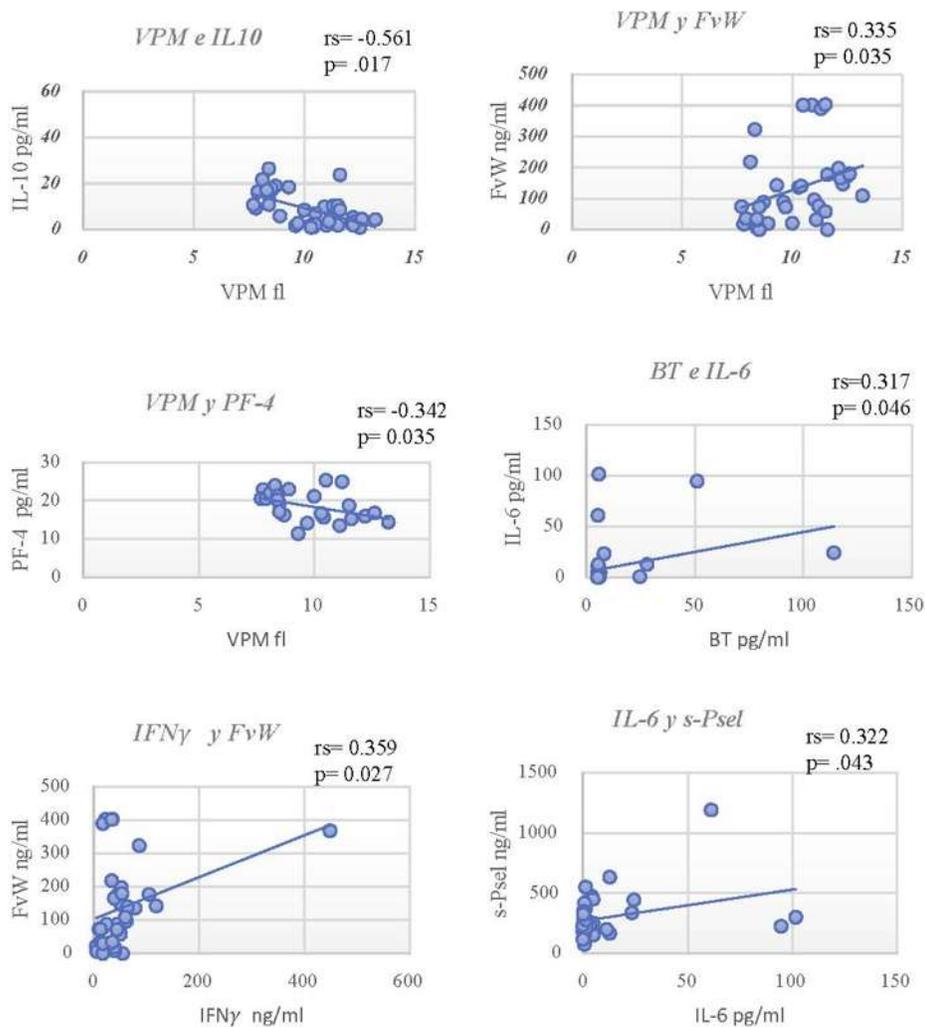


Figura 11. Correlaciones entre biomarcadores y citometría hemática. Se realizó una correlación de spearman entre la citometría hemática y los biomarcadores, asignando un valor  $p < 0.05$ .



## DISCUSIÓN

Este estudio permitió analizar las características epidemiológicas y clínicas en pacientes con infección por zika, dengue, chikungunya así como diferenciar y correlacionar los niveles séricos de citoquinas IL-6, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-10 con biomarcadores de activación plaquetaria PF4, sCD40L, FvW, sP-selectina, BT, y citometría hemática entre estos grupos y controles.

La población de casos probables fue una población homogénea en género, sin embargo, al realizar el diagnóstico confirmatorio presentó un predominio de mujeres 4:1. También fue notable la confirmación de ETV en el 75% de las mujeres embarazadas con diagnóstico probables, correspondiendo el 66.6% a infección por ZIKV.

Se encontró incremento en la incidencia de infecciones en la SE 28 la cual disminuye progresivamente para luego volver a aumentar paulatinamente desde la semana 30 y llegando a su cenit en la semana 41, lo que corresponde a los meses de julio, agosto, septiembre y octubre; lo cual coincide con la temporada de lluvias en un clima templado, favoreciendo el nicho para la reproducción del vector.

Los pacientes con ETV presentan un cuadro clínico muy similar entre ellos; la OPS (Organización Panamericana de la salud)(98) y la DGE(96), establecen criterios clínicos para establecer el diagnóstico de estas 3 enfermedades, sin embargo en nuestro estudio demostramos que estas enfermedades comparten diversas manifestaciones clínicas y el diagnóstico mediante los criterios de estas organizaciones no son aplicables en un ambiente donde coexisten las tres infecciones, consideramos que deben realizarse estudios para mejorar los modelos de diagnósticos, debido a que el diagnóstico por RT-PCR no siempre está disponible para todos los pacientes debido a los recursos económicos, humanos y materiales que esto requiere. Braga demuestra que al aplicar los criterios de diagnóstico de organizaciones internacionales para el diagnóstico de Zika en un ambiente con presencia de zika, dengue y chikungunya no se logra buena especificidad, también realizar un modelo clínico para el diagnóstico de Zika con una sensibilidad del 86.6% y especificidad de 78.3%  $r^2 = 0.417$ , sin embargo se requieren más estudios para validarla en nuestro país (112).

A continuación, describiremos nuestros hallazgos en el comportamiento de citoquinas y quimiocinas también describiremos el comportamiento de biomarcadores de activación plaquetaria y endotelial, que nos confirman su activación y sugieren una participación en la fisiopatología.

En nuestra población de estudio encontramos una respuesta inflamatoria e inmunológica modesta, suficiente para eliminar a los virus del zika, dengue y chikungunya ya que los pacientes no presentaron complicaciones. Nosotros estudiamos 9 biomarcadores de los cuales solo 3 presentaron diferencias significativas. Las moléculas que se incrementaron fueron FvW en los pacientes con ZIKV y DENV en comparación al control, IL-6 en los pacientes con CHIKV en comparación al control y PF-4 en el grupo de ZIKV en comparación al grupo de CHIKV.

## **DENGUE**

Las manifestaciones clínicas en los pacientes con DENV de nuestro estudio, están incluidas en las definiciones de la OPS (Organización Panamericana de la salud)(98) y la DGE(96). La diferencia que encontramos fue que en nuestros casos los pacientes no presentaron artralgias severas, exantema ni prurito.

En los resultados de la citometría hemática encontramos valores bajos de Hb y Hto a pesar de que no presentaron complicaciones nuestros pacientes. No demostramos diferencia en los valores de plaquetas, al igual que Rathakrishnan, quien asoció la disminución de plaquetas en los pacientes con signos de alarma y dengue severo, así como disminución del Hto en pacientes con dengue severo (14). Saroch encontró asociación entre la disminución del hematocrito y el aumento de la mortalidad (113). Singla detecto una disminución significativa de plaquetas en los pacientes con dengue severo (7).

En nuestro estudio no demostramos elevación significativa de los biomarcadores entre los grupos de ETV ni en el grupo control, Rathakrishnan y Singla tampoco encontraron diferencias significativas en las citoquinas inflamatorias de pacientes con Dengue sin complicaciones (7,14), pero Singla si detectó aumento en la concentración de sCD40L además detectó elevación significativa de IL-6, IL-10 e IL-8 en pacientes con Dengue severo (7).

