



UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
Cuna de héroes, crisol de pensadores

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO-FARMACOBIOLOGÍA

TESIS:

AISLAMIENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA
EN ENFERMEDADES VIRALES EMERGENTES CAUSADAS POR ARBOVIRUS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

LICENCIADO EN QUÍMICO-FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

P.Q.F.B. KENIA IRAÍ BLANCAS AYALA

DIRECTOR DE TESIS:

D.C MARTHA EVA VIVEROS SANDOVAL

MORELIA, MICHOACÁN; MARZO DE 2018.



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
FACULTAD DE QUÍMICO-FARMACOBIOLOGÍA

DRA. MARTHA EVA VIVEROS SANDOVAL

COMITÉ TUTORAL

VIRGINIA CAMPOS CABRERA

SANDRA SÁNCHEZ CEJA

JUDITH ESMERALDA PRIETO

FINANCIAMIENTO

El presente trabajo de tesis fue financiado mediante el proyecto de investigación “Eficacia protectora y neutralización para seleccionar una vacuna óptima para virus zika”, financiado por el programa Innovate UK, número de referencia: 972216, amparado por el convenio de colaboración R45704/CN002 entre la universidad de Oxford y la UMSNH.



DEDICATORIAS

A mi familia, por ser el pilar de mi vida y la guía en los pasos que me han formado hasta el día de hoy académica y personalmente.

Para mi **Prof. José Abigail Ayala García**, por llevarme de la mano en mi formación, por sus cuidados y méritos personales que me inspiraron para ser la profesionalista que deseo ser.

A mi madre, **Martha Sandra Ayala Ávila**, porque todo lo que soy y seré se lo debo a ella y a su dedicación. Gracias por darme las oportunidades en la vida, que confío algún día te hagan sentir orgullosa de los sacrificios que has hecho por tus hijos.

Sellenne García Ayala por ser la confidente de vida, que siempre me muestra su apoyo incondicional. Hermana, siempre te admiraré,

Miguel Ángel Téllez Ayala, por su disciplina y carácter que me forjaron para salir de las adversidades. Hermano, eres mi pilar.

A mis sobrinos **Asiel, Ismerai, Jade y Abisaí** porque son el motor en mis días grises, espero serles el ejemplo que mis hermanos han sido en mí.

Para esas amistades que estuvieron conmigo en los momentos difíciles y han sido mis confidentes incondicionales, sin ustedes no habría llegado hasta dónde estoy y espero estén hasta donde estaré.

AGRADECIMIENTOS

No existen las palabras que expresen lo profundo que dejaron huella, en mi vida.

A **Dios**, por ser mi principio y fin.

A mi directora de tesis, **Martha Eva Viveros** por creer en mí.

A mis profesores de facultad, por dejarme las enseñanzas necesarias para defenderme en el mundo laboral.

A mis amigos de facultad, **Nancy, Ilse, Kenia, Eréndira, Jorge, Luis Donald, Lizbeth**, y a los que estuvieron ahí dejándome sonrisas y los momentos compartidos, les deseo mucho éxito en sus vidas.

Para mis amigos de vida, **Gabriela, Zahory, Alejandro, Rafael**, no sé qué habría hecho sin sus ánimos constantes; han creído en mí desde siempre y no sé cómo podría agradecerles eso.

A las mejores compañeras del Laboratorio de Hemostasia y Biología Vascular, por su apoyo y sus consejos.

INDICE DE CONTENIDOS

TÍTULO DE TESIS

FIRMAS

FINANCIAMIENTO

DEDICATORIAS

AGRADECIMIENTOS

ABREVIATURAS

GLOSARIO

1. RESUME	11
2. ABSTRACT.....	12
3. INTRODUCCIÓN	13
3.1 Importancia de las infecciones por Arbovirus en el mundo y en México en los últimos años	13
3.2 Epidemiología	14
3.2.1 Prevalencia en México y Michoacán.....	16
3.2.1.1 Dengue (DENV).....	17
3.2.1.2 Chikungunya (CHIKV).....	18
3.2.1.3 Zika (ZIKV).....	19
3.3 Arbovirus.....	24
3.3.1 Estructura de los Arbovirus.....	25
3.3.1.1 Dengue (DENV).....	25
3.3.1.2 Chikungunya (CHIKV).....	26
3.3.1.3 ZIKA (ZIKV).....	27
3.3.2 Vectores.....	28
3.3.2.1 Aedes aegypti.....	29
3.3.2.2 Reservorios Naturales.....	31
3.3.2.3 Transmisión.....	32
3.4 Presentación clínica.....	35
3.4.1 Inmunología de las infecciones arbovirales.....	38
3.5 Métodos de Identificación.....	44
3.5.1 Diagnóstico.....	44
3.5.2 Conservación de la muestra.....	47
3.6 Métodos de Aislamiento de PBMC.....	48
3.6.1 Aislamiento de PBMC usando Tubos de Preparación Celular....	49
3.6.2 Aislamiento de PBMC usando Ficoll-Hypaque.....	50
3.6.3 Aislamiento de PBMC usando Lymphoprep.....	51
3.6.4 Criopreservación de PBMC.....	52

3.7 Lineamientos Internacionales para el establecimiento de Biobancos de Muestras Biológicas Humanas.....	53
3.7.1 Información de Biobancos y donantes.....	55
3.7.2 Toma de muestras	56
3.7.3 Transporte de muestras biológicas	56
3.7.4 Almacenamiento de muestras biológicas para biobancos	57
4. JUSTIFICACIÓN.....	58
5. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	59
6. HIPÓTESIS	60
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
7.1 Procedimiento para el Aislamiento de PBMC.....	63
7.1.1 Preparación de reactivos.....	63
7.1.2 Método de Aislamiento de PBMC.....	64
7.1.3 Método de Criopreservación de PBMC.....	66
7.1.4 Método de Descongelación de PBMC.....	67
8. RESULTADOS.....	70
9. DISCUSIÓN	74
10. CONCLUSIÓN	77
11. REFERENCIAS	78
12. ANEXOS	84

ABREVIATURAS

ADE: Antibody Dependet Enhancement (Incremento Dependiente de Anticuerpos)

Ae.: Aedes

ARN: Ácido Ribonucleico

DC-SING: Lectinas de tipo C

DMSO: Dimetil Sulfóxido

EDTA: Etileno Diamino Tetracético

ELISA: Enzime Linked Inmunosorbent Assay (Prueba de Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas)

FBS: Suero Fetal Bovino

PBS: Solución Salina Buffer de Fosfatos

RPMI: Roswell Park Memorial Institute Medium

TR-PCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

DENV: Dengue

CHIKV: Chinkungunya

ZIKV: Zika

IgG: inmunoglobulina G

IgM: inmunoglobulina M

RT-PCR Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Transcripción Inversa Reacción en Cadena de la Polimerasa)

DF: Dengue Fever (Fiebre por Dengue)

DHF: Dengue Hemorrhagic Fever (Fiebre por Dengue Hemorrágico)

DSS: Dengue Shock Syndrome (Síndrome de choque por Dengue)

GLOSARIO

Agentes etiológicos: Conjunto factores causales, que están presentes en el medio ambiente y que pueden provocar enfermedades al huésped.

Arbovirus: Conjunto de virus transmitidos todos por artrópodos, del inglés Arthropod-borne Viruses.

Artrópodos: Son los animales invertebrados que forman el filo más diverso del reino animal. Estos animales tienen el cuerpo cubierto por un exoesqueleto conocido como cutícula y formado una serie lineal de segmentos ostensibles, con apéndices de piezas articuladas.

Biobanco: Establecimiento que recoge, almacena y distribuye material biológico y los datos asociados a dicho material.

Epizootias: Enfermedad contagiosa que ataca a un número inusual de animales al mismo tiempo y lugar y se propaga con rapidez.

Hematófago: Es el hábito de alimentación de aquellos que se nutren con sangre.

Maculopapular: Es un tipo de erupción, que no se eleva por encima de la superficie de la piel.

Teratogenicidad: Capacidad del medicamento para causar daño.

Trombocitopenia: Cualquier situación de disminución de la cantidad de plaquetas circulantes en el torrente sanguíneo por debajo de los niveles normales, es decir, con un recuento plaquetario inferior a 100.000/mm³.

Vector: Organismo, que transmite un agente infeccioso o infectante desde los individuos afectados a otros que aún no portan ese agente.

Poliproteína: Se refiere a una molécula de proteína que es inactiva. Por modificación post traduccional da origen a diferentes proteínas activas

Replicación: Proceso por el cual el ADN de una célula se duplica antes de la división celular para que, después de esta, cada célula tenga la misma información genética.

Monocinas: Proteína secretada por algunas células del sistema inmunológico, como los macrófagos, para enviar instrucciones a otras células del sistema.

Viremia: Condición médica donde virus entran al torrente sanguíneo y logran tener acceso al resto del cuerpo.

Inmunopatogénesis: Estudio de la forma como actúa el sistema inmunitario con el objetivo de determinar las causas de las diferentes enfermedades inmunitarias que existen para encontrar un tratamiento eficaz.

Líquidos hísticos: El líquido formado por el ultra filtrado del plasma sanguíneo que rodea las células: el líquido hístico actúa como medio ambiente interno de las células.

Leucocitosis: Aumento del número de leucocitos en la sangre circulante; puede ser por causas fisiológicas, como en el embarazo o durante la digestión, o por causas patológicas, como en las infecciones.

Trombocito: Pedazo diminuto de célula que se produce cuando se rompe una célula grande de la médula ósea. Los trombocitos se encuentran en la sangre y el bazo. Ayudan a formar coágulos de sangre para hacer más lento o impedir el sangrado, y ayudan a cicatrizar las heridas. También se llama plaqueta.

1. RESUME

Introducción: Las enfermedades virales transmitidas por artrópodos, como dengue (DENV), chikungunya (CHIKV) y zika (ZIKV) se han convertido en una problemática creciente de salud pública en las últimas décadas. Su clasificación taxonómica hace referencia a un conjunto de diferentes familias y géneros de virus que comparten la característica de presentar RNA. El mosquito *Ae. aegypti* es uno de los vectores más eficientes para los arbovirus, la diseminación del virus está directamente relacionada con la distribución geográfica de sus vectores biológicos. Para hacer un diagnóstico por arbovirus es necesario hacer la detección del ácido nucleico viral mediante una prueba de RT-PCR dirigida región genómica 5', en muestras de sangre, orina o saliva del agente infeccioso, ya que la sintomatología es similar entre las 3 arbovirosis mencionadas. Para comprender la respuesta inmune de los arbovirus es necesario implementar metodologías que permitan su estudio. Lymphoprep™ es un medio de gradiente de densidad recomendado para el aislamiento de PBMC mediante la diferencia de densidad celular. Los biobancos permiten la colección de muestras biológicas y datos recolectados asociados con fines diagnósticos, terapéuticos o de investigación, convirtiéndose en plataformas tecnológicas esenciales para el desarrollo de la investigación biomédica. **Justificación:** Las arbovirosis se han convertido en un muy importante problema de salud pública, debido a su elevada incidencia y morbimortalidad. Las PBMC miden las funciones inmunológicas, por lo que es indispensable la creación de biobancos que cumplan con las condiciones óptimas para crio-preservar muestras biológicas de pacientes afectados con estas enfermedades y que reúnan muestras no solamente serológicas, sino que incluyan también células que puedan ser utilizadas para ensayos biológicos de respuesta a modelos de fármacos o vacunas. **Hipótesis:** Las PBMC pueden ser crio-preservadas por periodos largos de tiempo sin perder su viabilidad y capacidad funcional, implementando una metodología que permita su aislación, para ser utilizadas posteriormente en ensayos biológicos. **Objetivos:** Implementar una metodología que permita el aislamiento de PBMC con un alto nivel de viabilidad biológica para la creación de un biobanco de células de pacientes positivos al diagnóstico de infección por arbovirus, que cumpla estándares internacionales. **Métodos:** Se incluyeron 80 pacientes con síndrome febril sugerentes a zika, dengue o chikungunya, obteniendo muestra de sangre por punción venosa recolectada en tubos con EDTA, se realizó la técnica de separación celular, posteriormente se llevó a cabo la criopreservación y descongelación para obtener rendimiento y viabilidad celular. **Resultados:** De los 80 pacientes registrados, 38 fueron mujeres y 42 hombres, se analizaron las muestras por RT-PCR en tiempo real, obteniendo un total de 13 pruebas positivas a enfermedades virales. Se estandarizó la técnica de aislamiento de PBMC mediante el uso de Lymphoprep, para la implementación de un biobanco que cumpla con estándares internacionales, que permita la utilización de las muestras en estudios posteriores. **Conclusiones:** La técnica es reproducible en laboratorios que cuenten con la infraestructura adecuada, vigilando los altos parámetros de esterilidad y cuidando las condiciones que mantengan la viabilidad celular. Es necesario monitorear el proceso de criopreservación y vigilar la continuidad de la cadena de frío durante el traslado de las muestras. Esta técnica permite la realización de estudios posteriores, que involucren el estudio de la respuesta inmune del huésped frente a los distintos arbovirus mencionados en la presente investigación. **PALABRAS CLAVE:** Enfermedades virales, Arbovirosis, Zika, Dengue, Chikungunya.

2. ABSTRACT

Introduction: The viral diseases transmitted by arthropods, such as dengue (DENV), Chikungunya (CHIKV) and Zika (ZIKV) have become a growing problem of public health in recent decades. Its taxonomic classification refers to a group of different families and genera of viruses that share the characteristic of presenting RNA. The Mosquito *Ae. Aegypti* is one of the most efficient vectors for arbovirus, the spread of the virus is directly related to the geographic distribution of its biological vectors. To make a diagnosis by arbovirus it is necessary to make the detection of the viral nucleic acid by means of a test of RT-PCR directed Genomic Region 5', in samples of blood, urine or saliva of the infectious agent, since the symptomatology is similar between the 3 Arbovirosis mentioned. To understand the immune response of the arbovirus it is necessary to implement methodologies that allow their study. Lymphoprep™ is a recommended density gradient medium for PBMC isolation by cell density difference. Biobanks allow the collection of biological samples and collected data associated with diagnostic, therapeutic or research purposes, becoming essential technological platforms for the development of biomedical research. **Justification:** The arbovirosis have become a very important public health problem due to its high incidence and morbidity and mortality. The PBMC measure the immunological functions, so it is essential to create biobanks that meet the optimal conditions for cryo-preserving biological samples of patients affected with these diseases and that gather samples not only But also include cells that can be used for biological tests to respond to drug models or vaccines. **Hypothesis:** The PBMC can be cryo-preserved for long periods of time without losing its viability and functional capacity, implementing a methodology that allows its isolation, to be used later in biological tests. **Objectives:** To implement a methodology that allows the isolation of PBMC with a high level of biological viability for the creation of a biobank of patients cells positive to the diagnosis of infection by Arbovirus, which meets international standards. **Methods:** 80 patients with febrile syndrome suggestive of Zika, dengue or chikungunya were included, obtaining blood sample by venous puncture collected in EDTA tubes, the cellular separation technique was carried out, then the Cryopreservation and defrosting for cell performance and viability. **Results:** Of the 80 patients registered, 38 were women and 42 men, samples were analyzed by RT-PCR in real time, obtaining a total of 13 tests positive to viral diseases. The insulation technique of PBMC was standardized by means of the use of Lymphoprep, for the implementation of a biobank that complies with international standards, that allows the use of the samples in later studies. **Conclusions:** The technique is reproducible in laboratories that have adequate infrastructure, monitoring the high sterility parameters and taking care of the conditions that maintain cellular viability. It is necessary to monitor the cryopreservation process and monitor the continuity of the cold chain during the transfer of the samples. This technique allows the realization of subsequent studies, involving the study of the immune response of the host against the various arbovirus mentioned in the present investigation. **Keywords:** Viral diseases, arbovirus, Zika, Dengue, Chikungunya.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Importancia de las infecciones por arbovirus en el mundo y en México en los últimos años.

Desde hace algunas décadas de manera global se han presentado las denominadas enfermedades emergentes, tomando cada vez más una importancia debido a su manifestación creciente. (1)

Estas epidemias de enfermedades virales que son transmitidas por mosquitos están encontrándose de manera más frecuente y diversa, donde probablemente se trate sólo de las primeras etapas de una ola pandémica que continuará durante años. (2)

La aparición de estas enfermedades infecciosas y la transmisión entre los diversos países y regiones favorecen su propagación y desarrollo; la adaptación del virus, la susceptibilidad de los humanos a la infección, cambios climáticos, cambios en los ecosistemas, cambios demográficos, el comercio y turismo internacional, así como la carencia de recurso hacia las organizaciones de salud en los países, sobre todo en los que están en vías de desarrollo. (3)

Los arbovirus son un grupo taxonómicamente heterogéneo que cuenta con más de 500 virus; dónde se cuenta con una estimación de 150 que causan enfermedad en el hombre. (4)

Las enfermedades virales transmitidas por artrópodos, como dengue (DENV) y chikungunya (CHIKV) se han convertido en una problemática creciente de salud pública en las últimas cinco décadas. Actualmente, alrededor de la mitad de la población mundial corre el riesgo de contraer el dengue, mientras que los brotes de chikungunya, que anteriormente estaban limitados a África y Asia, han sido recientemente reportados en el Caribe, América del Sur y Europa, mostrando así su amplia distribución global.(5)

El dengue es la enfermedad viral transmitida por mosquito de más rápida propagación en el mundo. Su incidencia ha aumentado 30 veces con la creciente expansión geográfica hacia nuevos países y, durante los últimos diez años, ha pasado de áreas urbanas a rurales. (6)

Dengue (DENV), entró sigilosamente por décadas; siguiendo chikungunya (CHIKV), surgiendo en 2013. Su reemergencia explosiva pandémica actual muestra, un patrón análogo cuando chikungunya (CHIKV) se propagó pandémicamente de oeste a este, y zika (ZIKV) más tarde lo siguió circulando por todo el mundo. La infección explosiva por el virus de zika (ZIKV) que ocurrió en América del Sur, Centroamérica y el Caribe en el año 2016 es la más reciente de las enfermedades

virales transmitidas por artrópodos en el hemisferio occidental en los últimos 20 años. (7)



Figura 1: Países con evidencia de la transmisión del virus Zika (a diciembre de 2015). Las zonas delimitadas, todas con casos adquiridos localmente o aislamiento del virus, incluyen Cabo Verde, Islas Cook, Isla de Pascua, Estados Federados de Micronesia, Polinesia Francesa, Martinica, Nueva Caledonia, Puerto Rico, Islas Salomón y Vanuatu. Los datos provienen de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. (7)

Desde enero de 2012, el Pacífico está experimentando una alta carga de enfermedades transmitidas por mosquitos debido a las epidemias concurrentes de dengue (DENV), chikungunya (CHIKV) y las infecciones por el virus zika (ZIKV). Hasta la fecha, se ha informado que más de 120.000 personas han sido afectadas por estas enfermedades virales, cifra que es probable que subestimen las cifras reales debido a la falta de notificación. (2)