## **CHIKUNGUNYA**

Los pacientes con chikungunya presentaron un cuadro sintomático muy amplio e inespecífico, incluye síntomas generales, articulares y de vías respiratorias altas, estas últimas no se incluyen en las definiciones operacionales de la PAHO o CDC. Y el cuadro clínico propuesto por la DGE es muy modesto (114)(99).

Nosotros observamos una disminución significativa en los valores de Hb y Hto en los pacientes con chikungunya en comparación con el grupo control. Así como aumento del VPM, esto puede ser debido a la activación plaquetaria, como se ha demostrado en otros estudios (115). No encontramos otros estudios que analicen el comportamiento de Chikungunya con valores de la citometria hemática.

Los pacientes con CHIKV presentaron mayores concentraciones de PF-4 en comparación al grupo de ZIKV, lo que nos traduce activación plaquetaria en ambos grupos, sin establecer el grado de activación.

También detectamos aumento en las concentraciones séricas de IL-6 en pacientes infectados por CHIKV en comparación con el grupo de control ( $p < 0.03$ ), lo que puede indicar que los pacientes con chikungunya presentan una mayor respuesta inflamatoria mediada por Linfocitos T. Diversos estudios han demostrado elevación de IL-6 en la fase aguda (18,19,81,91,116) e incluso se ha asociado con severidad (18,19); adicionalmente Kelvin(91) demostró elevación de IL6 en la fase aguda que disminuye a los 6 y 12 meses.

Kelvin y Chirathaworn no encontraron elevación significativa en  $TNF\alpha$ ,  $IFN\gamma$ , e IL-10 en la fase aguda(91,116), sin embargo si presentaron elevación a los 6 y 12 meses(116). EN otro estudio, Ng demostró incremento de IL-10 en fase aguda (19).

## **ZIKA**

El cuadro clínico de los pacientes con ZIKV fue el más amplio, además de los síntomas generales, los pacientes infectados presentan síntomas articulares, de vías respiratorias y gastrointestinales. Estos pacientes presentan los síntomas que refiere la DGE y la PAHO, sin embargo, consideramos que el exantema debería caracterizarse como pruriginoso con una sensibilidad de 70% y especificidad del 100%.

Al igual que en las otras ETV estudiadas encontramos una disminución significativa en las concentraciones de Hb y Hto en comparación con el grupo sano.

En los pacientes con ZIKV nuestro estudio no encontró diferencia significativa con respecto a los controles en las concentraciones séricas de  $IFN\gamma$ , IL-10 ni  $TNF\alpha$ . Se observó aumento de IL-6 en el grupo de ZIKV sin ser significativo. Lo anterior, nos sugiere una respuesta predominante de Th2.

Tappe y Naveca encuentran incremento de IL-6 en pacientes con ZIKV (5,117). Al igual que nuestro equipo, Tappe no encuentra diferencias significativas en  $IFN\gamma$ , IL-10 ni  $TNF\alpha$ (5) en contraste Naveca encuentra un incremento significativo de  $IFN\gamma$  y  $TNF\alpha$  en los pacientes con ZIKV(117), mientras Barros solo reporta incremento de  $IFN\gamma$  en pacientes con ZIKV(118). Finalmente, Kam detecta elevación significativa de  $IFN\gamma$ , IL-10 y  $TNF\alpha$  en los pacientes con ZIKV además de incremento significativo de  $IFN\gamma$  y  $TNF\alpha$  en pacientes embarazadas con presencia de anomalías fetales(119).

En nuestro estudio es interesante el incremento en las concentraciones del FvW en los pacientes con ZIKV en comparación a los controles, lo que probablemente nos indique una mayor disfunción endotelial.

Además las concentraciones más elevadas de PF-4 en el grupo ZIKV en comparación al grupo de CHIKV, nos indica activación plaquetaria, y pudiera implicar un papel importante en la conversión del monocito a macrófago con una polarización M4(120).

## **CORRELACION ENTRE BIOMARCADORES Y CITOMETRIA HEMÁTICA**

A pesar de encontrar una respuesta inflamatoria e inmunológica de baja intensidad, con liberación de pequeñas cantidades de moléculas, son suficientes para generar una depuración adecuada del virus. Nosotros evaluamos las correlaciones entre estas moléculas. El virus en conjunto con las proteínas de la saliva del mosquito, activa a las células residentes del sitio afectado (45), estas células favorecen una respuesta inflamatoria, así como liberación de factores quimiotácticos que atraen células al sitio de la lesión, las cuales también son susceptibles de infección. Al mismo tiempo la lesión tisular libera Factor tisular, activando a la trombina y posterior activación plaquetaria, las cuales liberan diversas moléculas de sus gránulos. Las células infectadas inicialmente liberan IL-6 orquestando la respuesta inmunológica. IL-6 presenta una correlación negativa con

linfocitos en sangre, debido a que la IL-6 activa a linfocitos T y favorece la diferenciación de linfocitos B, esto condiciona una migración de estas células hacia el sitio de la lesión, por lo cual disminuye su concentración sérica. También encontramos una correlación positiva de IL6 con BT y sP-selectina, lo cual puede deberse a que la IL-6 induce la activación plaquetaria como se ha observado en otros estudios(121)(122), aunque todavía se desconocen los mecanismos.

Se obtuvo una correlación positiva de BT con leucocitos e  $IFN\gamma$ . En nuestra población observamos que las pequeñas cantidades de BT liberada es suficiente para actuar como quimioatrayente de leucocitos y fibroblastos. Estos leucocitos pueden ser quienes liberan  $IFN\gamma$ . El  $IFN\gamma$  se asoció positivamente con FvW, esto puede ser debido a que  $IFN\gamma$  puede inducir la expresión de especies reactivas de oxígeno y generar daño endotelial. El FvW se correlaciona con VPM, debido a que al activarse corriente abajo produce una activación plaquetaria(123). El  $IFN\gamma$  también se correlación con incremento de VPM, esto puede deberse a que el  $IFN\gamma$  favorece el microambiente para la activación plaquetaria.

La disminución de  $IFN\gamma$  se asocia con disminución de  $TNF\alpha$ . Esto se deba a que el  $IFN\gamma$  favorece las vías de transcripción para la expresión de  $TNF\alpha$ (124). Al observar el  $IFN\gamma$  con poca elevación proponemos que la respuesta inmunológica es mediada por  $IFN$  tipo 1 en estas infecciones.  $TNF\alpha$  presento una correlación positiva con IL-10, esto debido a los mecanismos de inmunorregulación. Las concentraciones bajas de IL-10 se asociaron con aumento en la cantidad de basófilos quienes probablemente tengan un importante papel en la liberación de histamina y presentación del exantema. A su vez IL-10 se correlaciona negativamente con VPM, debido a que el ambiente antiinflamatorio también puede disminuir la activación plaquetaria. El VPM se correlaciona negativamente con PF-4 por lo que creemos que se deba un efector autorregulador para disminuir la activación plaquetaria.

## CONCLUSIONES

Las infecciones por ZIKV, DENV y CHIKV presentan activación plaquetaria, como se muestra en la *Figura 12*. Se propone que los fibroblastos, células endoteliales y macrófagos residentes son las primeras células infectadas por ZIKV, DENV y CHIKV, estas liberan IL-6, la cual genera una respuesta inflamatoria, las pequeñas concentraciones de IL6 son suficientes para activar a los linfocitos T y B, así como favorecer la diferenciación de los linfocitos B. Los linfocitos activados a su vez liberan  $IFN\gamma$  y favorecen la expresión de  $TNF\alpha$ .

Se conoce que la IL-6 también tiene un efecto pirogénico, por lo que durante estas enfermedades se presenta la fiebre, a su vez la fiebre incrementa el metabolismo muscular por lo que se presentan las mialgias y dolor retroocular (91). Este ambiente inflamatorio, estimulan a linfocitos B, monocitos y queratinocitos para liberar IL-10, para regular este ambiente inflamatorio, favoreciendo la disminución en la producción de Basófilos y disminución en la actividad plaquetaria que se refleja con disminución del VPM.