3.2 EPIDEMIOLOGÍA

El virus por dengue (DENV) es una de las enfermedades reemergentes más importantes del mundo actual, reportando entre 50 y 100 millones de casos anuales en más de 100 países. Causa alrededor de 24 mil defunciones al año, gran parte en niños. (4)

Un aproximado de 2,5 mil millones de personas viven en países con dengue endémico. Unos 1.800 millones de personas, más del 70% de la población en riesgo de dengue a escala mundial, viven en la región de Asia Suroriental y en la región del Pacífico occidental, las cuales aportan cerca del 75% de la actual carga mundial de la enfermedad debidas al dengue. (6)

El patrón epidémico del dengue en la región del Pacífico se ha presentado de forma esporádicas y distintos lapsos de tiempos durante su circulación. En 2012, existieron brotes de los cuatro serotipos de DENV por primera vez durante un año, DENV-1 fue el serotipo dominante en 2012 y comienza 2013, causando el mayor brote de dengue documentado jamás en Nueva Caledonia, con 10.978 casos confirmados y 5 defunciones de septiembre de 2012 a septiembre de 2013. Después de haber estado ausente en la región durante 18 años, el DENV-3 tiene después de la reintroducción en 2012, convertirse en el DENV dominante en la región con cinco brotes en curso, uno de ellos en Fiji, con 25.300 casos sospechosos y 15 muertes. (2)

Hay evidencias de un 5° serotipo durante un brote en Malasia en el año 2007. De esta nueva variante aún no se ha establecido como tal en el ciclo de transmisión humana y se piensa que sea una forma selvática. (4)

Otra epidemia viral es la que causa una importante enfermedad viral reemergente es Chikungunya (CHIKV), este virus fue identificado inicialmente en el sudeste Tanzania en 1953, esta dolencia es endémica de África y oriunda del África Subsahariana, desde esa época pasaron pequeños brotes como el reportado en el pacífico por primera vez minuciosamente controlado en 2011 en Nueva Caledonia y luego llegó a Asia y la India, y finalmente el 2013 llega a América, produciendo una gran epidemia. (1)(2)

Las epidemias de CHIKV muestran una presentación cíclica, con períodos interepidémicos que oscilan entre 4 y 30 años. Desde su resurgimiento en 2004, el CHIKV ha expandido su distribución geográfica mundial en casi 40 países, provocando epidemias sostenidas de magnitud sin precedentes en Asia y África. En 2013 se reportaron los casos por infección CHIKV en el hemisferio oeste. (8)

En solo nueve meses, CHIKV se ha extendido a 22 países en el Caribe, Centro y Sudamérica, lo que resulta en cientos de miles de casos. Para el 18 de julio de 2014, CHIKV había causado más de 440,000 casos en más de 20 países en el Caribe y Centro y Sudamérica. Además, el CDC ha informado de más de 230 casos importados de CHIKV en Estados Unidos, así como los casos adquiridos localmente en Florida. En menos de 10 años, CHIKV se ha extendido desde la costa de Kenia a través del Océano Índico, el Pacífico y regiones del Caribe, causando millones de casos de enfermedades en más de 50 países. Mostrando que el virus CHIKV ha vuelto a surgir como un verdadero patógeno global. (12)

Los brotes de virus del chikungunya han ocurrido al sur de los Estados Unidos desde 1827, se estima que muchos de los brotes de “dengue” registrados antes de la era de técnicas confirmatorias de laboratorio, representan en realidad casos mal identificados de virus del chikungunya.(4)

Tras el primer brote documentado de zika (ZIKV) del Pacífico en 2007, el linaje asiático del virus reapareció en Polinesia Francesa en octubre de 2013 y desde entonces ha causado grandes brotes en Nueva Caledonia (1.400 casos confirmados), Islas Cook (más de 900 casos). En la Polinesia Francesa, la extrapolación de los 8.746 casos sospechosos notificados por la red de vigilancia centinela permite inferir que más de 30.000 consultas médicas se debieron a la propagación del virus zika en todo el archipiélago. Entre noviembre de 2013 y febrero de 2014, el aumento de la incidencia de complicaciones neurológicas, incluyendo 42 casos de síndrome de Guillain-Barré. (2)

Hasta el 1 de diciembre de 2015 fueron 9 los países que han confirmado circulación autóctona de virus zika (ZIKV): Brasil, Chile, Colombia, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Paraguay, y Venezuela. Zika virus fue identificado por primera vez en las Américas en marzo de 2015, cuando se había reportado un brote sospechoso de casos de virus por zika en ese país. En marzo de 2016, el virus se había propagado a por lo menos 33 países y territorios en las Américas.(9)

A partir de la detección de la infección en seres humanos, en poco tiempo durante el 2015 se ha diseminado de manera importante en gran parte de América produciendo una gran alarma mundial, del 1 de enero de 2007 al 9 de marzo de 2016, un total de 52 países y territorios han informado de la transmisión autóctona de la transmisión del virus Zika. (10)

3.2.1 Prevalencia en México y Michoacán

Las Enfermedades Transmitidas por Vector (ETV), en México representan un importante y creciente problema de salud pública. Se estima que cerca de 60% del territorio nacional en donde residen más de 50 millones de personas, presenta condiciones que favorecen la transmisión de las ETV. (11)

A continuación, se muestran las incidencias de las enfermedades virales antes mencionadas, de acuerdo con su orden de aparición hasta los brotes actuales, así como los casos reportados por la Organización Panamericana de la Salud (OPS), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Programa de Epidemiología de la Secretaría de Salud en México.

3.2.1.1 Dengue (DENV)

El DENV es el Flavivirus de mayor impacto en la salud pública mundial y actualmente el dengue es la enfermedad viral transmitida por artrópodos más importante del planeta, causante de una alta morbilidad y mortalidad en los países tropicales y subtropicales.(12) (18)

Durante el período 2001–2007, se reportaron 545.049 casos, que representa el 12,5% de dengue en las Américas, con 35.746 casos de fiebre hemorrágica por dengue (DHF) y 209 muertes. Nicaragua tuvo 64 muertes (31%), seguido de Honduras con 52 (25%) y México con 29 (14%). En Costa Rica, Honduras y México se presentó la mayor cantidad de casos en este período. Los serotipos más frecuentes fueron DEN-1, DEN-2 y DEN-3. (6)

De los casos reportados como positivos a dengue una alta tasa progresa a dengue grave, anualmente. Los casos de fiebre del dengue (DF) pueden convertirse en dengue severo, dengue hemorrágico (DHF) o síndrome de choque del dengue (DSS), que puede conducir a resultados adversos incluyendo muerte, especialmente en niños menores a los 15 años. (9) (19)

Se estima una tasa de infección de 50-100 millones de personas infectadas alrededor del mundo, de los cuales, unos 500 mil casos progresan a dengue grave, anualmente. Si bien el dengue afecta a individuos en cualquier rango de edad, es una de las causas principales de hospitalización en niños bajo 15 años de edad.(12)

De acuerdo con el programa nacional de epidemiología; de la primera semana de 2015 hasta el 11 de enero de 2016, se registraron 26,665 casos totales de dengue, incluyendo los casos por fiebre hemorrágica, con 42 muertes por el virus, mostrando un aumento en las defunciones en los últimos años. (13)

Siguiendo los datos actuales epidemiológicos de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) los casos registrados por dengue (DENV-1,2,3,4) en México son 44,897; provocando 17 defunciones hasta el 06 de octubre de 2017, correspondiente a la semana epidemiológica 38. (14)

 Number of Reported Cases of Dengue Fever in the Americas, by Country or Territory 2017 (to week noted) Cumulative cases Epidemiological Week / EW 38 (Updated as of October 6, 2017)								Summary by Subregion			
								Dengue D	Severe D	Deaths	
								North America	153	0	0
								Central America	118,188	355	28
								Andean	117,582	559	129
								Southern Cone	220,731	184	88
								Hispanic Caribbean	1,210	59	1
								Caribbean	2,719	0	0
Country or Subregion	Epidemiological week ^a	Total of dengue cases ^b	Incidence rate ^c	Confirmed	Incidence rate ^d	Serotype	Severe dengue ^e	Deaths	Population X 1000	(SD/D) x100 ^f	CFR ^g
North America											
Canada	38	0	0.00	0	0		0	0	0	0	0.00
United States of America ^h	38	153	0.05	153	0.05	DEN	0	0	325,128	0	0.00
<i>Subtotal</i>		153	0.05	153			0	0	325,128		0.00
Central America and Mexico											
Belize	38	2,626	754.60	18	5.17	DEN	2	0	348	0.08	0.00
Costa Rica	34	4,254	85.05	0	0.00	DEN 1,2	0	0	5,002	0.00	0.00
El Salvador	38	3,112	49.82	154	2.47	DEN 2	2	0	6,246	0.06	0.00
Guatemala	37	2,803	17.24	658	4.05	DEN 1,2,3,4	30	9	16,255	1.07	0.32
Honduras	38	4,448	51.00	0	0.00	DEN 1,2,3	82	0	8,721	1.84	0.00
Mexico ⁱ	38	44,897	35.85	6,928	5.53	DEN 1,2,3	227	17	125,238	0.51	0.04
Nicaragua	37	50,508	807.22	1,888	30.17	DEN 2	0	2	6,257	0.00	0.00
Panama	37	5,540	138.92	2,539	63.67	DEN 1,2	12	0	3,988	0.22	0.00

Tabla 1: Número de casos notificados de la semana 38-2017 por fiebre de dengue en las Américas, por país o territorio 2017. OPS/OMS (14)

3.2.1.2 Chikungunya (CHIKV)

A partir de la confirmación por transmisión autóctona del virus chikungunya (CHIKV) en América durante diciembre de 2013, se ha documentado transmisión autóctona en 33 países (incluyendo 3 países de Centroamérica). El número de casos notificados hasta la semana epidemiológica (SE) 35 de 2014 a la Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS) asciende a 659.367, incluyendo 37 defunciones. El segundo semestre del año suele caracterizarse por un aumento estacional de la transmisión de la fiebre por dengue en Centroamérica, México y el Caribe. (15)

Actualmente, los datos epidemiológicos nos muestran que hasta la semana 38 del 2017, los casos confirmados por chikungunya (CHIKV) fueron 25, de los cuales no se muestran reportes de muertes. Sin embargo, debe mantenerse una vigilancia epidemiológica para evitar nuevos brotes por estas enfermedades arbovirales.

							
Número de casos reportados de chikungunya en países o territorios de las Américas 2017 (por semanas) Casos acumulados Semana Epidemiológica / SE 40 (actualizada al 06 de Octubre de 2017)							
País/Territorio	Semana Epidemiológica ^a	Casos de transmisión autóctona ^b		Casos importados	Tasa de incidencia ^c	Fallecidos ^d	Población ^e X 1000
		Sospechosos	Confirmados				
América del Norte							
Bermuda	Semana				0.00		71
Canadá	Semana						36,626
México	Semana 38		25	0	0.02	0	130,223
Estados Unidos de América ^f	Semana 39			55	0	0	326,474
	<i>Subtotal</i>	0	25	55	0.01	0	493,394

Tabla 2: Número de casos reportados de chikungunya en países o territorios de las Américas 2017. (16)

3.2.1.3 Zika (ZIKV)

En México, en octubre de 2015 fue identificado el primer caso autóctono de infección por virus Zika que corresponde a masculino de 22 años residente de la ciudad de Monterrey, Nuevo León. Inició cuadro clínico el 19 de octubre caracterizado por presencia de fiebre, exantema y conjuntivitis no purulenta. Un segundo caso fue identificado por el sistema de vigilancia y corresponde a C.S.C.E., masculino de 48 años, residente de Huixtla, Chiapas. Las muestras de ambos casos fueron procesadas por el InDRE y resultaron positivas a virus Zika. (10)

En México se observó un aumento de casos confirmados desde la Semana Epidemiológica 16 a la Semana Epidemiológica 27 de 2017, comportamiento similar a lo observado con dengue en el mismo periodo en el país. El 51% de los casos confirmados de Zika en las primeras 32 semanas de 2017 correspondieron a los estados de Nayarit (171 casos), Tamaulipas (146 casos) y San Luis Potosí (123 casos) y en estos estados el número de casos confirmados fue superior a lo notificado en 2015-2016. (17)

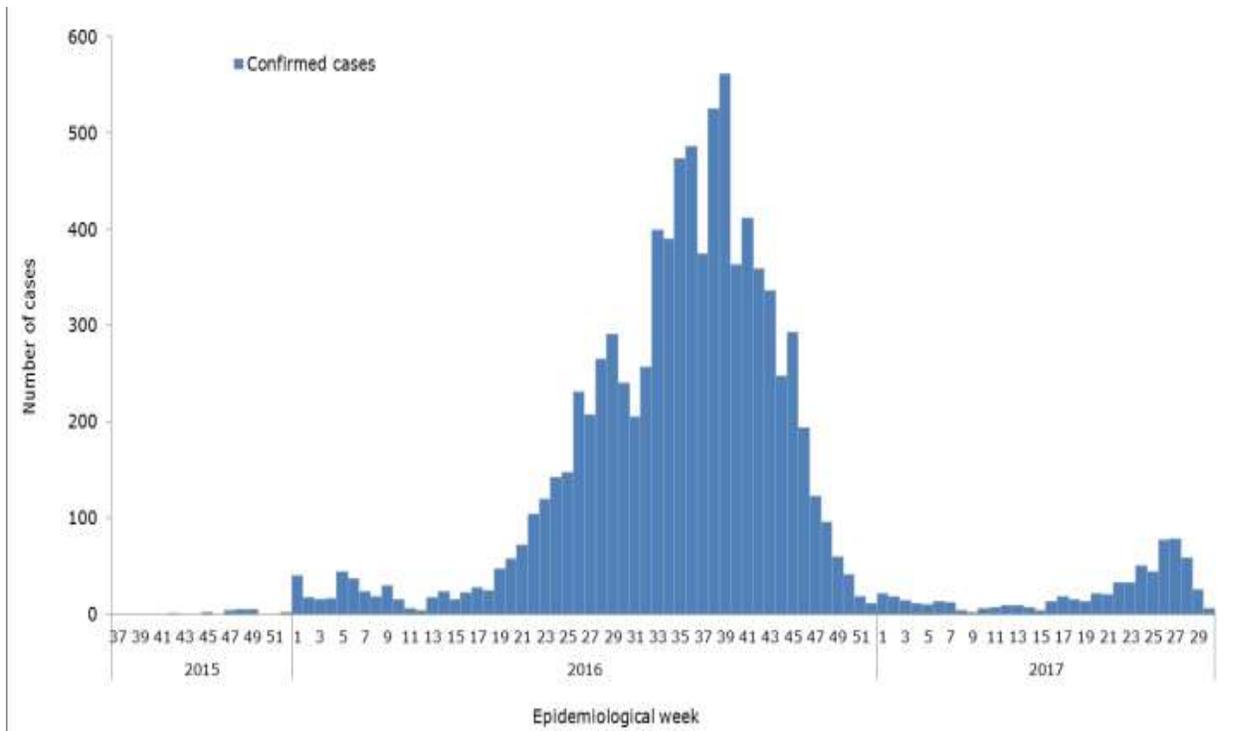


Figura 2: Casos confirmados por zika (ZIKV) de la semana 37-2015 a la semana 30 de 2017. Datos suministrados por la Secretaría de Salud de México y reproducidos por la OPS/OMS América Central. (17)

A continuación, se muestran tablas comparativas entre las tres enfermedades transmitidas por artrópodos, de acuerdo con los casos por entidad federativa correspondiente a la semana 26 del 2017, por la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud. Resaltando la prevalencia en México y prioritariamente en Michoacán.

ENTIDAD FEDERATIVA	²Dengue no Grave CIE-10ª Rev. A90			³Dengue con Signos de Alarma CIE-10ª Rev. S/C			³Dengue Grave CIE-10ª Rev. A91			
	2017			2016	2017			2017		
	Confirmados			Confirmados Acum.	Confirmados			Confirmados		
	Sem.	Acum.			Sem.	Acum.		Sem.	Acum.	
	M	F		M	F	Sem.	M	F		
Aguascalientes	-	3	-	-	-	-	-	-	-	
Baja California	-	2	3	3	-	-	-	-	-	
Baja California Sur	4	4	7	59	-	-	-	1	1	
Campeche	-	1	4	51	-	2	2	-	-	
Coahuila	-	4	6	72	-	-	2	-	-	
Colima	-	9	21	195	-	2	1	-	2	
Chiapas	16	124	187	500	24	220	243	2	16	12
Chihuahua	-	-	-	1	-	-	-	-	-	
Ciudad de México	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Durango	20	8	21	117	-	-	-	-	-	
Guanajuato	204	381	510	5	23	9	25	2	1	1
Guerrero	3	67	91	1 108	6	38	33	3	22	30
Hidalgo	36	64	90	45	-	2	-	-	-	-
Jalisco	30	157	190	629	1	15	20	2	2	4
México	10	103	110	267	2	4	2	-	-	1
Michoacán	26	55	106	661	1	4	7	-	3	1
Morelos	1	23	26	82	9	46	52	1	4	3
Nayarit	-	26	39	127	-	7	6	-	3	3
Nuevo León	86	184	338	498	30	30	40	3	4	10
Oaxaca	8	10	29	133	1	2	3	-	1	4
Puebla	23	67	131	97	1	6	7	-	2	2
Querétaro	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-
Quintana Roo	-	39	39	134	-	12	11	1	1	3
San Luis Potosí	2	36	40	105	-	-	-	-	-	-
Sinaloa	6	18	37	104	-	3	1	-	1	-
Sonora	1	28	33	95	-	2	2	-	2	3
Tabasco	-	18	32	304	2	8	12	1	4	5
Tamaulipas	17	122	196	322	-	6	7	1	1	9
Tlaxcala	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Veracruz	63	210	306	1 067	13	59	64	5	19	15
Yucatán	3	31	34	98	-	11	11	-	3	1
Zacatecas	-	-	-	15	-	-	-	-	-	-
TOTAL	560	1 794	2 627	6 894	113	488	551	21	90	110

8FUENTE: SINAVE/DGE/Salud 2017. Información preliminar de casos confirmados.

Tabla 3: Boletín Epidemiológico. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Sistema Único de Información. Dirección General de Epidemiología. Vigilancia Epidemiológica Semana 36, 2017. (18)

ENTIDAD FEDERATIVA	³Enfermedad por Virus Chikungunya CIE-10ª REV. A92.0				³Fiebre del Oeste del Nilo CIE-10ª REV. A92.3			³Infección por Virus Zika CIE-10ª REV. U06.9			
	2017		2016	2017			2017		2016		
	Sem.	Acum.		Acum.	Sem.	Acum.		Sem.	Acum.		Confirmados Acum.
		M	F			M	F		M	F	
Aguascalientes	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
Baja California	-	-	-	-	-	-	-	1	2	-	
Baja California Sur	-	-	2	32	-	-	-	1	1	-	
Campeche	-	-	-	22	-	-	-	-	1	27	
Coahuila	-	-	-	1	-	-	-	12	4	12	2
Colima	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	106
Chiapas	-	1	1	7	-	-	-	-	-	4	539
Chihuahua	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ciudad de México	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Durango	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Guanajuato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Guerrero	-	2	2	32	-	-	-	-	4	13	671
Hidalgo	-	-	-	1	-	-	-	9	15	30	39
Jalisco	-	1	1	10	-	-	-	9	14	66	13
México	-	-	-	2	-	-	-	-	8	4	-
Michoacán	-	-	1	8	-	-	-	-	-	4	25
Morelos	-	2	2	6	-	-	-	7	9	130	51
Nayarit	-	-	-	45	-	-	-	27	44	187	6
Nuevo León	-	-	-	3	-	-	-	7	-	39	7
Oaxaca	-	-	-	5	-	-	-	-	2	2	432
Puebla	-	-	-	1	-	-	-	1	13	66	5
Querétaro	-	-	-	-	-	-	-	7	2	10	-
Quintana Roo	-	-	1	20	-	-	-	-	1	5	104
San Luis Potosí	-	-	-	3	-	-	-	23	10	196	5
Sinaloa	-	1	1	28	-	-	-	-	4	4	1
Sonora	-	-	-	10	-	-	-	2	-	5	-
Tabasco	-	-	-	6	-	-	-	-	2	8	128
Tamaulipas	-	-	3	73	-	-	-	24	3	313	16
Tlaxcala	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Veracruz	-	-	3	139	-	-	-	2	5	23	716
Yucatán	-	-	-	11	-	-	-	-	3	12	106
Zacatecas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TOTAL	-	7	17	469	-	-	-	131	145	1 137	3 000

§FUENTE: SINAVE/DGE/Salud 2017. Información preliminar de casos confirmados.

Tabla 4: Boletín Epidemiológico. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Sistema Único de Información. Dirección General de Epidemiología. Vigilancia Epidemiológica Semana 36, 2017. (18)

Aún con la disminución de los casos confirmados por arbovirus, el aumento de la distribución y la intensidad de la transmisión se agrava por la falta de antivirales o vacunas comercialmente disponibles para contrarrestar dichas enfermedades transmitidas por artrópodos. (5)

Lamentablemente hasta la fecha no existe ninguna terapia antiviral ni vacuna alguna, por ello lo único que queda es controlar al mosquito trasmisor, el Aedes aegypti, dado que es este el principal vector del zika. (1)

Para responder, se requiere una pronta investigación sobre estos virus y los determinantes ecológicos, entomológicos y del constante mantenimiento ante esta emergencia viral. Así como mejorar las estrategias de salud pública para controlar la propagación de arbovirus, incluyendo plataformas de vacunas para flavivirus, alfavirus y otros grupos de arbovirus que pueden ser modificados rápidamente para expresar antígenos inmunogénicos de virus recién emergentes.(7)

Con más de la mitad de la población mundial viviendo en áreas infestadas con estos mosquitos, el potencial de las grandes epidemias urbanas de ZIKV, DENV, CHIKV, que pueden surgir es abrumador, y subraya la necesidad desesperada de desarrollar un control más eficaz de los mosquitos, así como vacunas y medicamentos. El futuro de ZIKV es impredecible, pero la difusión mundial de DENV y CHIKV, estrechamente ligada a las tendencias de la urbanización y la globalización. (28)

Se debe promover el interés por los programas de vigilancia, prevención y control de las ETV entre las instituciones de investigación nacionales, tanto públicas del sector, como universidades e instituciones de educación superior que lleven a cabo investigación básica y aplicada (operativa), que eventualmente sirva para optimizar y hacer sustentable el uso de los recursos en el diseño de estrategias basadas en evidencia, en sus aspectos epidemiológicos, entomológicos, así como en aspectos operativos, administrativos y socioeconómicos, con particular énfasis en los factores de riesgo, la implementación de métodos más costo eficientes de control y su evaluación para hacer frente ante estas enfermedades virales emergentes.(19)

3.3 ARBOVIRUS

Los arbovirus son, como lo describió la Organización Mundial de la Salud; virus que están presentes en la naturaleza principalmente, gracias a la transmisión biológica entre huéspedes vertebrados susceptibles por artrópodos hematófagos; deriva su nombre del inglés “Arthropod-Borne Viruses” o “Virus llevados (transmitidos) por artrópodos” (11)

Su clasificación taxonómica hace referencia a un conjunto de diferentes familias y géneros de virus que comparten la característica de ser transmitidos por artrópodos (géneros Flavivirus y Alfavirus). Los Arbovirus se caracterizan por presentar RNA, que puede ser bicatenario como en Reoviridae o monocatenario positivo como los de la familia Togaviridae y Flaviviridae. (20)

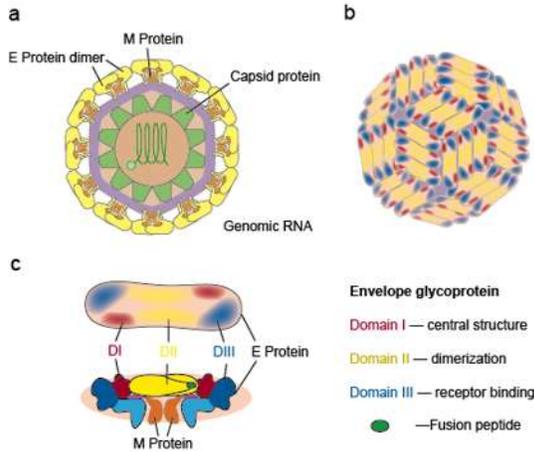


Figura 3: En este esquema se muestran las familias pertenecientes al grupo de los arbovirus y la enfermedad a la que se encuentran asociados. Rev Med Inst Mex Seguro Soc 2006;44(4):347-353.

Por microscopía electrónica se ha observado que algunos arbovirus poseen en sus membranas, proyecciones regulares y una disposición regular de los capsómeros. En general la simetría es muy divergente en este grupo de virus dada su naturaleza heterogénea, algunos presentan simetría cubica, helicoidal o en forma de bastoncillos. Presentan una envoltura lipídica recubriendo la cápside. Su tamaño es variado, dado que este grupo de arbovirus está formado por distintas familias. (20)

3.3.1 ESTRUCTURA DE LOS ARBOVIRUS

3.3.1.1 DENGUE



El origen del término proviene de lengua swahili que describe la enfermedad con la palabra "dinga", del castellano "dengue", que trata de describir las molestias del paciente por las artralgias. (19)

La enfermedad fue identificada y nombrada como tal en 1779. Se originó de un virus de primate no humano hace casi 1,000 años en el continente africano o asiático y la transmisión al hombre ocurrió en un período entre 320 a 125 años. (21)

Figura 4: Estructura del virus dengue (DENV), proteínas estructurales, genoma, dominios de la envoltura.

El virus del dengue (DEN) es un virus de ARN, pequeño monocatenario de polaridad positiva [ssRNA(+)], perteneciente al

género *Flavivirus*, de la familia *Flaviviridae*, abarcando cuatro distintos serotipos (DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4). (22)

Estos serotipos del dengue están estrechamente relacionados mostrando una homología genética de aproximadamente un 70%, lo que destaca la extensa variabilidad genética de los serotipos del dengue que codifican múltiples copias para tres proteínas estructurales (C, prM, E) y siete no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) involucradas en la replicación del ARN, el ensamblaje del virus y la modulación de la respuesta inmune de la célula hospedera; la partícula madura del virus de dengue es esférica, con un diámetro de 50 nm, una membrana de doble capa derivada del huésped. El genoma como ya se mencionó está hendido por proteasas virales. (6)

Son múltiples monómeros de proteína C que encapsidan el ARN viral para formar la nucleocápsida la que está rodeada por una bicapa lipídica de origen celular donde se encuentran ancladas las proteínas M (matriz) y E (envoltura). La proteína E es de especial importancia para el reconocimiento y unión a los receptores que median la entrada del virus a la célula blanco, por endocitosis mediada por receptor; así inicia su ciclo de replicación. Hasta el momento se ha determinado que varios tipos de moléculas actúan como receptores; siendo DC-SIGN (dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbin non-integrin), un receptor tipo lectina altamente expresado en células presentadoras de antígeno, el receptor mejor caracterizado. (12)

3.3.1.2 CHIKUNGUNYA

El nombre chikungunya deriva de una palabra en Makonde, al sudeste de Tanzania, y significa a grandes rasgos "hombre encorvado" y describe la postura inclinada de quienes padecen esta afectación y dolorosa artralgia. También puede traducirse como "enfermedad que dobla las articulaciones" (4)

El virus de Chikungunya (CHIKV), se aisló primero de la sangre de un individuo febril en Tanzania en 1953 durante un gran brote de enfermedad caracterizado por dolores paralizantes y fiebre severa, localmente conocida como chikungunya; circulando en África y el sudoeste asiático periódicamente. (1).

En 1958, CHIKV fue aislado de los pacientes en Bangkok, Tailandia, donde aparentemente se había diseminado desde África. (2)

La familia Togaviridae incluye los géneros Alphavirus, compuesto de 30 especies. El genoma se caracteriza por presentar ARN monocatenario de sentido positivo de ~12 kb de longitud aproximadamente, su morfología esférica; con un tamaño de 50 a 70 nm de diámetro, incluyendo la membrana lipídica con sus proyecciones polipeptídicas, generalmente glucosiladas. Los miembros del género Alphavirus pueden producir la enfermedad viral conocida como chikungunya (CHIKV). (20)

Contiene dos marcos de lectura abiertos (ORF), una estructura de 50 capuchones y una cola de poli 30' A. Un ORF codifica las proteínas no estructurales (NS), y otro ORF codifica las proteínas estructurales virales: la proteína de la cápside y las glicoproteínas con E1, E2, E3 y 6k. E1 y E2 llevan los principales determinantes antigénicos y forman una concha icosaédrica en la superficie del virión. Se sabe que la glicoproteína CHIKV es responsable para la unión viral, la unión del receptor, que lleva importantes determinantes de virulencia y entrada de células diana. (23)

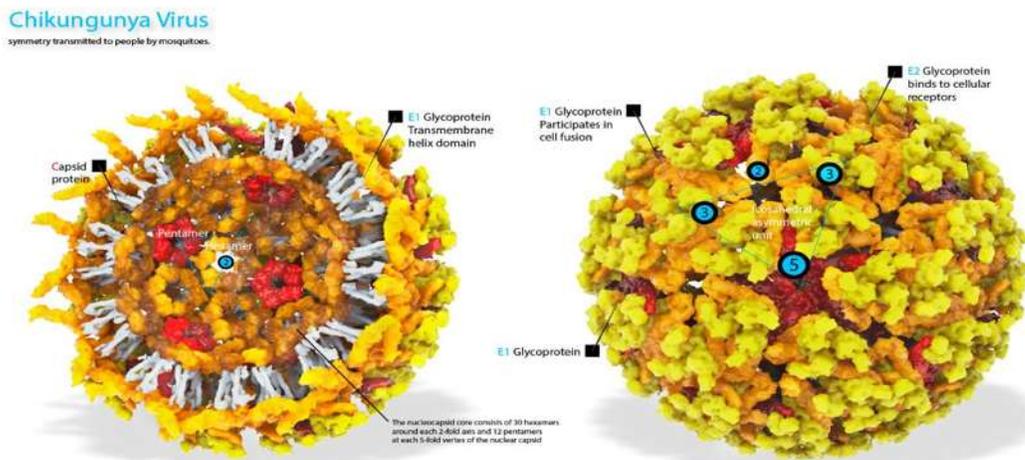


Figura 5: Estructura de Virus CHIKV/Visual life sciences.

3.3.1.3 ZIKA (ZIKV)

Tiene su origen en África; El virus se aisló por primera vez en 1947 en los bosques de Zika (Uganda), en un mono Rhesus, de ahí la derivación del nombre. Aunque la infección en seres humanos se demostró por estudios serológicos en 1952 en Uganda y Tanzania, hasta 1968 se logró aislar el virus a partir de muestras humanas en Nigeria. (8)

Pertenece a la Familia Flavoviridae caracterizada por integrar ARN monocatenario positivo, son virus que se encuentran envueltos en una membrana lipídica y con forma esférica. Se han logrado identificar dos linajes principales: el asiático y el africano. (4)

El género más importante es el Flavivirus, que comprende aproximadamente 70 especies de virus, de los cuales 30 se encuentran en el sur, sureste y oriente de Asia, y también cerca de Australia. Estos virus son los principales agentes patógenos de enfermedades como zika (ZIKV) y dengue (DENV). (16)

Las cepas encontradas en América, que han sido examinado hasta la fecha son genéticamente muy similares entre sí, con aproximadamente encontrándose un 99% de homología de nucleótidos. Existiendo una fuerte conservación entre todas las cepas del virus zika (ZIKV) en general, con menos del 12% de divergencia a nivel de nucleótidos. (7)

Lo que se representa para los ensayos diagnósticos, basados en secuencias precisas y epítomos, así como para el desarrollo de terapias y vacunas. Los datos de similitud actuales sugieren que cualquier producto de vacuna desarrollado contra cualquier cepa del virus zika debería ser protector contra todas las cepas. (7)

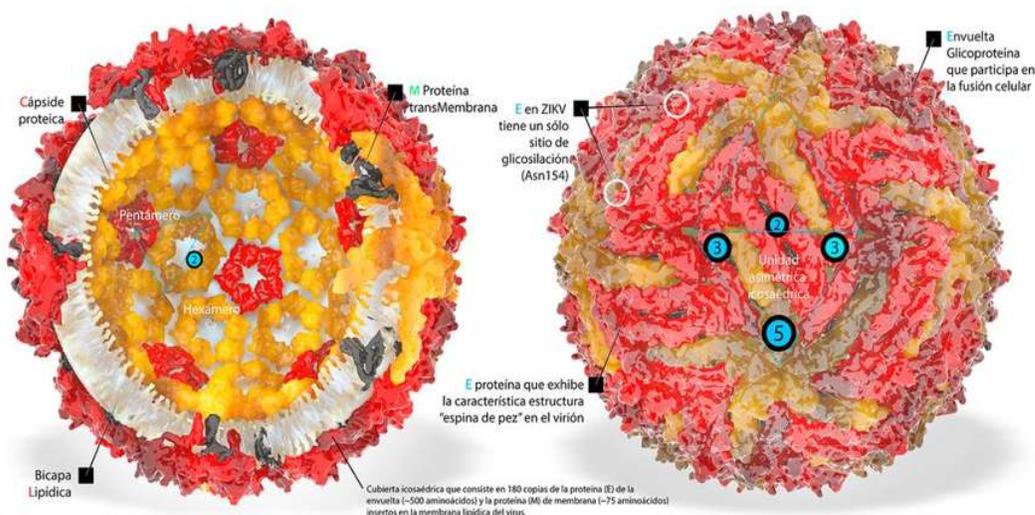


Figura 6: Estructura del virus zika (ZIKV), donde se muestran la cápside proteica, la bicapa lipídica, así como sus proteínas de membrana. /Imagen tomada de Visual life sciences.

3.3.2 VECTORES

Los arbovirus pueden ser transmitidos por una gran variedad de vectores entre los que destacan mosquitos, garrapatas, pulgas, entre otros. Siendo de gran importancia aquellos que por su distribución global tienden a provocar una diseminación mayor de las enfermedades; como es el caso del mosquito. (4)

La expansión global de estos arbovirus fue precedida por la propagación global de sus vectores. La competencia vectorial (VC) para un arbovirus se ve afectada por factores y mecanismos intrínsecos (genéticos) que controlan la capacidad de un mosquito vector para adquirir, mantener y transmitir un arbovirus. Los vectores compartidos del virus se transmiten por los mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, por lo que comprender al vector es un elemento esencial para comprender la enfermedad. (24) (5)

Los arbovirus que recientemente alcanzaron el hemisferio occidental han sido transmitidos por los mosquitos *Aedes*. (7) Siendo el mosquito *Ae. aegypti* es uno de los vectores más eficientes para los arbovirus, debido a que es muy antropofílico, frecuentemente pica varias veces antes de completar la oogénesis y prolifera en estrecha proximidad a los seres humanos. (6)

De todas las especies de mosquitos conocidos con importancia en salud pública, *Aedes aegypti* Linnaeus, es considerada la más peligrosa por tener la capacidad de transmitir el mayor número de enfermedades arbovirales al hombre. (25)

El *Ae. aegypti* es uno de los vectores más eficientes para los arbovirus, debido a que es muy antropofílico, frecuentemente pica varias veces antes de completar la oogénesis y prolifera en estrecha proximidad a los seres humanos. Varios factores pueden influir en la dinámica de la transmisión del virus, incluidos factores ambientales y climáticos, interacciones entre huéspedes y patógenos, y factores inmunológicos de la población. El clima influye directamente en la biología de los vectores y, por esa razón, su abundancia y distribución. (6)

La diseminación del virus está directamente relacionada con la distribución geográfica de sus vectores biológicos, principalmente mosquitos hembra de las especies *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, siendo el primero, el de mayor distribución en zonas endémicas alrededor del mundo. Por su parte, *A. Albopictus* es un vector secundario implicado en la propagación del virus dentro del continente asiático y algunas regiones de Europa, lo cual conlleva a un aumento de la tasa de incidencia de la infección. (12)

Los vectores evolucionaron junto con los mismos Arbovirus, este proceso los desarrolló como hematófagos y les dio la oportunidad de convivir con huéspedes vertebrados. Los arbovirus evolucionan y se adaptan continuamente a nichos ecológicos cada vez más perturbados por los seres humanos. (18)

Los arbovirus a menudo causan enfermedades devastadoras en los huéspedes vertebrados, pero generalmente no causan una patología significativa en sus vectores artrópodos. Hay considerable especificidad en la relación vector-arbovirus, y parte de esta especificidad proviene de la capacidad de un arbovirus en particular para superar las barreras tisulares en el vector para establecer una infección persistente. (26)

3.3.2.1 *Aedes aegypti*.