De forma simultánea la lesión endotelial y el ambiente inflamatorio activa a las plaquetas, las cuales liberan el contenido de sus gránulos. Entre las moléculas liberadas encontramos

sCD40L, PF4, BT, y sP-selectina entre otros. La sP-selectina favorece el rodamiento de basófilos y posterior migración al sitio de lesión. La migración de basófilos ocasiona sus bajas concentraciones sanguíneas y consideramos que la sP-selectina al mantenerse unida a otras células no fue posible detectar mayores concentraciones. Los basófilos liberan diversas citoquinas, prostaglandinas, factor activador plaquetario e histamina. La histamina puede ser la sustancia que condiciona el exantema y el prurito en estos padecimientos.

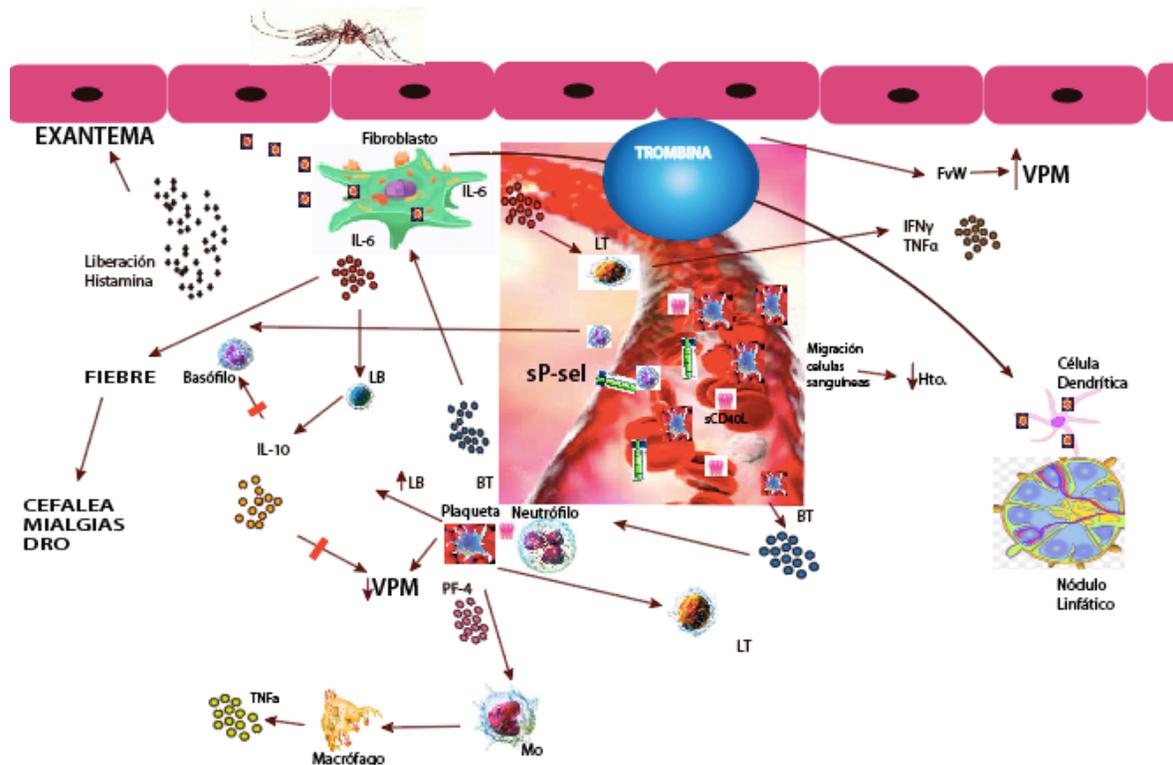


Figura 12. Respuesta inflamatoria y plaquetaria durante la infección por ZIKV, DENV, CHIKV.

También observamos pocas cantidades de sCD40L lo cual también puede deberse a que se mantiene unido a otras células ejerciendo sus acciones por lo que no fue detectable de forma significativa mediante ELISA. El PF-4 favorece la diferenciación monocito a macrófago con una polarización M4, lo que favorece la liberación principalmente de TNF $\alpha$ . PF-4 pudiera tener un efecto regulador para disminuir la activación plaquetaria de acuerdo a nuestros hallazgos.

En este contexto es importante puntualizar que las infecciones por CHIKV, ZIKV y DENV tienen un comportamiento inmunológico muy parecido con algunas diferencias. En el caso de ZIKV observamos activación plaquetaria y endotelial mientras que CHIKV cursa con una respuesta inflamatoria más importante. En este estudio se logró comprobar activación plaquetaria en estas infecciones la cual es más evidente en la infección por ZIKV, lo cual no se ha descrito en otros estudios. Las diferencias encontrados entre nuestras citoquinas y otros estudios puede deberse a una diferencia étnica en la respuesta inmunológica como fue demostrado para el caso de dengue por Restrepo (125) aunado al comportamiento bimodal de TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  como lo describe Gómez (117), por lo que una sola toma, no describe el

comportamiento real de los biomarcadores. El perfil inmunológico bajo que encontramos en esta zona endémica se debe a una eficiente eliminación del virus, ocasionando eventualmente un impacto desfavorable por mecanismos inmunorreguladores que ocasiona afectaciones crónicas en el caso de CHIKV así como neurológicas en el caso de ZIKV o hemorrágicas en el caso del DENV.

## **PERSPECTIVAS**

Debido al pequeño número de casos en nuestros grupos, la fuerza de las observaciones son limitadas y se requieren estudios más amplios para corroborar estos resultados.

Sería interesante realizar la detección de biomarcadores de activación plaquetaria mediante citometría de flujo, ya que tiene mayor sensibilidad y especificidad. Además, estos hallazgos podrían ser relevantes en el conocimiento de la fisiopatología para entender mejor estas enfermedades y sus implicaciones, para lograr establecer estrategias terapéuticas más efectivas.