Aedes aegypti, este mosquito es una especie tropical y subtropical ampliamente distribuida alrededor del mundo, en más de 150 países. Diseminándose tanto en áreas urbanas como rurales, donde circulan múltiples serotipos de virus, siendo el vector de dengue, chikungunya, zika. (1)(5)

Los huevos son capaces de resistir desecación y temperaturas extremas con sobrevivida de 7 meses a un año, la mayor parte es de eclosión rápida, mientras un porcentaje reducido, constituyen los llamados huevos resistentes, inactivos o residuales, capaces de sobrevivir durante periodos prolongado de tiempo; las larvas se desarrollan entre 25°C a 29°C, en un promedio de 5 a 7 días. (1)

El mosquito es incapaz de resistir temperaturas < 10°C, o superiores a 44°C a 46°C. Entre 28°C a 32°C se transforma en adulto en 1 a 3 días, por lo tanto, cada 10 días se tiene una nueva generación de adultos. (1)

Pueden encontrarse hasta 45° latitud norte y 35° latitud sur, aunque estos límites geográficos corresponden, aproximadamente, a un invierno isotérmico de 10 °C, dichas invasiones han ocurrido durante los meses más calientes y los mosquitos no han sobrevivido los inviernos. Además, debido a las bajas temperaturas, el *Ae. aegypti* es relativamente raro por arriba de los 1.000 metros sobre el nivel del mar. (5)

Las etapas inmaduras se encuentran en hábitats cubiertos de agua, principalmente en recipientes artificiales estrechamente asociados con viviendas humanas y, a menudo, bajo techo. Los estudios sugieren que la mayoría de las hembras de *Ae. aegypti* pasan su período de vida en las casas o alrededor de ellas donde emergen como adultos. Demostrando que las personas, y no los mosquitos, trasladan rápidamente el virus. (5)



Figura 7: Mosquito, *Aedes aegypti*.

El mosquito pica principalmente durante el día, en espacios interiores como en exteriores, son más activos durante las dos primeras horas (amanecer) y varias horas antes del atardecer, pero pueden picar de noche en zonas bien iluminadas, puede picar a la gente sin que den cuenta y pica varias personas de una misma casa. (1)

Los machos se diferencian de las hembras por ser más pequeños y por tener antenas más plumosas. Hembra y macho liban néctar u otros carbohidratos de cualquier fuente accesible, sólo la hembra se alimenta de sangre, que le es necesaria para la maduración de los ovocitos, y aumentar la viabilidad de los huevos. (25)

Las hembras de este vector también exhiben el comportamiento de "omitir oviposición", que comprende la distribución de los huevos en varios sitios de reproducción. El comportamiento de omisión de oviposición puede dar como resultado la dispersión del vector cuando no se encuentran sitios de reproducción apropiados. Cuando los contenedores altamente productivos ya no están disponibles, los mosquitos hembra eligen receptáculos alternativos adecuados según la disponibilidad de alimentos o la exposición al sol y la búsqueda de nuevos sitios de oviposición puede provocar la dispersión de la hembra y la posterior diseminación de la enfermedad. (26)

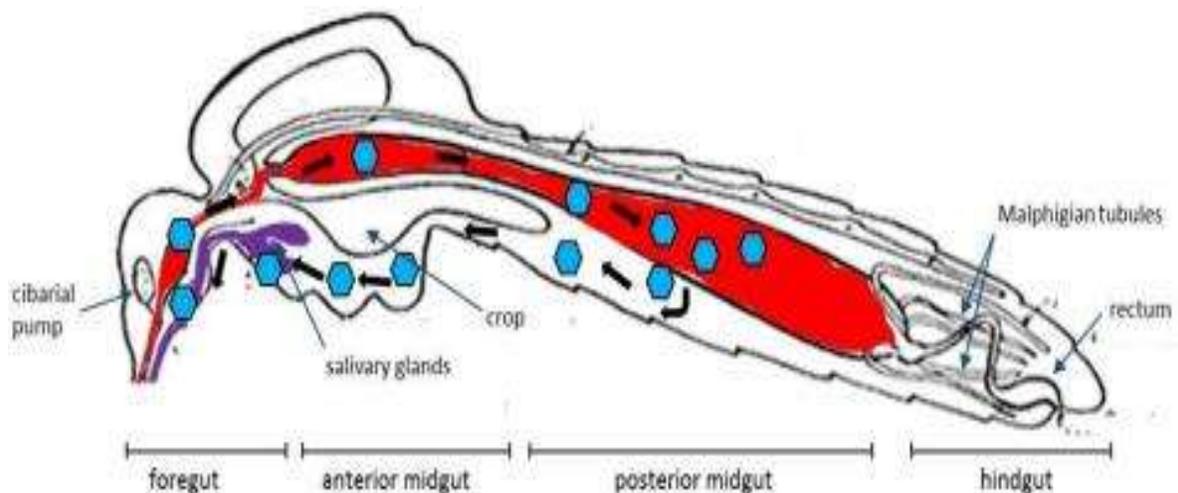


Figura 8: Se muestra la bomba cibarial (cibarial pump), glándulas salivales (salivary glands), cavidad(crop), recto (rectum), túbulos de malpigio (malphigian tubules) señalados con flechas en la parte superior. Mientras en la inferior se señalan las regiones de los intestinos del mosquito: intestino anterior (foregut), intestino medio anterior (anterior midgut), intestino medio posterior (posterior midgut), intestino posterior (hindgut). (27)

Tanto los *A. aegypti* como *A. albopictus* muerden principalmente durante el día y están ampliamente distribuidos en todo el mundo tropical y subtropical. *A. albopictus*

puede existir en áreas más templadas que *A. aegypti*, extendiendo así el rango potencial donde pueden producirse brotes. (9) *Ae. albopictus* suele ser exofágico y muerde a los seres humanos y animales de forma oportunista, pero también se ha demostrado que presenta un comportamiento fuertemente antropofílico similar a *Ae. aegypti* en contextos específicos. (28)

La competencia entre las dos especies ocurren principalmente en la etapa larval, *Ae. albopictus* tiende a ser un competidor larval superior, desplazando a *Ae. aegypti* en sitios suburbanos y rurales. (29)

La variación ecológica observada en las opciones de hábitat de reproducción, el comportamiento de alimentación oportunista y la adaptación a diferentes climas puede resultar en una plasticidad fenotípica, debido a la propiedad de un genotipo de producir más de un fenotipo cuando el organismo se halla en diferentes condiciones ambientales. (29)

3.3.2.2 RESERVORIOS NATURALES

La mayoría de los arbovirus de las familias Flaviviridae y Togaviridae transmitidos por *Aedes* spp. tienen reservorios de primates o circulan entre humanos y mosquitos, sin un reservorio animal adicional en los llamados ciclos selváticos o urbanos, respectivamente. Típicamente, los arbovirus transmitidos por *Aedes* están asociados con manifestaciones de enfermedades hemorrágicas en sus huéspedes humanos. (27)

El ser humano es el principal huésped amplificador de un virus. Los huéspedes naturales de los Arbovirus son de gran importancia en el estudio de la transmisión de estos patógenos a la población humana, pues sin ellos no existirían los ciclos de mantenimiento y el virus no podría subsistir. (18)

Dentro de estos reservorios naturales podemos encontrar numerosas especies de mamíferos, aves, reptiles y algunos anfibios. La eficiencia de un reservorio o huésped natural se puede medir en el hecho de que el virus no lo afecte de gravedad, sino, que permanezca desarrollando una viremia elevada y de larga duración, sin interferir en su ciclo vital, lo que le da al huésped la oportunidad de reproducirse y formar una prole con alta afinidad por el Arbovirus. (18)

3.3.2.3 TRANSMISIÓN

El Arbovirus debe ser observado en un ciclo natural completo, que corresponde a la transmisión por picadura (artrópodos hematófagos) desde un reservorio natural hasta un huésped, donde se multiplicará, y de este al reservorio, para completar el ciclo. Esta transmisión correspondería a una biológica propagativa, ya que el virus no sufre cambios morfológicos en el vector, sólo se reproduce. (18)

Los ciclos donde el virus viaja de reservorio a huésped y viceversa se denominan ciclos de mantenimiento, son los que permiten que el virus permanezca en la naturaleza, generalmente se dan en zonas rurales o selváticas y están asociados a endemias regionales.

Los mosquitos adquieren el virus a partir de un huésped virémico. Después de un periodo pro- medio de incubación extrínseca de diez días, el mosquito es capaz de transmitir el virus a un huésped susceptible. El virus es introducido a la piel donde se replica en los fibroblastos de la dermis y se disemina por el torrente sanguíneo hacia múltiples tejidos. En los humanos infectados, los síntomas de enfermedad aparecen generalmente después de un período de incubación intrínseca de tres a siete días (límites 1-12 días). (4)

La dinámica de transmisión entre virus, vector y huésped, comienza con la infección del vector por la ingesta de sangre o líquidos hísticos infectados de un huésped virémico (en condiciones naturales) y la penetración del virus al vector a través de su intestino, con la consecuente multiplicación, en especial dentro de las glándulas salivales; la transmisión puede ser también transovarial, lo que quiere decir que la hembra transmite el virus a los huevos de sus crías mientras se desarrollan en su interior; además existe la transmisión venérea, cuando el macho transmite el virus en la copula a la hembra y la transmisión vertical en el momento de la ovipostura. (18)

El riesgo de transmisión del virus por el vector está relacionado con su eficacia vectorial, determinada por el grado de susceptibilidad del vector a contagiarse y transmitirla, la longevidad, que establece las posibilidades de realizar un ciclo de transmisión completo, su abundancia en una región y la frecuencia de contacto con vertebrados. (20)

La replicación arboviral que tiene lugar en artrópodos se denominó "multiplicación ciclopropagativa", con el artrópodo desempeñando el papel en la transmisión como "portador" o "vector". (30)

Los estudios sugieren que la mayoría de las hembras de *Ae. aegypti* pasan su período de vida en las casas o alrededor de ellas donde emergen como adultos. Esto significa que las personas, y no los mosquitos, trasladan rápidamente el virus dentro de las comunidades y entre ellas. (5)

Los pasos elementales para una infección activa por arbovirus de un mosquito incluyen:

(1) Inicio de la infección en el intestino medio; aquí se involucra la absorción de azúcar, las células tienen prominentes microvellosidades, un retículo endoplásmico liso (ER) y un laberinto basal bien desarrollado, un retículo red de espacios intercelulares localizados en la porción basal de las células epiteliales del intestino medio. Los patrones de infección de las células epiteliales del intestino medio varían según las combinaciones de especies de virus y mosquitos.

(2) Diseminación de la infección dentro del epitelio del intestino medio;

(3) Progresión de la infección desde el intestino medio a los tejidos secundarios; después de escapar del intestino medio, los arbovirus típicamente se diseminan a tejidos como cuerpo graso, hemocitos y tejido nervioso.

(4) Amplificación secundaria del virus en varios tejidos fuera del intestino medio;

(5) Infección de glándulas salivales (y a veces tejidos reproductivos para transmisión vertical a la descendencia); la infección por arbovirus de las glándulas salivales generalmente comienza en los lóbulos laterales distales. Después de la replicación, el virus se deposita en las cavidades apicales de las células acinares, que puede conducir a la inoculación en un huésped al realimentar.

(6) Liberación del virus en los conductos salivales para la transmisión horizontal a un huésped vertebrado no infectado. La saliva de mosquito contiene péptido de proteínas, tales como enzimas que degradan el azúcar (glicosidasas), antimicrobianos, anti-hemostáticos, proteínas con propiedades angiogénicas o antiinflamatorias, y moduladores inmunes, que se inyectan en el huésped vertebrado junto con viriones. (27)

El virus por dengue (DENV) penetra a través de la piel durante la picadura de un mosquito infectado. Luego de la entrada del virus a la célula, consecuencia del pH ácido del endosoma, ocurre la fusión de membranas, etapa necesaria para la liberación de la cápside en el citoplasma y la desencapsidación. (10)

Acto seguido, el genoma viral es reconocido por los ribosomas y traducido en una poliproteína, posteriormente hidrolizada por la acción de proteasas virales y celulares para generar las 10 proteínas virales. La replicación y ensamblaje de la nueva progenie viral ocurre en la membrana del retículo endoplásmico, dando origen a la formación de partículas virales inmaduras. Éstas son transportadas a través de la vía secretoria y durante su paso por el compartimento Trans-Golgi, se da la maduración de la partícula viral y finalmente es liberada al medio extracelular.(12)

Durante la fase aguda de la enfermedad, el virus está presente en la sangre y su liberación a este compartimiento, generalmente, coincide con el descenso de la fiebre. El virus del dengue que circula en la sangre de humanos con viremia es ingerido por los mosquitos hembra durante la alimentación. (6)

Entonces, el virus infecta el intestino medio del mosquito y, posteriormente, hay propagación sistémica durante un período de 8 a 12 días. Después de este período de incubación extrínseco, el virus se puede transmitir a otros seres humanos durante la picadura y alimentación subsiguiente del mosquito. El período de incubación extrínseco está en parte influenciado por las condiciones ambientales, especialmente la temperatura ambiental. Después de eso, el mosquito permanece infeccioso durante el resto de su vida. (6)

El virus Zika se transmite en un ciclo de transmisión humano-mosquito-humano. *A. aegypti* y *A. albopictus* son las únicas especies conocidas de *Aedes* en las Américas. A pesar de la asociación de *A. aegypti* y *A. albopictus* con brotes, se encontró que ambas tenían una competencia inesperadamente baja pero similar (es decir, la capacidad intrínseca de un vector para transmitir biológicamente un agente patógeno) para la cepa de Zika, como determinada por una baja proporción de mosquitos infectados con saliva infecciosa después de la ingestión de una comida de sangre infectada. Sin embargo, se cree que *A. aegypti* tiene una alta capacidad vectorial (es decir, la capacidad global de una especie vectorial para transmitir un patógeno en un lugar determinado y en un momento específico). (11)

En África, CHIKV circula en un ciclo enzoótico que involucra a los mosquitos que viven en los bosques y primates no humanos. En Asia, CHIKV circula principalmente en áreas urbanas entre *Aedes aegypti* o *A. albopictus* mosquitos y humanos. Sin embargo, algunos estudios sugieren que un ciclo de transmisión de CHIKV silvícola también puede existir en al menos algunas partes de Asia, ya que se han detectado 91 anticuerpos específicos en monos salvajes en Malasia. (29)

Durante el CHIKV agudo en la infección a seres humanos, hay viremia de alto título, por lo que el virus puede transmitirse en un ciclo de transmisión hombre- mosquitos y el hombre infectado puede ser transmitir el virus convirtiéndose en un reservorio virémico. (31)

3.4 PRESENTACIÓN CLÍNICA

De todos los Arbovirus conocidos solo 50-60 son patógenos para el hombre. La mayoría de las infecciones son asintomáticas y sólo se detectan por serología. En el caso de que se produzca la enfermedad, comenzará con un síndrome febril agudo, que se podría confundir con una gripa y que se resuelve solo. Sin embargo, es posible que el virus genere una patología en el individuo, se reconocen cuatro tipos de enfermedad, a saber: enfermedades del sistema nervioso central, enfermedades leves febriles, artritis y fiebres hemorrágicas; su manifestación dependerá del tipo de virus y de la exposición a este a través de vectores. (20)

La OMS establece como caso sospechoso de infección por virus: paciente que presenta exantema o elevación de temperatura corporal axilar ($>37,2$ °C) y uno o más de los siguientes síntomas (que no se explican por otras condiciones médicas): Artralgias o mialgias, Conjuntivitis no purulenta o hiperemia conjuntival, Cefalea y malestar general. (24)

El dengue tiene un amplio espectro de presentaciones clínicas, el cuadro clínico de la infección normalmente cursa con una enfermedad benigna, y aunque no es claro el mecanismo exacto que genera una rápida progresión a las formas patológicas graves, existe evidencia que sugiere un efecto conjunto de tanto factores intrínsecos del virus, como del hospedero, en particular, la desregulación de la respuesta inmune, caracterizada principalmente por aumento de la permeabilidad vascular, con hemorragia o sin ella. (10)

Las infecciones sintomáticas por el virus del dengue se agruparon en tres categorías: fiebre indiferenciada, fiebre por dengue y fiebre hemorrágica por dengue. Además, esta última se clasificó en cuatro grados, según su gravedad, en donde los grados III y IV corresponden al síndrome de choque por dengue. (6)

Debido a la reacción cruzada por anticuerpos la primera manifestación clínica del dengue es la instauración súbita de fiebre, usualmente de 39-40°C, acompañada de cefalea, postración, mialgias, artralgias, dolor retro-orbital, prurito y exantema. Adicionalmente, puede haber anorexia, náusea, vómito y diarrea. (32)

Los síntomas iniciales de dengue grave son similares a los de la forma clásica, rápidamente seguidos de sangrado y/o derrame de cavidad, inestabilidad hemodinámica y shock. Las manifestaciones hemorrágicas se acompañan de trombocitopenia ($< 100,000$ plaquetas/mm³), hemoconcentración y uno o más eventos clínicos indicativos de extravasación plasmática: derrame pleural, ascitis y un incremento del hematocrito arriba del 20% del valor basal. La pérdida selectiva de plasma en las cavidades serosas, como la peritoneal y pleural, pueden causar shock hipovolémico. (4)

Las manifestaciones hemorrágicas comienzan de tres a siete días después del inicio de la enfermedad, caracterizadas por una prueba de torniquete positiva, petequias, equimosis, epistaxis, gingivorragia, sangrado uterino y sangrado de tubo digestivo alto. En el dengue grave, una fiebre elevada puede durar de dos a siete días, y entonces los pacientes pueden desarrollar dolor abdominal intenso, palidez, piel fría, agitación, insomnio, dificultad para respirar, pulso rápido y débil, shock y la muerte. (4)

La trombocitopenia ($<150,000$ plaquetas/ mm^3) es la anomalía hematológica más frecuente, está presente en 90% de los pacientes y plaquetas $<100,000$ en el 78%, seguida de leucopenia ($<4,000$ leucocitos/ mm^3), relativa linfocitosis en 60-80% y en el dengue grave hematocrito incrementado. Se ha observado trastorno de la función hepática en aproximadamente 90% de los pacientes con elevación de las transaminasas. (33)

Adicionalmente, los pacientes pueden tener las pruebas de coagulación anormales, niveles incrementados de urea y creatinina, bajos niveles de complemento (C3), y alteraciones de la orina: proteinuria, hematuria y leucocituria. (4)

De algunos de los estudios que compararon las manifestaciones clínicas entre el virus por dengue (DENV) y chikungunya (CHIKV), mostraron que, aunque para chikungunya hay una menor duración de fiebre, conjuntivitis, artritis aguda, mialgia / artralgia, sarpullido; los signos y síntomas fueron más prominentes, mientras que para dengue la leucopenia, la neutropenia, la trombocitopenia y el dolor abdominal fueron más prominentes. (32)

El virus por CHIKV, se caracteriza por una aparición brusca de fiebre con dolor severo en las articulaciones, y el dolor puede persistir durante semanas o años. A diferencia de otros arbovirus, solo 5-25% de las infecciones por CHIKV son asintomáticas. La artralgia es típicamente simétrica y afecta principalmente a las articulaciones periféricas, incluidas las muñecas, las rodillas, tobillos y las pequeñas articulaciones de la mano. Los signos y síntomas adicionales de la enfermedad incluyen artritis, con las articulaciones a menudo exhibiendo sensibilidad e hinchazón, tenosinovitis, erupción cutánea y mialgia, especialmente en la parte inferior de la espalda y los músculos de las piernas. (29)

Además de estas características clínicas, existen también manifestaciones neurológicas y cardíacas graves y, en algunos casos, la muerte, han sido asociado con la infección por CHIKV. Estos resultados más graves a menudo ocurren en recién nacidos, en pacientes mayores de 65 años y en aquellos con condiciones médicas subyacentes. (31)

ZIKA El virus por zika (ZIKV) comparte alguna algunos signos y síntomas con otros arbovirus, siendo más comunes de la enfermedad son fiebre, exantema, conjuntivitis, dolor de las articulaciones, principalmente en pies y manos que aparecen entre tres y 12 días después de la picadura de un mosquito infectado. Otros síntomas incluyen dolor muscular, cefalea, dolor de ojos, edema en miembros inferiores, dolor abdominal y vómito. Las complicaciones neurológicas y autoinmunes son poco frecuentes. La enfermedad puede durar de dos a siete días.
(7) (19)

Se estima que cuatro de cada cinco pacientes son asintomáticos. Los síntomas aparecen entre 3 a 12 días después de la picadura del mosquito y los más comunes son fiebre leve, exantema, conjuntivitis no purulenta y artritis, principalmente en pies y manos. Otros síntomas incluyen mialgias, artralgias, cefalea, dolor retro-ocular, edema de miembros inferiores, vértigo, dolor abdominal y vómito. La enfermedad generalmente es leve y autolimitada con duración de dos a siete días. Sin embargo, se han descrito complicaciones neurológicas y autoinmunitarias, así como malformaciones congénitas (microcefalia)

DIFERENCIACIÓN DE SIGNOS Y SINTOMAS POR INFECCIÓN DE ARBOVIRUS

	DENGUE	CHIKUNGUNYA	ZIKA
Virus	Flavivirus	Alfavirus virus ARN	Flavivirus
Vector	Aedes aegypti y Aedes albopictus	Aedes aegypti y Aedes albopictus	Aedes aegypti
Incubación	4-7 días (3-14 días)	3-7 días(1-12)	3-12 días
Asintomáticos	----	3-28%	75%
Aparición de los síntomas	2-7 días	4-8 días (2-12)	2-7 días, síntomas duran 4 a 7 días
Fiebre	Elevada, inicio agudo ,bifásica duración 6-7 días	Súbita + 39º C 76-100% Continua o intermitente	Fiebre leve o ausente 37.2º C y 38º C
Dolores articulares	Artralgias intensas	Intensos y debilitantes asimétricos más frecuencia manos y pies, tumefacción asociada a tenosinovitis	Dolor menos intenso, en general de las extremidades. Edema de miembros inferiores
Mialgias	++	+	presentes
Artralgias	+/-	+++	presentes
Cefalea	++ RETRO-ORBITAL, frontal	++	presente
Rash	+ Exantema maculopapular, escarlatiniforme. Petequias rojo brillante	++ 2-5 días después de la fiebre, exantema maculopapular, tronco y extremidades, puede afectar palmas, plantas y rostro	Exantema maculopapular pruriginoso (sarpullido) intenso -Síntoma más distintivo-
Discrasias sangrantes	++	+/-	-----
Shock	+	-	-----
Vomito	presente	+ /++ 4-59%	Poco frecuente
Nauseas	presente	++ 50-69%	Poco frecuente
Conjuntivitis	Puede presentar	+ /++ 3- 56%	No purulenta, con intolerancia a la luz
Diarrea	presente	-----	Poco frecuente
Dolor o eritema faríngeo	Puede presentar	-----	-----
Persistencia de síntomas	Consta de diferentes fases	Más de 3 meses	Cuando hay compromiso neurológico

Tabla 5: comparativa que muestra principales signos y síntomas de las tres enfermedades virales emergentes transmitidas por artrópodos. (33)

3.4.1 INMUNOLOGÍA DE LAS INFECCIONES

3.4.1.1. Respuesta Inmune que despiertan los arbovirus al entrar al organismo.

DENGUE. El mecanismo de patogénesis de DENV aún no es muy claro, pero la mayoría de los reportes apuntan a una enfermedad mediada por la respuesta inmune del hospedero más que una enfermedad causada por el mismo virus. Se considera que las respuestas inmunitarias humorales y celulares contribuyen a la

liberación del virus mediante la generación de anticuerpos neutralizadores y la activación de los linfocitos T CD4+ y CD8+. Además, la defensa innata del huésped puede limitar la infección causada por el virus. Después de la infección, los anticuerpos de reacción específica para el serotipo y los de reacción cruzada, y las células T CD4+ y CD8+, pueden detectarse y medirse durante años. (32)

En la infección por dengue como ya mencionamos se reconocen cuatro fases: fase de incubación, que dura de tres a diez días; fase febril, que se mantiene de dos a siete días; la fase crítica (fuga plasmática) se presenta entre el tercer y séptimo días de inicio de la fiebre; y la fase de recuperación (reabsorción de líquidos) que ocurre entre el séptimo y décimo días. (4)

El dengue grave está caracterizado por extravasación de plasma, hemoconcentración y alteraciones en la homeostasis. Los mecanismos que conducen a la enfermedad grave no están bien definidos, pero la respuesta inmunitaria, los antecedentes genéticos del individuo y las características del virus pueden contribuir al dengue grave. Los datos recientes sugieren que la activación de las células endoteliales podría mediar la extravasación de plasma. La activación de los monocitos infectados y las células T, el sistema del complemento y la producción de mediadores, monocinas, citocinas y receptores solubles, también pueden estar involucrados en la disfunción de las células endoteliales. La trombocitopenia puede estar asociada con alteraciones en la megacariocitopoyesis causada por la infección de las células hematopoyéticas humanas y con el deterioro del crecimiento de células progenitoras, lo que resulta en disfunción plaquetaria (activación y agregación de plaquetas), mayor destrucción o consumo (secuestro o consumo periférico). La hemorragia puede ser consecuencia de la trombocitopenia y la disfunción plaquetaria asociada o de la coagulación intravascular diseminada. (6)

En general, ocurre un desequilibrio transitorio y reversible de los mediadores, citocinas y quimiocinas durante el dengue grave, impulsado probablemente por una elevada carga viral temprana, lo que conduce a disfunción de las células endoteliales vasculares, trastorno del sistema de hemocoagulación, y, luego, a extravasación de plasma, choque y sangrado. (6)

Dado que las principales células blanco de la replicación de DENV son células dendríticas (sigla en inglés DC), monocitos y macrófago, en los últimos años se ha postulado que la infección de esas células conlleva a la activación de eventos inmunes que podrían explicar la ocurrencia de un dengue grave. (10)

Por ejemplo, su infección puede inducir, además de la activación de los linfocitos T CD4+ y CD8+, la producción desproporcionada de citoquinas pro- y antiinflamatorias tales como TNF- α , IL-2, IL-6, IL1- β , IL-8 e IL-10, que promueven la progresión de la enfermedad. Dichas citoquinas se han responsabilizado del aumento paulatino de la permeabilidad vascular que conlleva a la pérdida de plasma y fluidos, ocasionando uno de los signos más importantes como es la

hemoconcentración, además del desorden en la hemostasis, que resulta en cambios vasculares, trombocitopenia y coagulopatía. (10)

Recientemente también se sugirió que la elastasa, una proteínasa secretada por neutrófilos activados, podría participar en la gravedad del dengue; la elastasa puede facilitar el daño endotelial mediado por neutrófilos, activar el complemento, el sistema de coagulación y el fibrinolítico. Se ha reportado que una vez el sistema inmune es expuesto al DENV durante una infección primaria, se produce la activación y proliferación de una gran cantidad de linfocitos T resultando en una respuesta inmune específica contra los antígenos producidos por el serotipo infectante. (10)

Dicha defensa es específica contra el serotipo causante de la primo-infección, pero no contra los otros tres serotipos de DENV descritos. Por lo tanto, la reinfección por otro serotipo, que posee determinantes antigénicos distintos, ocasionará una respuesta inmune inespecífica y exacerbada producida por los linfocitos T de memoria generados durante la infección primaria, lo cual determinaría la aparición de manifestaciones más graves de la enfermedad. En otras palabras, la afinidad de los linfocitos T por el DENV infectante durante una primo-infección es alta, pero esa afinidad cambia cuando se trata de un serotipo diferente. (10) (4)

Este fenómeno se ha denominado “pecado original antigénico” y puede jugar un papel importante en la inmunopatogénesis del dengue grave, ya que dicha respuesta puede suprimir o retrasar la eliminación del virus, llevando a un incremento en la carga viral y en la inmunopatogénesis de la infección. Como se explicó previamente, DC-SIGN es una de las principales moléculas implicadas en la entrada del DENV a la célula blanco. Inicialmente, cuando el mosquito vector hembra infectado pica al hospedero, introduce el virus y las primeras células en infectarse son las mDC28. (10)

Esto es de vital importancia si se tiene en cuenta que las DC juegan un papel crucial en la activación, tanto de la respuesta inmune innata como la adaptativa. Linfocitos T y DC establecen interacciones a través de las moléculas ICAM3 y DC-SIGN, respectivamente, para lograr una correcta estimulación de linfocitos T y desencadenar una respuesta inmune eficiente. Teniendo en cuenta que la infección de DC por DENV disminuye la expresión de moléculas co-estimuladoras en su superficie, podría tener consecuencias en la alteración de la estimulación de linfocitos T, dependiente de DC. (10)

Además, se debe tener presente que DC infectadas y co-cultivadas con linfocitos T, producen altas concentraciones de IL-10, TNF- α e IFN- α 55. El TNF- α e IFN- α pueden generar la maduración de DC adyacentes, pero a la vez altas concentraciones de IL-10 puede desencadenar un fenotipo regulador de DC, disminuyendo la activación de la respuesta inmune, lo cual ha sido relacionado con la gravedad de la infección por DENV55. Por otra parte, los linfocitos T cumplen su función co-estimuladora de DC a través de CD40L, IL-6, IFN- γ y TNF- α 59. Esto es muy interesante porque recientemente se describió que las DC obtenidas de

pacientes infectados con DENV producen gran cantidad de quimoquinas inducibles por IFN- γ (CXCL9, CXCL10 y CXCL11), lo que influye directamente en la permeabilidad endotelial y, por ende, muy posiblemente en la patogénesis del DENV60. (10)

El conjunto de esos resultados indica que efectivamente las DC participan activamente no sólo en la infección por el DENV, sino que su activación altera el sistema inmune, lo cual promueve la secreción de citoquinas proinflamatorias, participando así en la permeabilidad vascular, observada en pacientes con dengue grave. (12)

De acuerdo con estudios recientes, los pacientes con chikungunya(CHIKV) tienen recuentos de leucocitos (leucocitosis) significativamente más altos que los pacientes que cursan con Dengue (DENV) o Dengue hemorrágico (DHF), siendo aún más evidente fue la diferencia entre el recuento de plaquetas, lo que hace posible el diagnóstico diferencial entre chikungunya y dengue con una sola variable de laboratorio, teniendo un recuento plaquetario aún mayor en chikungunya que en dengue. Las diferencias que son más evidentes en la presentación son la leucocitosis y mialgia / artralgia que eran más propensos a estar presentes en los casos de chikungunya, mientras que la trombocitopenia eran más propensos a estar presentes en los casos de dengue. (33)

Además, durante todo el curso de la enfermedad, la trombocitopenia y la neutropenia tenían más probabilidades de estar presentes en los casos de dengue. Específicamente, existe la necesidad de identificar a los pacientes con FHD, ya que requieren un meticuloso seguimiento y manejo clínico en el hospital, mientras que el dengue sin complicaciones y el chikungunya pueden ser manejados de forma ambulatoria. En particular, DF y DHF tenían significativamente mayor hematocrito y la temperatura en la primera semana de enfermedad, como el aumento de hematocrito representa la fuga de plasma, un sello de la DHF (32)

Los signos y síntomas de la enfermedad después de la infección con CHIKV están asociados con la infección de células en tejidos musculoesqueléticos, como fibroblastos y osteoblastos, y la infiltración de células inflamatorias en los tejidos musculoesqueléticos; que consiste predominantemente de monocitos, macrófagos, células asesinas naturales y células T. La enfermedad de CHIKV en humanos es asociados con niveles séricos elevados de citocinas y quimiocinas específicas con altos niveles de IL-6, IL-1 β , RANTES, MCP-1, MIG e IP-10 vinculados a la gravedad de la enfermedad de CHIKV. (31)

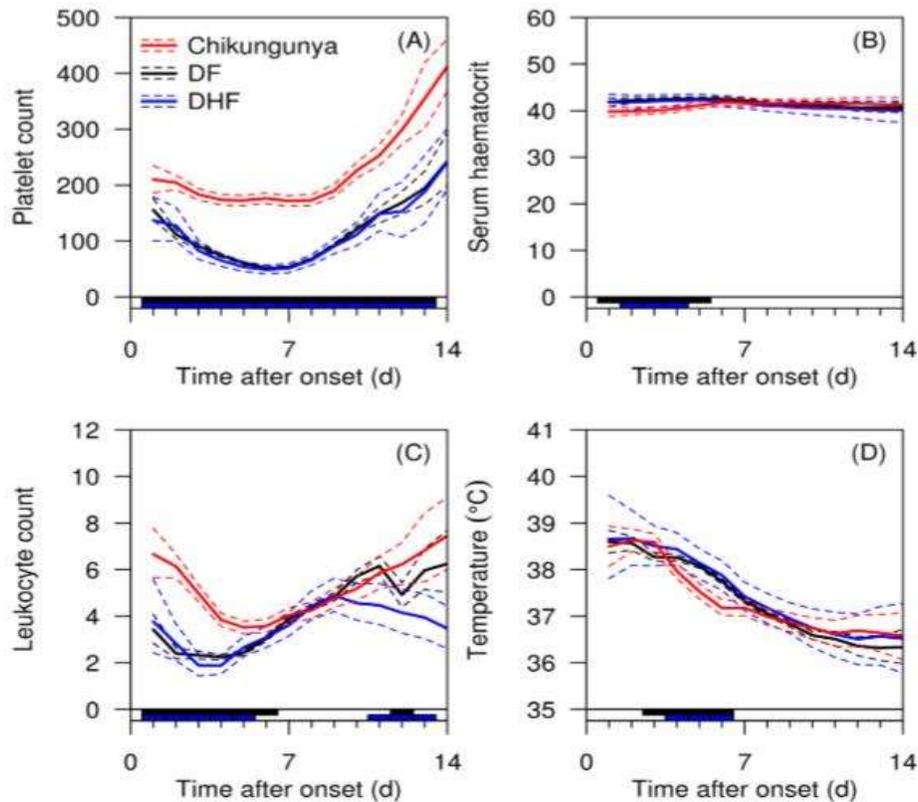


Figura 9: Análisis del curso del tiempo de variables. Se muestran los recuentos plaquetarios (A), hematocrito sérico (B), leucocitos (C) y temperatura (D) para el dengue (DF), dengue hemorrágico (DHF) y chikungunya (CHIKV). Los datos individuales se indican en líneas semitransparentes de color rojo (chikungunya), negro (DF) y azul (DHF). La barra en el eje X indica en días negros con una diferencia significativa entre el chikungunya y dengue, y la barra azul entre chikungunya y Dengue Hemorrágico. (32)

La replicación viral durante el virus por CHIKV ocurre principalmente en los tejidos diana, como: músculos, articulaciones y la piel, además del hígado, bazo y meninges en neo- natos y pacientes con comorbilidades. El periodo de incubación termina con la aparición súbita de fiebre, lo que coincide con la viremia, y la carga viral puede alcanzar rápidamente 10⁹ copias por mililitro. La replicación viral desencadena la activación de la inmunidad innata, de la cual la producción de interferón de tipo I (IFN) es el sello distintivo. La fiebre usualmente dura menos de una semana, hasta que la viremia acaba. En este momento es cuando los pacientes producen inmunidad adaptativa antiviral del chikungunya caracterizada por anticuerpos IgM antiviral del chikungunya. La enfermedad crónica por chikungunya consiste en dolor articular persistente y recaídas, por semanas, meses o años. Esta enfermedad crónica está asociada con niveles detectables de IL-17 y elevados de IL-6, además de factor estimulador de colonias de granulocitos durante los primeros meses pos-infección. (4)

3.3.2. TABLA COMPARATIVA DE RESPUESTA INMUNE POR ARBOVIRUS.

	DENGUE	CHINKUNGUNYA	ZIKA
Leucopenia	+++	++	-
Neutropenia	+++	+	-
Linfopenia	++	+++	-
Hematocrito elevado	++	-	-
Trombocitopenia	+++	+ >100.000/mm ³	-
VSG y proteína C reactiva		elevada	-
Vacuna	En fase de aprobación	No existe	No existe

+++ 70- 100% de los pacientes

++ 40-69% de los pacientes

+ 10- 39% de los pacientes

Tabla 6: comparativa de respuestas inmunes por distintos arbovirus. (18)

3.5 MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN

Para hacer un diagnóstico por arbovirus es necesario hacer la detección del ácido nucleico viral mediante una prueba de RT-PCR dirigida región genómica 5' de la proteína no estructurada, en muestras de sangre, orina o saliva del agente infeccioso. (34)

Usualmente, durante la aparición de los primeros síntomas de la enfermedad, la detección de la viremia en arbovirus (principalmente flavivirus y alfavirus) se realiza con éxito de cuatro a cinco días tras el inicio de los síntomas. Algunos arbovirus como el CHIKV pueden cursar con viremias más altas y prolongadas, detectándose hasta más de 7 días después de iniciados los síntomas. (8)

Por otra parte, una vez que el virus ha desaparecido del torrente sanguíneo se pueden utilizar métodos indirectos o serológicos y se observa la respuesta de anticuerpos, los test serológicos pueden ser positivos a partir del día 5-6 tras el establecimiento del cuadro clínico,(9) y llegan a tener una duración de meses (IgM) o incluso años (IgG).(35)