## BIBLIOGRAFIA

1. Simons CP, Farrar JJ, Vinh-Chau NV WB. Dengue. *NEJM*. 2012;366:1423–32.
2. Secretaria de Salud. Dengue [Internet]. Dirección General de Epidemiología. 2016. Available from: [http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/panodengue/intd\\_dengue.html](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/panodengue/intd_dengue.html)
3. Teng TS, Kam YW, Lee B, Hapuarachchi HC, Wimal A, Ng LC, et al. A systematic meta-analysis of immune signatures in patients with acute chikungunya virus infection. *J Infect Dis*. 2015;211(12):1925–35.
4. Secretaria de Salud. Chikungunya. Dirección General de Epidemiología. 2016.
5. Tappe D, Pérez-Girón JV, Zammarchi L, Rissland J, Ferreira DF, Jaenisch T, et al. Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to convalescent phase. *Med Microbiol Immunol*. 2015;205(3):1–5.
6. Secretaria de Salud. Zika [Internet]. Dirección General de Planeación y Desarrollo Social. 2016. Available from: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/avisos/zika.html>
7. Singla M, Kar M, Sethi T, Kabra SK, Lodha R, Chandele A, et al. Immune Response to Dengue Virus Infection in Pediatric Patients in New Delhi, India-Association of Viremia, Inflammatory Mediators and Monocytes with Disease Severity. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(3):e0004497.
8. Yacoub S, Khanh LP, Mai VLH, Lien LT, Ha NT, Toan TT, et al. Association of microvascular function and endothelial biomarkers with clinical outcome in dengue: an observational study. *J Infect Dis*. 2016;1–26.
9. Punyadee N, Mairiang D, Thiemmecca S, Komoltri C, Pan-ngum W, Chomanee N, et al. Microparticles Provide a Novel Biomarker To Predict Severe Clinical Outcomes of Dengue Virus Infection. *J Virol*. 2015;89(3):1587–607.
10. Jog S, Prayag S, Rajhans P, Zirpe K, Dixit S, Pillai L, et al. Dengue infection with multiorgan dysfunction: SOFA score, arterial lactate and serum albumin levels are predictors of outcome. *Intensive Care Med*. 2015;41(11):2029–30.
11. Hottz ED, Oliveira MF, Nunes PCG, Nogueira RMR, Valls-de-Souza R, Da Poian AT, et al. Dengue induces platelet activation, mitochondrial dysfunction and cell death through mechanisms that involve DC-SIGN and caspases. *J Thromb Haemost*. 2013;11(5):951–62.
12. Rashmi M V, Hamsaveena. Haematological and biochemical markers as predictors of dengue infection. *Malays J Pathol*. 2015;37(3):247–51.
13. Ouyang X, Jiang X, Gu D, Zhang Y, Kong SK, Jiang C, et al. Dysregulated Serum MiRNA Profile and Promising Biomarkers in Dengue-infected Patients. *Int J Med Sci*. 2016;13(3):195–205.
14. Rathakrishnan A, Wang SM, Hu Y, Khan AM, Ponnampalavanar S, Lum LCS, et al. Cytokine Expression Profile of Dengue Patients at Different Phases of Illness. *PLoS One*. 2012;7(12):1–10.
15. Pang J, Lindblom A, Tolfvenstam T, Thein T-L, Naim ANM, Ling L, et al. Discovery and Validation of Prognostic Biomarker Models to Guide Triage among Adult Dengue Patients at Early Infection. *PLoS One*. 2016;11(6):e0155993.
16. Petitdemange C, Wauquier N, Devilliers H, Yssel H, Mombo I, Caron M, et al. Longitudinal Analysis of Natural Killer Cells in Dengue Virus-Infected Patients in Comparison to Chikungunya and Chikungunya/Dengue Virus-Infected Patients.

- PLoS Negl Trop Dis. 2016;10(3):1–17.
17. Dupuis-Maguiraga L, Noret M, Brun S, Le Grand R, Gras G, Roques P. Chikungunya disease: Infection-associated markers from the acute to the chronic phase of arbovirus-induced arthralgia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(3):e1446.
  18. Lohachanakul J, Phuklia W, Thannagith M, Thonsakulprasert T, Ubol S. High concentrations of circulating interleukin-6 and monocyte chemotactic protein-1 with low concentrations of interleukin-8 were associated with severe chikungunya fever during the 2009-2010 outbreak in Thailand. *Microbiol Immunol*. 2012;56(2):134–8.
  19. Ng LFP, Chow A, Sun YJ, Kwek DJC, Lim PL, Dimatatac F, et al. IL-1??, IL-6, and RANTES as biomarkers of Chikungunya severity. *PLoS One*. 2009;4(1):1–8.
  20. Chirathaworn C, Poovorawan Y, Lertmaharit S, Wuttirattanakowit N. Cytokine levels in patients with chikungunya virus infection. *Asian Pac J Trop Med*. 2013;6(8):631–4.
  21. Cumakov MP, Doherty RL, Downs WG, Hammon MC, Panthier R, Porterfield JS, et al. Los Arbovirus Y Su Importancia En Patología Humana.Pdf [Internet]. Francia; 1967. Available from: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/38352/1/WHO\\_TRS\\_369\\_spa.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/38352/1/WHO_TRS_369_spa.pdf)
  22. GUBLER DJ. Human Arbovirus Infections Worldwide. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2001;951(1):13–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb02681.x>
  23. Pingen M, Schmid MA, Harris E, McKimmie CS. Mosquito Biting Modulates Skin Response to Virus Infection. *Trends Parasitol*. 2017;33(8):645–57.
  24. Hotta S. Experimental studies of Dengue. *J Infectious Dis*. 1952;90(1):1–9.
  25. Isturiz RE, Gubler DJ, Del Castillo JB. Dengue and dengue hemorrhagic fever in Latin America and the Caribbean. *Infect Dis Clin North Am*. 2000;14(1):121.
  26. Fajardo-Dolci G, Meljem-Moctezuma J, Vicente-González E, Venegas-Páez F, Mazón-González B, Aguirre-Gas H. The dengue fever in Mexico. Knowledge for improving the quality in health. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2012;50(6):631–9.
  27. Lumsden W. AN EMPIDEMIC OF VIRUS DISEASE IN SOUTHERN PROVINCE, TANGANYIKA TERRITORY, IN 1952-53. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1955;49:33–57.
  28. K S, C N, R K, V O, C O, LS K, et al. Seroprevalence of Chikungunya virus (CHIKV) infection on Lamu Island, Kenya, October 2004. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;78:333–7.
  29. P R, JL S, D S, E B, S L, Filleul, et al. A major epidemic of chikungunya virus infection on Reunion Island, France, 2005– 2006. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;77:727–31.
  30. Morrison T. Reemergence of chikungunya virus. *J Virol*. 2014;88:11644,11647.
  31. Dick GWA, Kitchen SF, Haddow AJ. ZIKA VIRUS I: ISOLATIONS AND SEROLOGICAL SPECIFICITY. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1952;46(5):509–20.
  32. Kay M, Kindhauser MK, Allen T, Frank V, Shankar R, Dye C. Zika : the origin and spread of a mosquito-borne virus. *Bull World Health Organ*. 2016;1–28.
  33. Salud OP de la. Zika - Actualización Epidemiológica de la OPS (Américas) 25 de agosto 2017 [Internet]. 2017. Available from: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=11599:regional-zika-epidemiological-update-americas&Itemid=41691&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11599:regional-zika-epidemiological-update-americas&Itemid=41691&lang=es)
  34. Salud OM de la. Informe sobre la situación Virus de Zika. 2017.

35. Kraemer MUG, Sinka ME, Duda KA, Mylne AQN, Shearer FM, Barker CM, et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus*. *Elife*. 2015;4(JUNE2015):1–18.
36. Perera R, Kuhn RJ. Structural proteomics of dengue virus. *Curr Opin Microbiol*. 2008;11(4):369–77.
37. Sirohi D, Chen Z, Sun L, Klose T, Pierson TC, Rossmann MG, et al. The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. *Science*. 2016;352(6284):467–70.
38. Tian H, Ji X, Yang X, Xie W, Yang K, Chen C, et al. The crystal structure of Zika virus helicase: basis for antiviral drug design. *Protein Cell*. 2016;7(6):450–4.
39. Zika Virus [Internet]. Available from: [https://viralzone.expasy.org/6756?outline=all\\_by\\_species](https://viralzone.expasy.org/6756?outline=all_by_species)
40. Weaver SC, Lecuit M. Chikungunya Virus and the Global Spread of a Mosquito-Borne Disease. *NEJM*. 2015;372(13):1231–9.
41. Jain J, Kumari A, Somvanshi P. In silico analysis of natural compounds targeting structural and nonstructural proteins of chikungunya virus. *F1000Research* 2017. 2017;6:1601.
42. Schmid MA, Glasner DR, Shah S, Michlmayr D, Kramer LD HE. Mosquito Saliva Increases Endothelial Permeability in the Skin, Immune Cell Migration, and Dengue Pathogenesis during Antibody-Dependent Enhancement. *Plos Pathog* [Internet]. 2016;12(6):e1005676. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4911004/>
43. Agarwal A, Joshi G, Nagar DP, Sharma AK, Sukumaran D, Pant SC, Parida MM DP. Mosquito saliva induced cutaneous events augment Chikungunya virus replication and disease progression. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2016;40:126–35. Available from: <http://jvi.asm.org/content/88/4/1881.full>
44. M. K. McCracken, R. C. Christofferson DMC and CNM. Analysis of Early Dengue Virus Infection in Mice as Modulated by *Aedes aegypti* Probing. *J Virol*. 2016;90(1):292–9.
45. Fontaine A, Diouf I, Bakkali N, Missé D, Pagès F, Fusai T, et al. Implication of haematophagous arthropod salivary proteins in host-vector interactions. *Parasites and Vectors*. 2011;4(1):1–17.
46. Schneider BS, Soong L, Zeidner NS. *Aedes aegypti* Salivary Gland Extracts Modulate Anti-viral and TH1/TH2 Cytokine Responses to Sindbis Virus Infection. *Viral Immunol*. 2004;17(November):565–73.
47. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *J Interf Cytokine Res* [Internet]. 2009;29(6):313–26. Available from: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/jir.2008.0027>
48. Chen YL, Simons FER, Peng Z. A Mouse Model of Mosquito Allergy for Study of Antigen–Specific IgE and IgG Subclass Responses, Lymphocyte Proliferation, and IL–4 and IFN– $\gamma$  Production. *Int Arch Allergy Immunol*. 1998;116(4):269–77.
49. Yeaman MR. Platelets: at the nexus of antimicrobial defence. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2014;12(6):426–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24830471>
50. Camicia G, de Larrañaga G. Trampas extracelulares de neutrófilos: un mecanismo de defensa con dos caras. *Med Clin Elsevier*. 2013;140(2):70–5.
51. Assinger A. Platelets and infection - An emerging role of platelets in viral infection.