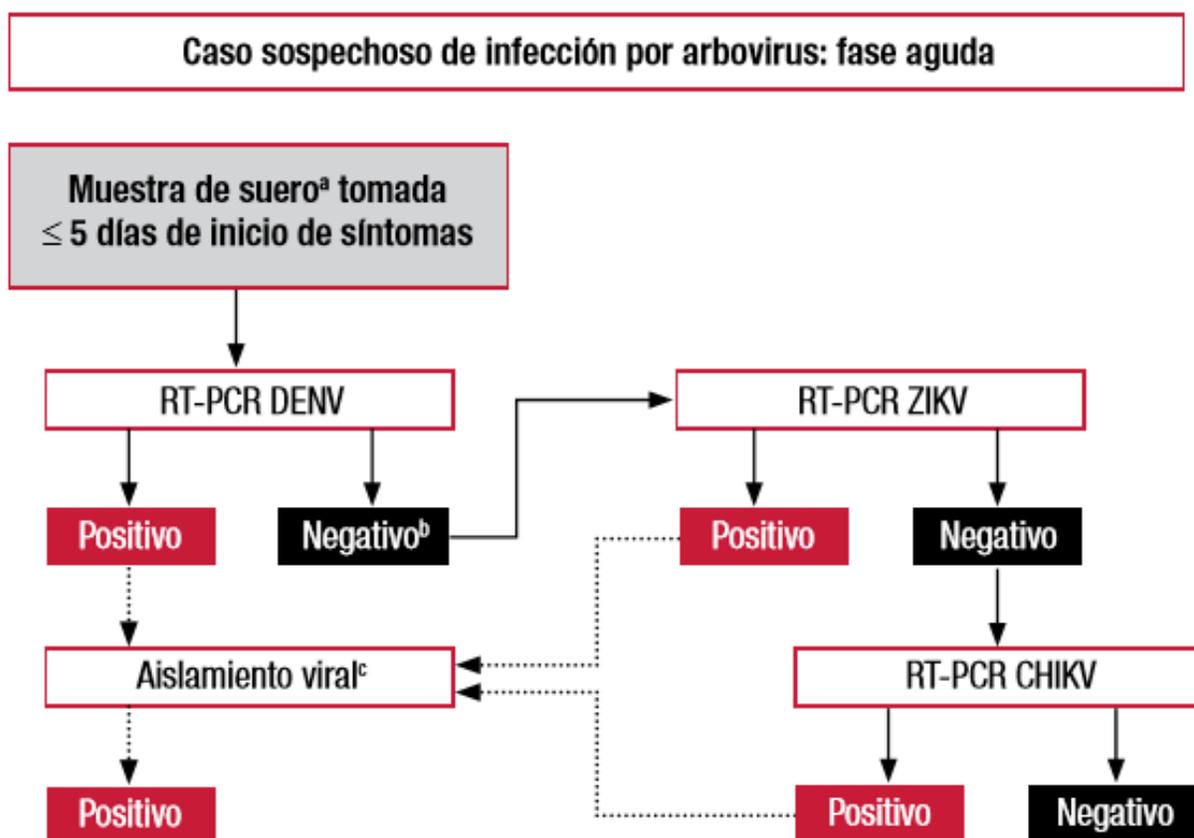
Las pruebas serológicas cumplen un papel importante en el diagnóstico de las infecciones por arbovirus, ya que en infecciones primarias (primera infección con un flavivirus) los anticuerpos de estos pacientes casi no presentan reacción cruzada con otros virus antigénicamente relacionados o si las hay, los títulos son bajos, mientras que en suero de individuos con historia previa de infección por otros flavivirus, especialmente dengue, se puede encontrar una reacción cruzada.(36)

3.5.1 Diagnóstico

Las técnicas alternativas para confirmar o descartar un caso probable en los primeros días de haber iniciado con la fiebre (0-5 días) es la identificación de la NS1 del DENV. Determinación de IgG por ELISA para muestras que estén entre 0-3 días después del inicio de los síntomas. Determinación de IgM, por ELISA, para las muestras que tengan entre 4-5 días de haber iniciado la fiebre.(19)

El diagnóstico rutinario de la infección por el virus Zika es la detección de ácido nucleico viral por RT-PCR y la detección de anticuerpos IgM mediante inmunoensayo inmunoenzimático. La detección de ácido nucleico viral en suero proporciona un diagnóstico definitivo; sin embargo, en la mayoría de los casos la viremia es transitoria y el diagnóstico por RT-PCR ha tenido más éxito dentro de una semana después del inicio de la enfermedad clínica. (26)

En el diagnóstico por CHIKV se utilizan tres tipos principales de pruebas: aislamiento viral, reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa y serología. Los métodos moleculares y virológicos son más sensibles durante la etapa aguda de la enfermedad (2-5 días después de la fiebre) cuando aún no se detectan anticuerpos. Durante en las etapas tardías de la infección, la sensibilidad de estos métodos se reduce debido al inicio de la respuesta inmunológica y reducción de la carga viral, siendo la medición de IgM por el método de ELISA la prueba más sensible. (4)



^a Para PCR de ZIKV es recomendable también la muestra de orina.

^b Considerar determinación de antígeno NS1 para infección por dengue.

^c El aislamiento no es requerimiento para confirmar la infección. Se considera complementario para identificar serotipos, genotipos y linajes del arbovirus en cuestión.

Figura 10: Algoritmo diagnóstico de laboratorio para la identificación de infecciones por arbovirus, de acuerdo con la OMS/OPS. (37)

- Comparativo de pruebas serológicas para la identificación de los Arbovirus

	DENGUE	CHIKUNGUNYA	ZIKA
Pruebas serológicas	Aislamiento viral. Prueba de Neutralización en placa, ELISA IgG e IgM, Inmunocromatografía rápida. RT-PCR	Aislamiento viral, RT-PCR, ELISA IgG , IgM. IgM máxima concentración 3 a 5 semanas 1ª semana análisis con RT-PCR (sensibilidad variable) Sin evidencia de transmisión ELISA IgM, IgG	PCR en tiempo real y aislamiento en muestras de sangre. Diagnostico serológico difícil por reacción cruzada con otros Flavivirus (dengue; fiebre del Nilo y fiebre amarilla)

Tabla 7: Comparación de pruebas serológicas para la identificación por infecciones virales, DENV, CHIKV, ZIKV. (33)

Si la vigilancia epidemiológica lo demande, las muestras que se procesaron para ZIKV por cumplir definición de caso y que resultaron negativas, se procesaran en el porcentaje correspondiente (el cual será indicado en el momento de la determinación) y deberá procesarse para Dengue y Chikungunya, como parte del diagnóstico diferencial. (27)

Las coinfecciones, se procesan e identificarán por caracterización de los cuadros clínicos en muestras que resultaron positivas para ZIKV en fase aguda de la enfermedad (según el porcentaje indicado en los lineamientos), promoviendo el análisis de NS1 y en RT-PCR para DENV, además de RT-PCR para CHIKV. (31)

Para la detección de coinfecciones con DENV se debe aplicar únicamente la determinación de NS1 y RNA mediante RT-PCR en tiempo real. La determinación molecular se debe realizar al total de los casos positivos a NS1; No se deberá realizar la determinación de IgM e IgG. Para la determinación de coinfecciones por Chikungunya se debe aplicar únicamente la determinación RNA mediante RT-PCR en tiempo real. El RNA extraído que se utilizó para confirmar ZIKV, debe ser utilizado para identificar RNA de DENV y CHIKV. (12)

3.5.2 Conservación de la muestra.

Una vez recolectada la muestra de los pacientes por sospecha de arbovirus, es necesario que se cumplan ciertas condiciones que favorezcan la conservación del virus, para su análisis.

- Mantenerla refrigerada (2 a 8 °C) si se va a procesar o enviar a un laboratorio de referencia dentro de 48 horas siguientes.
- Mantenerla congelada (-10 a -20 °C) si se va a procesar pasadas las primeras 48 horas o en un periodo no mayor de 7 días.
- Mantenerla congelada (-70 °C) si se va a procesar después de una semana. La muestra se conserva adecuadamente por periodos prolongados.
- Enviar siempre la ficha clínica y epidemiológica completamente diligenciada. (37)

3.6 MÉTODOS PARA AISLAMIENTO PARA PBMC

La sangre periférica es un derivado del tejido conjuntivo modificado que está formada por una matriz de fase líquida (plasma) y células sanguíneas que circulan por la sangre como lo son eritrocitos, leucocitos y trombocitos y/o plaquetas.(38)

Los leucocitos son células, diferenciados de los eritrocitos, estos sí poseen núcleo y una serie de organelos citoplasmáticos. Pueden denominarse glóbulos blancos debido a que carecen de pigmentos. Existen cinco tipos de leucocitos distribuidos porcentualmente: Neutrófilos (55 al 60%), Linfocitos (20 al 30%), Eosinófilos (1 al 3%), Basófilos (0 a 0.5 %), Monocitos (3 al 8%). (39)

Las PBMC como su nombre lo expresa son células mononucleares, dentro de las cuales se encuentran los linfocitos (células T, células B y células NK), y monocitos. Los linfocitos están en una proporción a 70 - 90%, mientras que los monocitos van del 10 - 30%. (40)

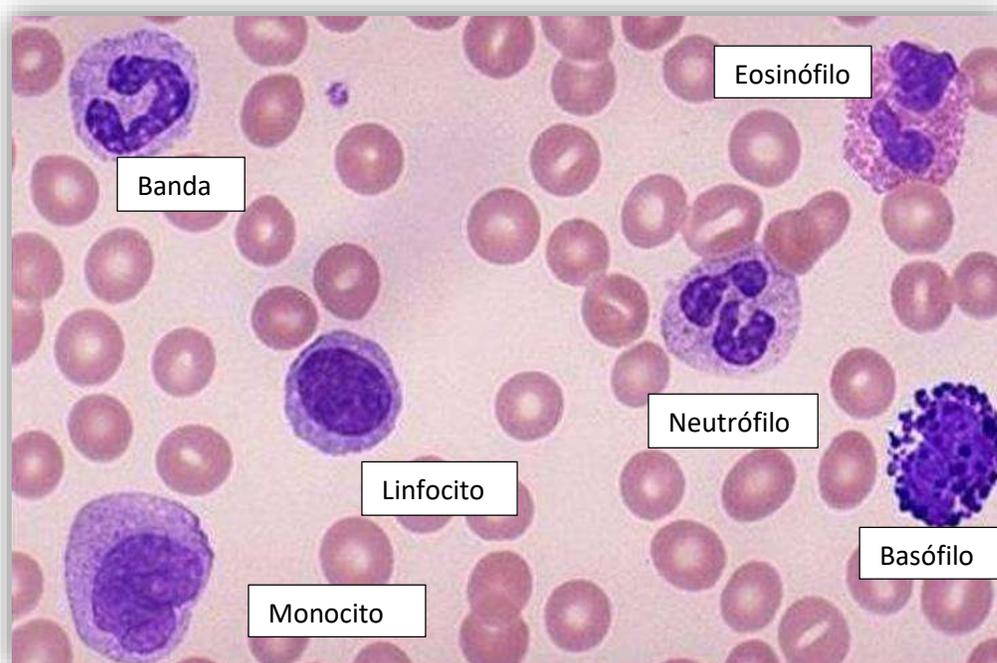


Figura 11: Se muestran los cinco tipos celulares leucocitarios, tomadas del Atlas Digital de Hematología del Dr. Joaquín Carrillo Farga. / Cybercell.com.mx/atlas

3.6.1 AISLAMIENTO DE PBMC USANDO TUBOS DE PREPARACIÓN CELULAR (CPT™) Vacutainer®

BD Vacutainer® CPT™ es un sistema estéril completamente cerrado para la separación de células mononucleares de sangre completa, donde la separación celular se lleva a cabo en el tubo primario de recolección de sangre, ya que se extrae directamente en el CPT utilizando técnicas de flebotomía estándar. Contiene citrato de sodio tamponado o anticoagulante de heparina sódica, un medio de densidad líquida y una barrera de gel inerte. La suspensión concentrada y separada de células mononucleares en plasma puede ser transportada en el tubo primario de recolección de sangre. (41)

Contiene anticoagulante de heparina sódica, que es un glicosaminoglicano compuesto de cadenas de residuos de D-glucosamina y un ácido urónico alternados, ejerce su acción anticoagulante mediante la estimulación de la actividad de la antitrombina III (ATIII). La interacción de la heparina con la ATIII produce un cambio conformacional en la ATIII, que acelera su capacidad para inactivar las enzimas de coagulación de trombina (Factor IIa), el factor Xa, y el factor IXa. (42)

El medio de separación de sangre está compuesto por un gel tixotrópico y una solución FICOLL™ Hypaque™ como medio de densidad. Los medios de separación aprovechan la menor densidad de células mononucleares y de plaquetas para aislarlos de sangre completa. El aislamiento ocurre durante la centrifugación cuando la porción de gel de los medios se mueve para formar una barrera debajo de las células mononucleares y plaquetas; esto los separa de los componentes sanguíneos más densos, como lo son los granulocitos y los eritrocitos. (43)

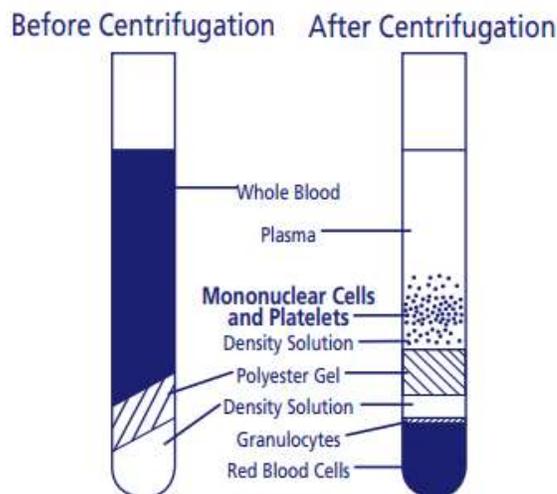


Figura 12: Capas de elementos formados en el Tubo BD Vacutainer® CPT™ /REF. 362753

3.6.2 AISLAMIENTO DE PBMC MEDIANTE EL USO DE FICOLL-HYSTOPAQUE.

Ficoll es un polisacárido neutro, altamente ramificado, de gran masa, que se disuelve fácilmente en soluciones acuosas, para la preparación de células mononucleares humanas.(44)

Ficoll® PM 400 se utiliza junto con diatrizoato de sodio (Paque) para crear Ficoll-Paque una mezcla densidad utilizado para la separación de células y orgánulos, especialmente linfocitos derivados de la sangre y monocitos.(45)

Linfocitos de baja densidad, juntos con otras células de sedimentación lenta, como plaquetas y monocitos, se conservan en la interfaz entre la capa de Ficoll y el plasma, y el último permanece en la parte superior. (46)

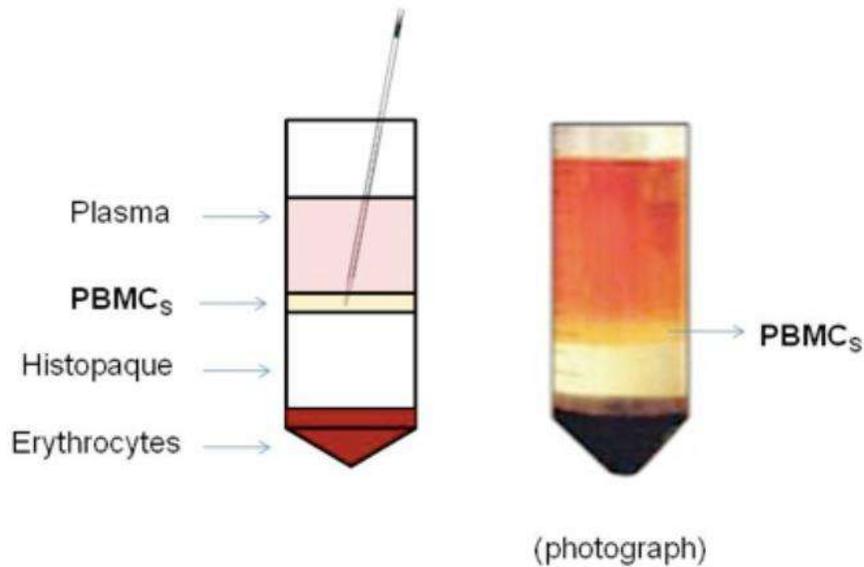


Figura 13: Simulación de fases utilizando Ficoll-Hypaque, en aislamiento de PBMC. (46)

3.6.3 PROCEDIMIENTO PARA AISLACIÓN DE PBMC (LYMPHOPREP)

Lymphoprep™ es un medio de gradiente de densidad recomendado para el aislamiento de PBMC mediante la explotación de las diferencias en la densidad celular. Los granulocitos y los eritrocitos tienen una densidad mayor que las células mononucleares y, por lo tanto, se sedimentan a través de la capa Lymphoprep™ durante la centrifugación.(47)

Después de la separación de la capa celular, las plaquetas pueden ser separadas de las PBMC mediante lavados o por centrifugación usando suero bovino fetal (FBS), que se emplea como un gradiente amortiguador que permite la penetración de las PBMC dejando las plaquetas.(48)

El suero fetal bovino (FBS) es una mezcla compleja con biomoléculas de bajo y alto peso molecular que incluye factores de crecimiento, proteínas, vitaminas, oligoelementos y hormonas.(49) Actualmente el suero bovino fetal (alternativamente denominado suero fetal de ternera [FCS]) es el aditivo sérico más comúnmente utilizado que es capaz de soportar el crecimiento de distintos tipos de células. (50)

La Solución Salina de Fosfatos (PBS) es una solución amortiguadora de pH. Su osmolaridad y concentración de iones (Cl, Na y K) es muy semejante a la del líquido extracelular, es isotónica y no tóxica para las células. Esta solución es empleada comúnmente lavados celulares por centrifugación. El PBS puede ser empleado como diluyente y junto a la adición de EDTA, permite disgregar células. (51)

El medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium), es un medio para el crecimiento usado para cultivos celulares. Específicamente utilizado para el crecimiento de células humanas linfoides, como linfocitos T y B. (52)

Durante la criopreservación la mayoría del agua se transforma en hielo, provocando lisis celular, por lo anterior es necesario un crioprotector intracelular como es el DMSO (Dimetil Sulfoxido) con bajo peso molecular que hacen permeables las células minimizando el daño al momento de congelar las PBMC. (53)