- Front Immunol. 2014;5(DEC):10–2.
52. Smithburn K. Neutralizing antibodies against certain recently isolated viruses in the sera of human beings residing in East Africa. *J Immunol*. 1952;69(2):223–34.
  53. Isomura H, Yoshida M, Oda M, Seino Y, Ohuchi R, Uno F, et al. Suppressive effects of human herpesvirus-6 on thrombopoietin-inducible megakaryocytic colony formation in vitro. *J Gen Virol* [Internet]. 2000 Mar 1;81(3):663–73. Available from: <http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-81-3-663>
  54. Gonelli A, Mirandola P, Grill V, Secchiero P, Zauli G. Human herpesvirus 7 infection impairs the survival/differentiation of megakaryocytic cells. *Haematologica* [Internet]. 2002 Nov;87(11):1223–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12414354>
  55. Afdhal N, McHutchison J, Brown R, Jacobson I, Manns M, Poordad F, et al. Thrombocytopenia associated with chronic liver disease. *J Hepatol* [Internet]. 2008 Jun;48(6):1000–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827808002213>
  56. Kolb-Mäurer A, Goebel W. Susceptibility of hematopoietic stem cells to pathogens: role in virus/bacteria tropism and pathogenesis. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. 2003 Sep;226(2):203–7. Available from: [https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1016/S0378-1097\(03\)00643-8](https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1016/S0378-1097(03)00643-8)
  57. Flaujac C, Boukour S, Cramer-Bordé E. Platelets and viruses: an ambivalent relationship. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2010 Feb 12;67(4):545–56. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-009-0209-x>
  58. Passos AM, Treitinger A, Spada C. An Overview of the Mechanisms of HIV-Related Thrombocytopenia. *Acta Haematol* [Internet]. 2010;124(1):13–8. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/313782>
  59. Solomon Tsegaye T, Gnirß K, Rahe-Meyer N, Kiene M, Krämer-Kühl A, Behrens G, et al. Platelet activation suppresses HIV-1 infection of T cells. *Retrovirology*. 2013;10:48.
  60. Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1alpha, and MIP-1beta as the Major HIV-Suppressive Factors Produced by CD8+ T Cells. *Science*. 1995;270(5243):1811–5.
  61. Hammwöhner M, Ittenson A, Dierkes J, Bukowska A, Klein H, Ledeckel U, et al. Platelet expression of CD40/CD40 ligand and its relation to inflammatory markers and adhesion molecules in patients with atrial fibrillation. *Exp Biol Med*. 2007;232(4):581–9.
  62. Henn V, Steinbach S, Büchner K, Presek P, Kroczeck RA. The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40. *Blood*. 2001;98(4):1047–54.
  63. Von Hundelshausen P, Weber C. Platelets as immune cells: Bridging inflammation and cardiovascular disease. *Circ Res*. 2007;100(1):27–40.
  64. Semple JW, Italiano JE, Freedman J. Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(4):264–74.
  65. Karshovska E, Weber C, von Hundelshausen P. Platelet chemokines in health and disease. *Thromb Haemost*. 2013;110(5):894–902.
  66. Miller JL. The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages.

- Plos Pathog. 2008;4:e17.
67. Tsai YT, Y. CS, Lee CN, Kao CL. Human TLR3 recognizes dengue virus and modulates viral replication in vitro. *Cell Microbiol.* 2009;11:604–15.
  68. Y.M. L. Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity. *J Virol.* 2008;82:335–45.
  69. Halstead SB. Antibody, macrophages, dengue virus infection, shock, and hemorrhage: a pathogenetic cascade. *Rev Infect Dis.* 1989;11(4):s830–9.
  70. N. B. No TitleThe double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat Rev.* 2011;11:34–46.
  71. John ALS, Abraham SN, Gubler DJ. Barriers to preclinical investigations of anti-dengue immunity and dengue pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2013;11(6):420–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3030>
  72. Simon AY, Sutherland MR, Pryzdial ELG. Dengue virus binding and replication by platelets. *Blood.* 2015;126(3):378–85.
  73. Tamura T, Yanai H, Savitsky D, Taniguchi T. The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:535–84.
  74. Rulli NE, Rolph MS, Srikiatkachorn A, Anantapreecha S, Guglielmotti A, Mahalingam S. Protection from arthritis and myositis in a mouse model of acute chikungunya virus disease by bindarit, an inhibitor of monocyte chemotactic protein-1 synthesis. *J Infect Dis.* 2011;204:1026–30.
  75. C S, T C, F C, M S, N G, F G-B, et al. Type I IFN controls chikungunya virus via its action on nonhematopoietic cells. *J Exp Med.* 2010;207:429–42.
  76. TH T, FM L, WW L, LF N. Mouse models for Chikungunya virus: deciphering immune mechanisms responsible for disease and pathology. *Immunol Res.* 2012;53:136–47.
  77. DJ1 F, F W, GA F. Increased thromboxane biosynthesis during coronary thrombolysis. Evidence that platelet activation and thromboxane A2 modulate the response to tissue-type plasminogen activator in vivo. *Circ Res.* 1989;65(1):83–94.
  78. N W, P B, D N, C P, Ndjoiy-, A M, et al. The acute phase of Chikungunya virus infection in humans is associated with strong innate immunity and T CD8 cell activation. *J Infect Dis.* 2011;204:115–23.
  79. YW K, FM L, TH T, WW L, D S, S H, et al. Early neutralizing IgG response to Chikungunya virus in infected patients targets a dominant linear epitope on the E2 glycoprotein. *EMBO Mol Med.* 2012;4:330–43.
  80. L D-M, M N, S B, R LGG, G RP. Infection-associated, Chikungunya disease: Of, markers from the acute to the chronic phase Arthralgia, Arbovirus-induced. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6:e1446.
  81. V R, RS M, A D, V R. Correlation of plasma viral loads and presence of chikungunya IgM antibodies to cytokine/chemokine levels during acute chikungunya virus infection. *J Med Virol.* 2014;86:1393–401.
  82. Z H, B M, M C, EK O, SC W, DJ K, et al. Active infection of human blood monocytes by Chikungunya virus triggers an innate immune response. *J Immunol.* 2010;184:5903–13.
  83. C P, P B, N W, V B eziat, P D, EM L, et al. Unconventional repertoire profile is imprinted during acute chikungunya infection for natural killer cells polarization toward cytotoxicity. *PLoS Pathog.* 2011;7:e1002268.
  84. JJ H, MC JB, P KT, T D, G L-P-Y, B D, et al. Persistent chronic inflammation and

- infection by Chikungunya arthritogenic alphavirus in spite of a robust host immune response. *J Immunol.* 2010;184:5914–27.
85. Teo TH, Lum FM, Claser C, Lulla V, Lulla A, Merits A, et al. A pathogenic role for CD4+ T cells during Chikungunya virus infection in mice. *J Immunol.* 2013;190:259–69.
  86. WW L, TH T, Z H. Expanding regulatory T cells alleviates chikungunya virus-induced pathology in mice. *J Virol.* 2015;89(15):7893–904.
  87. Sharma KS, Jain S. Chikungunya: A rheumatologist's perspective. *Int J Rheum Dis.* 2018;21(3):584–601.
  88. A N, K D, B H, A B. Role of pattern recognition receptors in flavivirus infections. *Virus Res.* 2014;185:32–40.
  89. R H, O D, S W, P E, A N, N L. Biology of Zika virus infection in human skin cells. *J Virol.* 2015;89:8880–96.
  90. Tandale B V., Sathe PS, Arankalle VA, Wadia RS, Kulkarni R, Shah S V., et al. Systemic involvements and fatalities during Chikungunya epidemic in India, 2006. *J Clin Virol.* 2009;46(2):145–9.
  91. Kelvin AA, Banner D, Silvi G, Moro ML, Spataro N, Gaibani P, et al. Inflammatory cytokine expression is associated with Chikungunya virus resolution and symptom severity. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(8):e1279.
  92. Schwartz O, Albert ML. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(7):491–500.
  93. Kularatne SAM, Gihan MC, Weerasinghe SC, Gunasena S. Concurrent outbreaks of Chikungunya and Dengue fever in Kandy, Sri Lanka, 2006-07: a comparative analysis of clinical and laboratory features. *Postgrad Med J.* 2009;85(1005):342–6.
  94. Boumahni B, Kaplan C, Clabé A, Randrianaivo H, Lanza F. Infection materno-fœtale à chikungunya associée à un syndrome de Bernard-Soulier. *Arch Pédiatrie.* 2011;18(3):272–5.
  95. Petersen LR, Jamieson DJ, Powers AM, Honein MA. Zika Virus. *NEJM.* 2016;374(16):1552–63.
  96. DGE (Dirección General de Epidemiología). Lineamientos para la vigilancia epidemiológica de dengue por laboratorio. Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos 2014 p. 1–81.
  97. Dirección General de Epidemiología. Lineamientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica y diagnóstico por laboratorio de infección por virus Zika [Internet]. Lineamientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica y diagnóstico por laboratorio de infección por virus Zika México; 2016 p. 52. Available from: [http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/lineamientos/2016/lineamientos\\_ve\\_y\\_lab\\_virus\\_zika.pdf](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/lineamientos/2016/lineamientos_ve_y_lab_virus_zika.pdf)
  98. Organización Panamericana de la Salud. DENGUE Guías para la atención de enfermos en la región de las américas. Vol. dos, Catalogación en la Fuente, Biblioteca Sede de la OPS. 2015. 126 p.
  99. Dirección General de Epidemiología. Lineamientos para la Vigilancia Epidemiológica y Diagnóstico por laboratorio de Fiebre chikungunya. 2013.
  100. Secretaría de Salud. Dirección General de Epidemiología Lineamientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica y Diagnóstico por Laboratorio de Infección por Virus Zika. 2015;16–29.
  101. Javelle E, Tiong T, Leparc-Goffart I, Savini H, Simon F. Inflammation of the

- external ear in acute chikungunya infection: experience from the outbreak in Johor Bahru, Malaysia, 2008. *J Clin Virol.* 2014;59:270–3.
102. Dovlatova N, Lordkipanidzé M, Lowe GC, Dawood B, May J, Heptinstall S, et al. Evaluation of a whole blood remote platelet function test for the diagnosis of mild bleeding disorders. *J Thromb Haemost.* 2014;12(5):660–5.
  103. Kamath S, Blann AD, Lip GYH. Platelet activation: Assessment and quantification. *Eur Heart J.* 2001;22(17):1561–71.
  104. Michelson A. Platelets. 3rd ed. Boston, Massachusetts: Elsevier; 2013. 519-602 p.
  105. Scherthaner G, Silberbauer K, Muhlhauser I, Willvonseder R. Clinical significance of the radioimmunological determination of beta-thromboglobulin and platelet factor 4. *Med Austriaca Suppl.* 1979;6:375–9.
  106. Kaplan K, Owen J. Plasma levels of beta-thromboglobulin and platelet factor 4 as indices of platelet activation in vivo. *Blood.* 1981;57(2):199–202.
  107. Ludlam C. Evidence for the platelet specificity of beta-thromboglobulin and studies on its plasma concentration in healthy individuals. *Brithis J Haematol.* 1979;41(2):271–8.
  108. Senior R, Griffin G, JS H, Walz D, Deuel T. Chemotactic activity of platelet alpha granule proteins for fibroblasts. *J Cell Biol.* 1983;96(2):328–85.
  109. Yun S-H, Sim E-H, Goh R-Y, Park J-I, Han J-Y. Platelet Activation: The Mechanisms and Potential Biomarkers. *Biomed Res Int* [Internet]. 2016;2016:1–5. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2016/9060143/>
  110. Dewitte A, Tanga A, Villeneuve J, Lepreux S, Ouattara A, Desmoulière A, et al. New frontiers for platelet CD154. *Exp Hematol Oncol* [Internet]. 2015;4:6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4355125&tool=pmcentre&rendertype=abstract>
  111. LENTING P. J., CASARI C, CHRISTOPHE OD, DENIS C V. von Willebrand factor: the old, the new and the unknown. *J Thromb Haemost.* 2012;10:2428–37.
  112. Ueleres-Braga J, Bressan C, Razal-Dalvi A, Amaral-Calvet G, Paiva-Daumas R, Rodrigues N, et al. Accuracy of Zika virus disease case definition during simultaneous Dengue and Chikungunya epidemics. *PLoS One.* 2017;12(6):e0179725.
  113. Saroch A, Arya V, Sinha N, Taneja RS, Sahai P, Mahajan RK. Clinical and laboratory factors associated with mortality in dengue. *Trop Doct.* 2017;47(2):141–5.
  114. Staples E, Powers A, Tomashek K, Lanciotti R, Hunsperger E. Preparedness and Response for Chikungunya Virus. 2011. 1-161 p.
  115. Balta S, Demirkok S, Cakar M. Mean platelet volume as a surrogate marker of low-grade inflammation in osteoarthritis. *Platelets.* 2014;25(8):643–4.
  116. C C, Y P, S L, N W. Cytokine levels in patients with chikungunya virus infection. *Asian Pac J Trop Med.* 2013;6:631–4.
  117. Naveca FG, Pontes GS, Chang AYH, Silva GAV da, Nascimento VA do, Monteiro DC da S, et al. Analysis of the immunological biomarker profile during acute Zika virus infection reveals the overexpression of CXCL10, a chemokine linked to neuronal damage. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2018;113(6):e170542.
  118. Barros JB de S, da Silva PAN, Koga R de CR, Gonzalez-Dias P, Filho JRC, Nagib PRA, et al. Acute Zika virus infection in an endemic area shows modest proinflammatory systemic immunoactivation and cytokine-symptom associations.