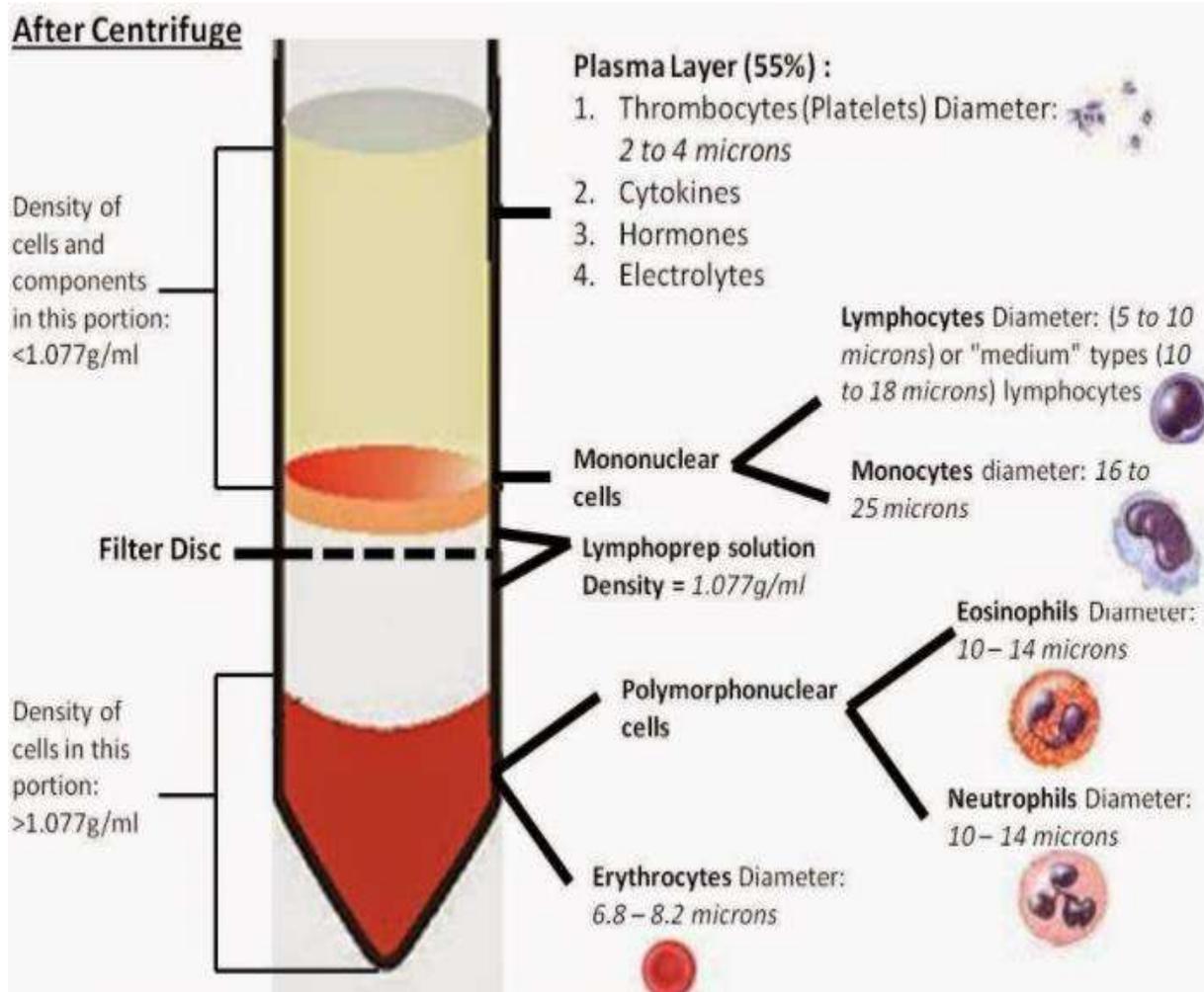


Figura 14: Esquema de la separación de fases usando Lymphoprep. Imagen tomada textbookhematology4medical-scientist.blogspot.sg

3.6.4 CRIOPRESERVACIÓN DE PBMC

La criopreservación es el método donde se utilizan bajas temperaturas con el fin de preservar las estructuras intactas de las células vivas. Se puede realizar mediante la reducción de temperatura programada, en un congelador a -80°C . Los métodos actuales, utilizan los contenedores de congelación a base de alcohol y cajas de poliestireno. (54)

La criopreservación de PBMC es una herramienta indispensable para ayudar en la recolección, el transporte y el procesamiento de muestras, ya que solo requiere un

procesamiento local mínimo, posible en la mayoría de los entornos de diagnóstico. (55)

Las muestras de PBMC se procesan y manejan de una manera que no degrade la capacidad de las células para responder a los estímulos de activación. También es importante que haya suficientes células viables disponibles después del aislamiento de PBMC y / o la criopreservación para realizar los estudios deseados. La viabilidad de una muestra en el momento de la criopreservación ayudará a predecir la viabilidad cuando la muestra se descongela. (56)

3.7 LINEAMIENTOS INTERNACIONALES PARA EL ESTABLECIMIENTO DE BIOBANCOS DE MUESTRAS BIOLÓGICAS HUMANAS.

Un biobanco es aquel establecimientos público o privado sin ánimo de lucro, con colección de muestras biológicas y datos recolectados asociados con fines diagnósticos, terapéuticos o de investigación, convirtiéndose en plataformas tecnológicas esenciales para el desarrollo de la investigación biomédica. (57)

Los biobancos y las redes de biobancos gestionan las muestras biológicas humanas con base en criterios que garanticen su óptima calidad y seguridad, respetando los requisitos éticos y legales que garantizan los derechos de los ciudadanos. (58)

Una muestra biológica puede considerarse a cualquier material biológico de origen humano susceptible de conservación y que pueda albergar información sobre la dotación genética característica de una persona; que incluye: sangre y sus derivados, tejidos u órganos y sus remanentes, obtenido dentro de un ensayo clínico. Pueden ser muestras anonimizadas o bien muestras codificadas. (59)

Según el tipo de muestras biológicas almacenadas y el área médico-científica en la que se han recogido, se puede hablar de biobancos asistenciales, biobancos para investigación o, incluso, biobancos del área judicial. (60)

Los biobancos deben asegurar el cumplimiento de la implementación de regulaciones nacionales e internacionales de normas de bioseguridad y calidad del procedimiento en la obtención, conservación, transporte, uso y disposición de las muestras biológicas para salvaguardar los derechos de los donantes. Así como el cumplimiento de las buenas prácticas clínicas del personal implicado en el ensayo clínico. (61)

Si la muestra biológica será enviada al extranjero, se debe presentar un convenio en el que se establezcan los deberes y beneficios tanto del país donante como del país receptor en relación con la muestra y los resultados obtenidos a partir de ella. Dicho convenio debe garantizar la protección de nuestra diversidad genética y cultural. En conformidad con el artículo 18, 19 y 20 de la Declaración Internacional sobre los Datos Genéticos Humanos de la UNESCO sobre la Circulación y Cooperación Internacional y los artículos 17, 18 y 19 de la Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos Humanos de la UNESCO sobre Solidaridad y Cooperación Internacional. (62)

La investigación traslacional, genera nuevos conocimientos, mecanismos y técnicas, generada por los avances en la investigación científica básica, nuevos enfoques para la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades. Los biobancos permiten el acceso a la información clínica, así como al material biológico del paciente en un entorno seguro. (63)

UK Biobank es una organización benéfica, siendo un importante recurso de salud nacional como internacional, con el objetivo de mejorar la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de una amplia gama de enfermedades graves y potencialmente mortales. El Sistema de Gestión de Calidad de UK Biobank ha sido aprobado por ISOQAR para el Sistema de Gestión de Calidad Standard ISO 9001: 2015 e ISO27001: 2013. (64)

Las muestras que se almacenan en los biobancos pueden provenir de cadáveres o sujetos vivos obtenidas durante el curso de intervenciones médicas, con fines diagnósticos, terapéuticos o de investigación biomédica o judicial; almacenadas con los respectivos datos socio demográficos y epidemiológicos, que facilitan la investigación de enfermedades tanto las de alta prevalencia como las poco frecuentes. (65)

El Convenio sobre Derechos Humanos y Biomedicina del Consejo de Europa de 1997 establece que ninguna parte del cuerpo humano originará ganancias económicas. (66)

3.7.1 INFORMACIÓN A LOS BIOBANCOS Y DONANTES

Los beneficios que resulten de las investigaciones que usen muestras biológicas humanas deben ser compartidos con la sociedad en general y con la comunidad internacional, de acuerdo con las legislaciones nacionales y acuerdos internacionales. Estos beneficios pueden consistir en el mejoramiento de la atención a las personas de la comunidad, de los servicios de la salud, con el fin de reforzar las capacidades de investigación.(65)

Aspectos generales de los biobancos
<ul style="list-style-type: none">• Localización y responsables del biobanco• Finalidad y objetivos del biobanco• Importancia que las muestras biológicas tienen para la investigación científica• Tipo de muestras biológicas que se almacenarán en el biobanco• Criterios para la selección de los posibles donantes• Procedimientos asociados a la toma de las muestras y datos• Finalidad y objetivos de la toma de las muestras (lo que se hará con las muestras)• Lo que no se hará con las muestras• Variables que se van a registrar en la base de datos• Duración del almacenamiento y disponibilidad de las muestras una vez que expire el periodo de almacenamiento acordado• Las condiciones para ceder las muestras y datos a los investigadores, estableciendo que las muestras y datos son cedidos sólo cuando se cuente con la aprobación del Comité de Ética
Aspectos relacionados con los derechos de los donantes
<ul style="list-style-type: none">• Los beneficios por autorizar el almacenamiento de las muestras y datos y su utilización en futuros estudios• Los riesgos asociados a la toma, almacenamiento y uso de las muestras en futuros estudios• Las garantías para el mantenimiento de la confidencialidad de la información obtenida y seguridad de las muestras• El derecho del individuo para expresar sus deseos en relación al consentimiento para usos futuros de las muestras o los datos para investigación. El sujeto podría establecer restricciones sobre el uso de sus muestras• El derecho a revocar el consentimiento en cualquier momento, así como a solicitar la destrucción de las muestras y datos• El derecho a ser informado que en el caso de haber resultados de investigaciones relevantes para su salud o la de sus familiares, el donante tiene la opción de decidir si desea o no recibir dicha información• La posibilidad del uso comercial derivado de los materiales y los datos, incluidos los resultados de la investigación y que el donante fuente no recibirá beneficio económico• El derecho a poder elegir el destino de las muestras y datos en caso del cierre del biobanco

Tabla 7: Principios y aspectos básicos que deben ser detallados en el consentimiento informado para la toma de muestras de un biobanco internacional.

3.7.2 TOMA DE MUESTRAS

Las muestras deben ser recolectadas por personal que cuenta con carreras afines al área biomédica. Las muestras de plasma, suero, orina, saliva, tejidos y sus principales biomoléculas, como ADN y ARN deben emplear como anticoagulante se emplea EDTA, ya que la heparina puede inhibir la amplificación por PCR. (67)

3.7.3 TRANSPORTE DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Las muestras se trasladan usando un transporte refrigerado que garantice la preservación de las muestras biológicas, las cuales deberán ser procesadas en áreas estériles con nivel de bioseguridad II. Idealmente, las muestras líquidas se procesan antes de que transcurran dos horas a partir de la toma y deberán ser enviadas en tubos o frascos con tapa hermética de goma o rosca.

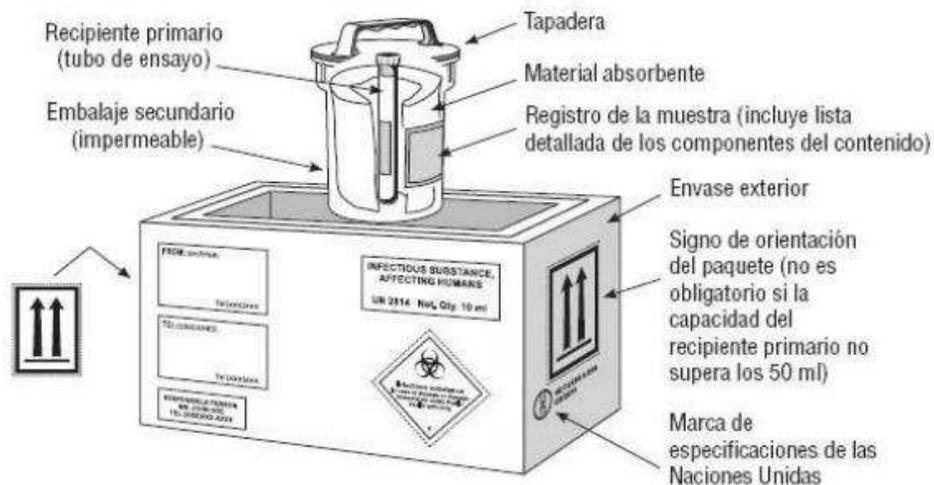


Figura 15: Sistema de embalaje triple para el embalaje y etiquetado de sustancias infecciosas categoría A., tomada de INS/OGAT-V.

3.7.4 ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA UN BIOBANCO

Las muestras de suero y plasma se almacenan en volúmenes de 250 µl y las muestras de ADN en volúmenes de 50 µl a una concentración de 50 ng/µl. Las muestras de ARN se almacenan en volúmenes de 50 µl a concentración variable, dependiendo de su uso posterior. El número de alícuotas es variable y depende de los volúmenes o cantidades de muestras tomadas. La cantidad de fluidos que se toma para cada paciente varía de acuerdo con los protocolos; en caso de tejidos frescos se almacenan en fracciones de aproximadamente 10 mg. (68)

Las muestras deben conservarse en un ultracongelador de -80°C con sistema de registro de temperatura, sistema de mantenimiento de temperatura en caso de corte de corriente eléctrica (inyección de CO₂, sistema de administración de energía (SAE) interno, sistema electrógeno) y sistema de alarma telefónica. (69)

México no cuenta aún con una ley regulatoria para biobancos, las regulaciones se basan en la NOM-012-SSA3-2012 que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos, la Ley General de Salud, del COFEPRIS y de los Comités de Investigación, Ética y Bioseguridad de las instituciones de origen de los proyectos. (70)

Las evaluaciones de organismos internacionales ofrecen certificaciones específicas para biobancos, basados en la Norma ISO9001:2015. (71)

4. JUSTIFICACIÓN

Las arbovirosis son enfermedades que se presentan de manera estacional en zonas endémicas, por lo que la obtención de muestras para el estudio de estas enfermedades se lleva a cabo de manera intensiva en periodos específicos, además en los sitios de alta prevalencia de estas enfermedades muchas veces no se cuenta con la infraestructura necesaria para llevar a cabo la crio-preservación de dichas muestras en las condiciones ideales.

En los últimos años las arbovirosis se han convertido en un muy importante problema de salud pública, debido a su elevada incidencia y morbimortalidad.

Las PBMCells (Peripheral Blood Mononuclear Cells) son de gran utilidad para medir las funciones inmunológicas, es necesario implementar técnicas que ayuden a la investigación sobre estas enfermedades virales, la respuesta inmunológica e inflamatoria que desencadenan, además de incrementar el estudio en ensayos clínicos acerca de fármacos que pudieran ser útiles para su tratamiento específico, ya que hasta el momento solo se contrarresta la sintomatología de dichas enfermedades, así también de manera muy importante enfatizar en la creación de vacunas para generar inmunidad a estas enfermedades y lograr su erradicación.

Por todo lo anterior, es de gran importancia la creación de biobancos que cumplan con las condiciones óptimas para crio-preservar muestras biológicas de pacientes afectados con estas enfermedades y que reúnan muestras no solamente serológicas, sino que incluyan también células que puedan ser utilizadas para ensayos biológicos de respuesta a modelos de fármacos o vacunas.

5. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION

OBJETIVO GENERAL

Implementar una metodología que permita el aislamiento de células mononucleares de sangre periférica con un alto nivel de viabilidad biológica para la creación de un biobanco de células de pacientes positivos al diagnóstico de infección por arbovirus, que cumpla estándares internacionales.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Integrar una cohorte de pacientes con cuadro febril y presentación clínica de sospecha de infección aguda causada por arbovirus: dengue, chikungunya y zika.
2. Recabar datos clínicos y carta de consentimiento informado.
3. Llevar a cabo el aislamiento de Células Mononucleares de Sangre Periférica por método de separación por gradiente de densidad.
4. Separar y crio-preservar suero y plasma de los pacientes incluidos en el estudio con el fin de integrar un bio-banco para la determinación de biomarcadores.
5. Revisar los lineamientos internacionales para el establecimiento de biobancos de muestras biológicas humanas.
6. Llevar a cabo el diagnóstico confirmatorio de la infección por pruebas tanto inmunológicas como moleculares.

6. HIPÓTESIS

Las células mononucleares de sangre periférica pueden ser crio-preservadas por periodos largos de tiempo sin perder su viabilidad y capacidad funcional, implementando una metodología que permita su aislación, para ser utilizadas posteriormente en ensayos biológicos, que permitan la investigación, así como la integración de biobancos que cumplan con lineamientos internacionales.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

- TIPO Y CLASIFICACIÓN DE ESTUDIO

Proyecto de investigación descriptivo y transversal

- SITIO DE ESTUDIO

Laboratorio de Hemostasia y Biología Vascular División de Estudios de Posgrado Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

- UNIVERSO O POBLACIÓN

Pacientes con síndrome febril sugerentes a zika, dengue o chikungunya, durante el periodo comprendido entre el 19 de junio al 23 de agosto del 2017.

- CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Muestras de pacientes de ambos sexos con presencia de síndrome febril en fase aguda, durante los primeros 5 días a la aparición de síntomas; de edad indistinta.

- CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Muestras de pacientes con evolución de más de 5 días de la aparición del cuadro febril

- CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

Muestras con presencia de hemólisis y almacenamiento en condiciones inadecuadas.

- AISLAMIENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES EN SANGRE PERIFÉRICA

Se realizó el aislamiento de células mononucleares en sangre periférica a través de separación por gradiente de densidad utilizando el Lymphoprep™ (StemCells Technologies; Oslo, Norway)

EQUIPO REQUERIDO

MATERIAL

- Autoclave
- Campana de seguridad microbiológico certificado clase II.
- Centrífuga con desaceleración gradual a cero.
- Conjunto de Micro pipetas
- Contenedor de congelación, por ejemplo 'Mr. Frosty' por Nalgene®
- Crioviales
- Crioviales de propileno estéril 2.0mL con tapa rosca y anillo
- Cubrebocas
- Equipo de conteo celular (Cámara de Neubauer) /contador automatizado (Coulter Counter 'Z1' model)
- Filtros de celulosa para esterilizar por filtración
- Guantes de nitrilo (sin talco)
- Parafilm
- Pipetas Pasteur de plástico estéril (3ml / 4ml)
- Pipetas serológicas 5mL, 10mL, 25mL, y 50mL estéril envueltas individualmente
- Tubos con EDTA
- Tubos Falcon volumen 15ml y 50ml.

REACTIVOS REQUERIDOS

REACTIVO	MARCA
Alcohol Isopropílico	Mr. Froosty
Azul de tripano	RS-BLUE
DMSO (Dimetil Sulfoxido)	SIGMA
FBS (Suero Fetal Bovino)	SIGMA
L-GLUTAMINA	SIGMA
Lymphoprep	Lymphoprep™
PBS (Solución Salina Buffer de Fosfatos)	SIGMA
Penicilina/ Estreptomicina Solución	SIGMA
RPMI	SIGMA
Solución salina fisiológica	PIISA

7.1. PROCEDIMIENTO PARA AISLACIÓN DE PBMC DE SANGRE PERIFÉRICA

7.1.1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Todos los reactivos deben ser preparados usando una campana clase II y una técnica de asepsia.