- Front Immunol. 2018;9(MAY):1–11.
119. Kam YW, Leite JA, Lum FM, Tan JJJ, Lee B, Judice CC, et al. Specific biomarkers associated with neurological complications and congenital central nervous system abnormalities from Zika virus-infected patients in Brazil. *J Infect Dis.* 2017;216(2):172–81.
  120. Labonte AC, Tosello-Trampont A-C, Hahn YS. The Role of Macrophage Polarization in Infectious and Inflammatory Diseases. *Mol Cells* [Internet]. 2014;37(4):275–85. Available from: <http://www.molcells.org/journal/view.html?doi=10.14348/molcells.2014.2374>
  121. Yan SLS, Russell J, Granger DN. Platelet activation and platelet-leukocyte aggregation elicited in experimental colitis are mediated by interleukin-6. *Inflamm Bowel Dis.* 2014;20(2):353–62.
  122. Gremmel T, Perkmann T, Kopp CW, Seidinger D, Eichelberger B, Koppensteiner R, et al. Interleukin-6 and asymmetric dimethylarginine are associated with platelet activation after percutaneous angioplasty with stent implantation. *PLoS One.* 2015;10(3):1–11.
  123. Estevez B, Du X. New Concepts and Mechanisms of Platelet Activation Signaling. *Physiology* [Internet]. 2017;32(2):162–77. Available from: <http://physiologyonline.physiology.org/lookup/doi/10.1152/physiol.00020.2016>
  124. Vila-del Sol V, Punzon C, Fresno M. IFN- $\gamma$ -Induced TNF- $\alpha$  Expression Is Regulated by Interferon Regulatory Factors 1 and 8 in Mouse Macrophages. *J Immunol* [Internet]. 2008;181(7):4461–70. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.181.7.4461>
  125. Restrepo BN, Ramirez RE, Arboleda M, Alvarez G, Ospina M, Diaz FJ. Serum levels of cytokines in two ethnic groups with dengue virus infection. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;79(5):673–7.

## ANEXOS

### Anexo 1. Abreviaturas

ALT Alanino amino transferasa  
AST Aspartato amino transferasa  
BT Beta-tromboglobulina  
C Cápside  
CCL Quimiocina (motivo C-C) ligando  
CD40L Célula Dendrítica Sistema de Ligando 40  
CDC Centers for disease Control and Prevention  
CHIKV Virus del chikungunya  
CLEC4M Lecitina tipo C familia del dominio 4 miembro M. Del inglés C-type lectin domain family 4 member M.  
CXCL Quimiocina CXC  
DC-SIGN Célula dendrítica específica - molécula de adhesión intercelular -3 no integrina. Del Inglés: **Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin**  
DENV Virus del dengue  
DGE Dirección General de Epidemiología  
DNA Ácido Desoxirribonucleico  
E Envoltura  
EDTA Etilenamintetracético  
ELISA Ensayo inmunoenzimático sobre fase sólida  
EVT Enfermedad transmitida por vector  
FGA Cadena alfa de fibrinógeno  
FGB Factor de crecimiento de fibroblastos  
FHD Fiebre por dengue hemorrágico  
GM-CSF Factor estimulante de colonias granulocito-macrófago  
HIV Human inmunodeficiency virus  
HSP Proteínas de choque térmico  
ICAM Molécula de adhesión intercelular  
IFN Interferón  
IL Interleucina  
IL1-RA Receptor antagonista de interleucina 1  
IP Interferón  
IP-10 Interferón gamma-proteína inducible 10 (También conocida como CXCL-10)  
L-SIGN SIGN del hígado y nódulos linfáticos. Del inglés liver and lymph node-SIGN, también conocido como CLEC4M  
LESP Laboratorios estatal de salud pública  
M Membrana  
MCP Proteína quimioatrayente de monocitos  
MIP-1a Proteína inflamatoria de macrófagos 1-alfa  
NET Neutrófilo  
NSp proteínas no estructurales  
PAHO Organización panamericana de la Salud  
PCR Proteína C reactiva

RANTES Quimiocina también conocida como CCL5  
RNA Acido desoxirribonucleico  
RT-PCR Reacción en cadena de polimerasa reversa  
RT-qPCR Reacción en cadena de polimerasa reversa cuantitativa  
SE semana epidemiológica  
SGB Síndrome de Guillain Barré  
TLR4 Receptor tipo Toll 4  
TNF- $\alpha$  Factor de necrosis tumoral alfa  
uPAR Receptor de uroquinasa  
VCAM Molécula de adhesión vascular  
VEGF Factor de crecimiento endotelial vascular  
VPM Volumen plaquetario medio  
VPS13C Proteína vacuolar tipo 13 homólogo C  
VSG Volumen de sedimentación globular  
WNV Virus del Oeste del Nilo  
ZIKV Virus de zika

Anexo 2. Estudio epidemiológico de Enfermedades Transmitidas por vector

Anverso

**SISTEMA NACIONAL DE SALUD**  
**ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE CASO DE ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR VECTOR**

**I. DATOS DE IDENTIFICACIÓN DEL PACIENTE**  
 No. de afiliación o expediente: \_\_\_\_\_ Folio de Caso: \_\_\_\_\_  
 Nombre: \_\_\_\_\_ RFC: \_\_\_\_\_ CURP: \_\_\_\_\_  
 Apellido paterno: \_\_\_\_\_ Apellido materno: \_\_\_\_\_ Nombre DI: \_\_\_\_\_

**DATOS DEL NACIMIENTO:** Fecha de nacimiento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Estado de nacimiento: \_\_\_\_\_ Municipio de nacimiento: \_\_\_\_\_  
 Sexo: M  F  Edad: Años \_\_\_\_ Meses \_\_\_\_ Días \_\_\_\_

**RESIDENCIA ACTUAL**  
 Domicilio: \_\_\_\_\_ Calle y Núm.: \_\_\_\_\_ Colonia: \_\_\_\_\_  
 Estado: \_\_\_\_\_ Jurisdicción: \_\_\_\_\_ Municipio: \_\_\_\_\_  
 Localidad: \_\_\_\_\_ Teléfono (s): \_\_\_\_\_  
 Entre: Calle: \_\_\_\_\_ y calle: \_\_\_\_\_ C.P.: \_\_\_\_\_

**LUGAR LABORAL**  
 Domicilio: \_\_\_\_\_ Calle y Núm.: \_\_\_\_\_ Colonia: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_  
 Municipio: \_\_\_\_\_ Localidad: \_\_\_\_\_ Teléfono: \_\_\_\_\_  
 ¿Habla lengua indígena? Sí  No  Desconoce  ¿Cuál? \_\_\_\_\_ ¿Es indígena? Sí  No  Ignorado:

**II. DATOS DE LA UNIDAD NOTIFICANTE**  
 Estado: \_\_\_\_\_ Jurisdicción: \_\_\_\_\_ Municipio: \_\_\_\_\_  
 Localidad: \_\_\_\_\_ Institución: \_\_\_\_\_ Clave de la Unidad: \_\_\_\_\_  
 Nombre de la Unidad: \_\_\_\_\_ Delegación: \_\_\_\_\_

FECHA DE SOLICITUD DE ATENCIÓN: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ FECHA DE PRIMER CONTACTO CON LOS SERVICIOS DE SALUD  
 COMO CASO PROBABLE DE DENGUE CON SIGNOS DE ALARMA O GRAVE: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
 FECHA DE INICIO DE ESTUDIO: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ FECHA DE NOTIFICACIÓN A LA JURISDICCIÓN: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
 FECHA DE NOTIFICACIÓN AL ESTADO: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ FECHA DE NOTIFICACIÓN A LA DEE: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ FECHA DE TERMINACIÓN DEL ESTUDIO: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
 DIAGNÓSTICO PROBABLE: \_\_\_\_\_ DIAGNÓSTICO FINAL: \_\_\_\_\_

**III. DATOS EPIDEMIOLÓGICOS**  
 ¿HA SALIDO DE SU LUGAR DE RESIDENCIA EN LAS ÚLTIMAS TRES SEMANAS? Sí  No  En caso de respuesta afirmativa, especifique e indique:  
 País: \_\_\_\_\_ Estado/Provincia: \_\_\_\_\_ Jurisdicción: \_\_\_\_\_ Ciudad/Municipio: \_\_\_\_\_  
 País: \_\_\_\_\_ Estado/Provincia: \_\_\_\_\_ Jurisdicción: \_\_\_\_\_ Ciudad/Municipio: \_\_\_\_\_  
 País: \_\_\_\_\_ Estado/Provincia: \_\_\_\_\_ Jurisdicción: \_\_\_\_\_ Ciudad/Municipio: \_\_\_\_\_

PROCEDENCIA DE LA INFECCIÓN: De la jurisdicción  De otra jurisdicción dentro del estado  De otro estado (país)  De otro país (importado)

CONTACTO CON ANIMALES: MOSCO  CHINCHE  GARRAPATA  OTRO \_\_\_\_\_

EXISTEN ENFERMOS SIMILARES EN LA LOCALIDAD: Sí  No  HA RECIDIDO TRANSFUSIONES SANGUÍNEAS: Sí  No

ANTECEDENTES DE MUERTES INUSUALES DE ANIMALES: Sí  No  EQUINO  AVE  OTRO \_\_\_\_\_

**IV. CUADRO CLÍNICO** (SI = 1, No = 2, Ignorado = 9)

Fecha de inicio de signos y síntomas: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Fiebre	Fecha de inicio de la fiebre	Temperatura	°C
<input type="checkbox"/>	____/____/____	____	____

Cefalea	Dolor abdominal	Alteraciones cardiacas	Letargo
Mialgia	Lipotimia	Nódulos	Choque
Artralgias leves o moderadas	Órtica	Úlcera	Poleque
Poliartralgias severas*	Conjuntivitis	Lesión de membranas mucosas	Ergonosis
Antritis	Congestión nasal	Injuria	Hematomas
Dolor de espalda	Tos	Irregularidad	Tamquete positivo
Dolor retroocular	Faringitis	Rigidez de nuca	Ascidia
Exantema	Hepatorregalia	Eraupor	Dermate pleural
Prurito	Espionomegalia	Desorientación	Edema
Vómito	Alteraciones del gusto	Torbido	Platinozemia
Náuseas	Adenomegalias	Convulsiones	Gingivorragia
Diarrea	Induración	Debilidad muscular	Epistaxis
Escalofrío	Induración de párpado	Parotitis	Hematemesis
Potofobia	Órtica	Otitis	Meleno
* Inapacitantes	Otros _____		

MANEJO: Hospitalario  Ambulatorio  FECHA DE INGRESO: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

NOMBRE DE LA UNIDAD TRATANTE: \_\_\_\_\_ CLUES: \_\_\_\_\_

Clave de la Unidad: \_\_\_\_\_ Institución: \_\_\_\_\_ Servicio de atención:  Urgencia médica  Terapia Intensiva   
 Medicina Interna  Gineco Obstetricia   
 Pediatría  Otros, especifique: \_\_\_\_\_  
 Terapia Intensiva

Diagnóstico inicial hospitalario: \_\_\_\_\_

COMORBILIDAD Y/O OTRAS CONDICIONES: Trastornos hematológicos  Diabetes  Hipertensión  Enf. autoinmunes  Enf. Renal   
 Inmunosupresión  Carcinoma hepático  Embarazo  Otra: \_\_\_\_\_ Especifique: \_\_\_\_\_







Anexo 3. Carta de Aprobación de UMSNH



Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas  
"Dr. Ignacio Chávez"

SECRETARÍA ACADÉMICA

A S U N T O: INFORMACIÓN

Morelia, Mich., 15 de Marzo de 2017.

**C. DRA. GEORGINA ORTIZ MARTINEZ**  
ALUMNA DE LA MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA SALUD  
POSGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS  
"DR. IGNACIO CHÁVEZ"  
**P R E S E N T E**

Le notifico que el protocolo de investigación que Usted presentó ante esta Secretaría Académica a mi cargo, y cuyo título es "**Estudio de biomarcadores inflamatorios y de activación plaquetaria en infecciones virales emergentes en México: Dengue, Chikungunya y Zika**" y que fue sometido a la evaluación del Comité de Investigación y Ética en Investigación de esta Dependencia Universitaria, quien (es) de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores consideraron que cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de ética y de investigación vigentes, por lo que el protocolo fue **AUTORIZADO**, habiéndose asignado el número de registro de la dependencia siguiente:

COMITÉ DE INVESTIGACIÓN Y ÉTICA EN INVESTIGACIÓN	ÁREA	Nº DE REGISTRO
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS "DR. IGNACIO CHÁVEZ"	POSGRADO	002/P/5/2017

Se le solicita informar del grado de avance del mismo acorde al cronograma de actividades así como el título de la revista, volumen, año y páginas una vez que el mismo sea publicado. En caso de que el mismo contemple la graduación de un alumno indicar fecha y grado académico obtenido:

Atentamente:

  
**DR. MARIO MIGUEL ÁNGEL HERRERA**  
SECRETARIO ACADÉMICO



c.c.p. Coordinador de la Investigación Científica. UMSNH  
c.c.p. Archivo y Correspondencia de la Facultad.  
c.c.p. Archivo de la Secretaría Académica.  
c.c.p. Jefatura de Investigación Fac Cs Med y Biol. "Dr. Ignacio Chávez"  
DR.AVO/sgg\*

## Anexo 4. Carta de Aprobación de IMSS

SIRELCIS

Página 1 de 1



**Dirección de Prestaciones Médicas**  
Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud  
Coordinación de Investigación en Salud



12 de diciembre del 2016

Ref. 09-B5-61-2800/201600/ 3250

Dr. ORTIZ MARTINEZ GEORGINA  
COORDINACION CLINICA DE MEDICINA  
Michoacán

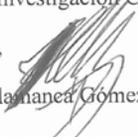
Presente:

Informo a usted que el protocolo titulado: **Estudio de biomarcadores inflamatorios y de activación plaquetaria en infecciones virales emergentes en México: Dengue, Chikungunya y Zika.** , fue sometido a la consideración de esta Comisión Nacional de Investigación Científica.

Los procedimientos propuestos en el protocolo cumplen con los requerimientos de las normas vigentes, con base en las opiniones de los vocales del Comité de Ética en Investigación y del Comité de Investigación de la Comisión Nacional de Investigación Científica del IMSS, se ha emitido el dictamen de **APROBADO**, con número de registro: R-2016-785-104.

De acuerdo a la normatividad vigente, deberá informar a esta Comisión en los meses de enero y julio de cada año, acerca del desarrollo del proyecto a su cargo. Este dictamen sólo tiene vigencia de un año. Por lo que en caso de ser necesario requerirá solicitar una reaprobación al Comité de Ética en Investigación de la Comisión Nacional de Investigación Científica, al término de la vigencia del mismo.

Atentamente,

  
Dr. Fabio Salamanca Gómez  
Presidente  
Comisión Nacional de Investigación Científica

Anexo comentarios:

~~SNN/ iah. F-CNIC-2016-131~~

**IMSS**

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

4° piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos Av. Durazmóvil 330 Col. Doctores México 06720 56276000 ext. 21210 [casas@cis.gob.mx](mailto:casas@cis.gob.mx)