Preparación medio RO:

- 500 ml de RPBI medio 1640
- 5ml de 200mM L-Glutamina (2mM concentración final)
- 5ml de 100X solución penicilina-estreptomicina (1X concentración final)
- Homogenizar y almacenar de 2-8 ° C
- **IMPORTANTE:** El medio preparado debe permanecer con la coloración rojiza, si vira de color es posible que el pH haya cambiado y debe prepararse nuevamente. (Duración de 2 semanas aproximadamente)

Preparación de Medio RPBI completo (R10):

- 500 ml de RPBI medio 1640
- 50 ml Suero fetal Bovino (FBS), con o sin inactivación por calor a 56°C por 60min. FCS 10% concentración final
- 5ml de 200mM L-Glutamina (2mM concentración final)
- 5ml de 100X solución penicilina-estreptomicina (1X concentración final)
- Mezclar bien y almacenar a 2-8°C hasta dos meses desde la fecha de preparación.

Preparación de PBS (Solución Salina Buffer de Fosfatos):

- En tubo Falcon 50 ml previamente esterilizado, colocamos 50 ml de agua estéril.
- Añadimos una pastilla de PBS al tubo Falcon con agua.
- Homogenizar hasta desintegración de la pastilla.
- **OPCIONAL:** Añadir 1 ml de solución Penicilina/Estreptomicina, una vez preparado el medio para evitar la proliferación bacteriana. (Duración 1 mes)

Preparación medio de descongelación: (Thawing Mix)

- 10 ml de R10
- 10 μ DNAsa I (type IV) (Concentración final de 60 μ g/ml)
- **IMPORTANTE:** Preparar el día de uso y precalentar en baño de agua a 37°C por lo menos durante 10min.

7.1.2 AISLAMIENTO DE PBMC (LYMPHOPREP)

1. Recolectar sangre periférica de pacientes en tubo de EDTA, utilizando medidas de flebotomía estándar.
2. Colocar el volumen de sangre recolectado (tubo EDTA) en tubo Falcon (15ml) estéril, etiquetado apropiadamente con el número del paciente.
3. Añadir en proporciones iguales solución salina fisiológica vaciando sobre paredes del nuevo tubo cuidadosamente.
4. Homogenizar cuidadosamente hasta dilución de la sangre, para mejorar la visualización de la separación de fases.
5. Agregar Lymphoprep en otro tubo Falcon estéril, utilizando la misma cantidad a la muestra inicial del tubo con EDTA.
6. Agregamos por las paredes la dilución de sangre con solución salina al tubo Falcon estéril, cuidando que la muestra no toque el fondo del tubo con la solución de Lymphoprep. (Observación de dos fases: Lymphoprep al fondo y muestra en la superficie)
7. Centrifugar durante 30 minutos a 2650 rpm, **IMPORTANTE:** La centrífuga debe contar con desaceleración gradual a cero, para que la separación de fases sea visible y se evite una pérdida celular.
8. Posterior a la centrifugación, se debe observar la separación de fases (plasma/capa de células/Lymphoprep/eritrocitos), cuidadosamente tomamos las células con pipeta estéril directamente (fase turbia), haciendo movimientos oscilatorios evitando no tomar del sobrenadante ni dejar un excedente de la fase turbia (hasta observar la separación plasma/Lymphoprep/eritrocitos). Nota: Se puede descartar primero la capa superior de plasma y la mayoría de las plaquetas, retirando con pipeta estéril cuidando no retirar la capa de células.

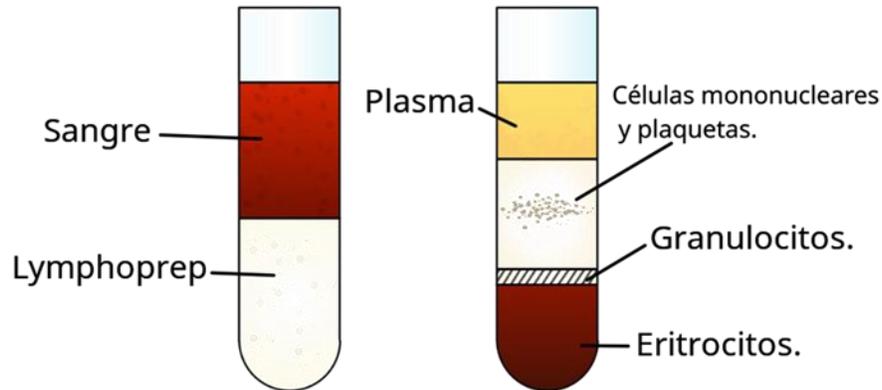


Figura 15: Esquema de fases antes y después de centrifugar.

9. Inmediatamente una vez tomada la capa celular, pasar a tubo Falcon nuevo estéril. (Aproximadamente se recolectan 1-2ml).
10. Al tubo que contiene las células recolectadas, se hace un lavado añadiendo 3 veces el volumen de PBS (Solución Buffer Salina Fosfato), de la capa de células mononucleares obtenidas, vaciando por las paredes del tubo. (Ejemplo; 2ml células/6ml solución buffer)
11. Centrifugar durante 5 minutos a 3000 r.p.m (primer botón)
12. Retiramos el sobrenadante con pipeta estéril y agregamos nuevamente solución buffer, 3 veces el volumen total del botón celular recolectado anteriormente. (aproximadamente 6ml)
13. Agitamos vigorosamente hasta homogenizar el primer botón con la solución buffer, para poder retirar las plaquetas de las células.
14. Centrifugamos nuevamente 5 minutos a 3000 rpm. (segundo lavado)
15. Decantamos y al botón formado (segundo botón) le adicionamos R10, tres veces el volumen de la capa extraída de células.
16. Homogenizamos el botón vigorosamente con el medio R10, pipetear hacia arriba y abajo para conseguir una sola suspensión de células. Una vez re-suspendido, completar con R10 a un volumen equivalente al volumen original de sangre.
17. Mezclamos 10ul de azul de tripano + 10ul de solución homogénea (R10 +botón) para hacer el conteo de células. (4 campos)
18. Colocamos 10ul de la mezcla en cámara de Neubauer, con objetivo al microscopio de 10X, la concentración óptima de células para el conteo deberá generar 50-100 células por campo de conteo.
19. **Cálculos:**

Número de PBMC por ml de sangre está determinado por:

$$\text{Cel/ml: } \frac{\text{\#células contadas (x)} * \text{dilución del colorante (2)} * 10^4}{\text{\# Cuadrantes contados (4)}}$$

Viabilidad= (número de células vivas / número total de células) * 100

NOTA: La sangre obtenida por un donador sano se obtiene 1-2x10⁶ células mononucleares por ml de sangre. 60-70% son linfocitos, con viabilidad >95%. La cuenta de plaquetas es <0.5% del contenido total de plaquetas contenidas en la muestra original de sangre. Si hay un exceso de contaminación de eritrocitos, las poblaciones de células mononucleares puras podrían obtenerse sometiendo a las células a un segundo ciclo de separación por gradiente como se describe arriba, o por lisis de eritrocitos con una solución de lisis de eritrocitos

7.1.3 MÉTODO DE CONGELACIÓN

Las células deben ser congeladas en 1ml de alícuota de 10-12 x10⁶ células/ml. Determinar el volumen de mezcla de congelación requerido para congelar las células a la concentración apropiada.

1ml ----- # de cel/ml

X ----- 1x10⁶

- 20.** Una vez calculado el número de células en 1ml, ajustamos el R10, de acuerdo con la concentración celular para agregar el R0.
 - 21.** Centrifugamos a 1000 rpm durante 7 minutos y retiramos el sobrenadante.
 - 22.** Al mismo tiempo preparamos la mezcla de congelación (R0), de acuerdo con la siguiente manera: 1ml DMSO para 4ml RPMI
- NOTA: La mezcla de congelación debe ser preparada cada día como se requiera y almacenada a 2-8°C o en hielo hasta su uso.
- 23.** Re-suspender en 500µl SFB (frío a 2-8°C) después de retirar el sobrenadante. (500µl por 10 x10⁶ células.)
 - 24.** Añadir la mezcla de congelación, según el ajuste al millón para que las células sean re-suspendidas en una solución de proporción de SFB a la

mezcla de congelación 1:1, resultando en una concentración celular aproximada de 10-12 x10⁶ cel/ml.

- 25.** Formar alícuotas de 1 ml en los Crioviales
- 26.** Colocar los crioviales en un contenedor de congelación, por ejemplo: Mr. Frosty, y después colocar el contenedor en un congelador a -80°C.
NOTA: El proceso completo de re-suspensión de las células en la mezcla de congelación, la formación de alícuotas, la colocación de los crioviales dentro del Mr. Frosty y transferir las unidades del Mr. Frosty en el congelador a -80°C deben ser ejecutadas dentro de un lapso de 10 min y llevarlo a hielo con la mezcla de congelación enfriada.

7.1.4 MÉTODO DE DESCONGELACIÓN:

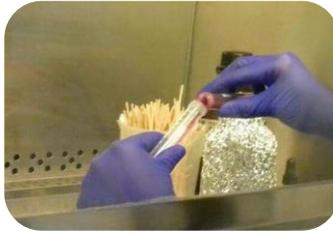
- 27.** Preparar el medio de descongelación (R10) y precalentar 10ml por muestra en un baño de agua a 37°C (+/- 1°C)
NOTA: Preparar el día de uso y precalentar en baño de agua a 37°C por lo menos durante 10min.
- 28.** Remover los crioviales de las PBMC del nitrógeno líquido y colocar en hielo seco hasta que estén lista para el deshielo.
NOTA: no es recomendado descongelar más de 4 crioviales debido al tiempo y limitaciones de manejo.
- 29.** Descongelar las células rápidamente, con agitación suave en un baño de agua a 37°C (+/- 1°C) hasta que la muestra permanezca líquida.
- 30.** Gentilmente transferir cada suspensión de células descongeladas a un tubo falcon de 15ml apropiadamente etiquetado.
- 31.** Enjuagar los viales con 1ml del medio de descongelación, agregando gota a gota el medio de descongelación a las células descongeladas.
- 32.** Completar hasta 10 ml de medio de descongelación a cada tubo, lentamente y gota a gota; oscilar los tubos gentilmente para mezclar y evitar las fuerzas cortadas u homogenizar con pipeta estéril con movimientos lentos hacia arriba y abajo dentro del tubo.
- 33.** Centrifugar a temperatura ambiente por 5min a 1000rpm.
- 34.** Descartar el sobrenadante y suavemente tocar el fondo del tubo para re-suspender el botón de células.

- 35.** Re-suspender el botón de células en 1ml de R10 inicial, pipetear hacia arriba y abajo para conseguir una única suspensión de células. Una vez re-suspendido, agregar 9ml de R10 para un volumen final de 10ml de suspensión celular
- 36.** Centrifugar a temperatura ambiente por 5min a 1,000 rpm.
- 37.** Descartar el sobrenadante y suavemente tocar el fondo del tubo para re-suspender el botón de células.
- 38.** Re-suspender el botón de células en 1ml de R10 inicial, pipetear hacia arriba y abajo para conseguir una única suspensión de células. Una vez re-suspendido, agregar 9ml de R10 para un volumen final de 10ml de suspensión celular
- 39.** Contar las células usando el método de exclusión de azul de tripano
- 40.** Sedimentar las células y re-suspender en R10 estéril para tener una concentración final de 4×10^6 cel/ml.
- 41.** Reposar las células a 37°C por dos horas
- 42.** Recontar las células usando azul de tripano, después del reposo de las células, ajustar para tener una concentración final de 4×10^6 cel/ml.

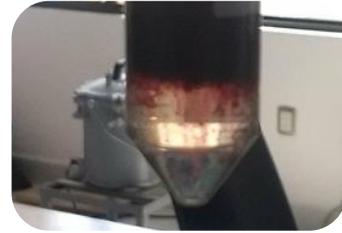
ESQUEMA GENERAL DE LA TÉCNICA DE AISLAMIENTO DE PBMC'S



Flebotomía estándar para recolección de sangre periférica en tubos con EDTA.



Tubo Falcon estéril con lymphoprep, verter por las paredes cuidadosamente la sangre.



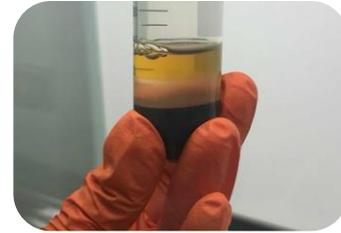
Debe observarse las dos capas: Lymphoprep/Sangre periférica.



Posterior a la centrifugación:
Plasma/botón de células/Lymphoprep/eritrocitos



Recolección de la capa de células con movimientos oscilatorios.



Posterior a la recolección celular:
Plasma/Lymphoprep/eritrocitos



Resuspensión del botón celular en R10



Conteo celular con azul de tripano a 10x.



Resuspensión celular en R0 para almacenamiento en Mr. Frosty.

8. RESULTADOS

- Para este estudio se reclutaron pacientes que cumplieran con los criterios de inclusión durante el periodo establecido, contando con un total de 80 pacientes con sospecha de infecciones virales.
- Se utilizaron muestras de sangre periférica total de los pacientes para la implementación de la metodología de aislamiento de PBMCs.
- Se compararon diversas técnicas de aislamiento celular, la primera se llevó a cabo mediante la utilización de tubos BD Vacutainer® CPT™ que están destinados para la recolección de sangre completa y la posterior separación de las PBMCs; la segunda fue una estandarización por una metodología con utilización de Lymphoprep que es un medio de separación por gradiente de densidad. Se obtuvo una metodología que logra el aislamiento de PBMCs como se muestra en la siguiente imagen:



Imagen 1: Técnica con Lymphoprep, donde se muestra la colocación de sangre periférica recolectada en tubo de EDTA, al tubo Falcon de 15ml, en cantidades iguales.



Imagen 2: Es importante que la sangre no toque el fondo del tubo Falcon, donde se encuentra la solución de Lymphoprep, dejando ver la separación entre ambas fases. Esto antes de llevarse a cabo la centrifugación.

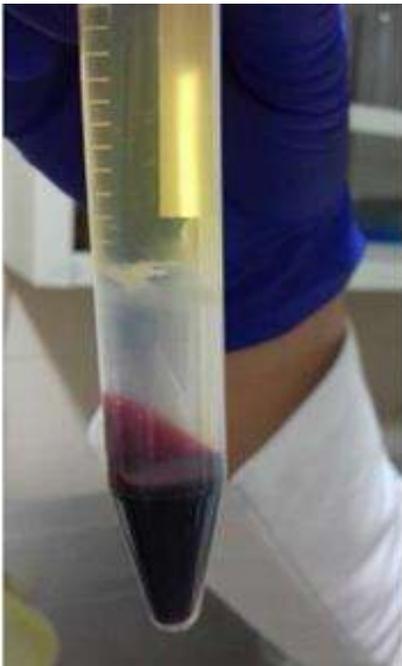


Imagen 3: Separación de fases después de centrifugación: Plasma (capa amarilla), Botón de células y plaquetas (capa turbia), Lymphoprep (capa transparente), los granulocitos se encuentran en la superficie de la capa eritrocitaria (capa roja) al fondo del tubo Falcon de 15ml.

- Se calculó la viabilidad de las PBMC, tomando la muestra del paciente No. 78 conforme la siguiente ecuación:

$$\text{Viabilidad} = \frac{56 \text{ (número de células vivas)}}{63 \text{ (número total de células)}} * 100 = 88.8 \%$$

De acuerdo con los datos recolectados se obtuvo un 88.8 %, que permiten su almacenamiento y aplicaciones ulteriores.

- El conteo de PBMC en un ml de sangre, utilizando la muestra anterior (paciente rotulado con el No. 78) se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Cel/ml} = \frac{56 \text{ cel. Contadas (\# total de cel)}}{4 \text{ (\# total de cuadrantes contados)}} * 2 \text{ (factor de dilución)} * 10^4$$

$$\text{Cel/ ml} = 280,000.$$

- Ajustamos la concentración a 10^6

$$\text{Cel/ ml} = 0.28 * 10 \text{ ml (volumen final de dilución)}$$

$$\text{Cel/ ml} = 2.8 \text{ millones de PBMC}$$

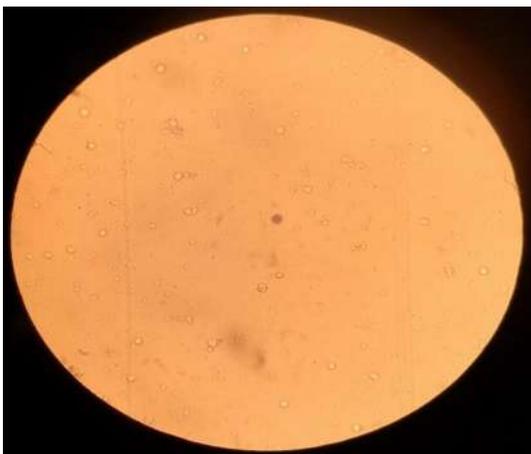


Imagen 4: Se observan PBMC con una tonalidad clara que indica la viabilidad de las células, ya que al mantener la integridad de su matriz extracelular no absorbe el colorante, mientras que las células afectadas toman una coloración azul. (76)

- Del total de los 80 pacientes registrados, 38 fueron mujeres y 42 hombres, se analizaron las muestras por RT-PCR en tiempo real, en Instituto de Investigaciones Médico-Biológicas, Universidad Veracruzana. Obteniéndose un total de 13 pruebas positivas a enfermedades virales, correspondientes en la siguiente tabla.

Arbovirus	Positivos por RT-PCR
Dengue (DENV)	2
Zika (ZIKV)	4
Chikungunya (CHIKV)	5
ZIKV/CHIKV	2

9. DISCUSIÓN

El objetivo principal del presente trabajo de tesis fue implementar una metodología que permita el Aislamiento de las PBMCs para establecer un biobanco de células de pacientes con presencia de un cuadro febril posible a infecciones por arbovirus y muestras positivas a estas infecciones comparando técnicas que permitan obtener mejores resultados al momento de reproducir dicha metodología.

Se han desarrollado métodos alternativos por gradiente de densidad con el objetivo de simplificar el procedimiento de aislamiento en términos de tiempo y manejo de muestras, evitar la contaminación con otros tipos de células y para minimizar cualquier activación indeseada de las células aisladas, que son cruciales para la aplicación funcional en de las PBMC.

Las técnicas de rutina para el aislamiento de PBMC (Células Mononucleares de sangre periférica humana) incluyen la centrifugación de densidad con Ficoll-Hypaque, mediante tubos de preparación celular (CPT) y tubos con Lymphoprep.(72) Por lo anterior, se realizó una comparativa entre las metodologías, que permitan facilitar al investigador establecer una técnica confiable para el aislamiento celular.

El tubo de preparación de células BD Vacutainer® CPT™ es un sistema de tubo único para la colección de sangre y la separación de células mononucleares, pero presenta algunos inconvenientes que mencionaremos a continuación:

Es una herramienta que permite un proceso rápido de centrifugación y un solo paso para la purificación de leucocitos mononucleares y polimorfonucleares de la sangre, pero se ha observado que en individuos normales o con ciertos estados de enfermedad y/o el uso de drogas que puedan alterar densidad celular, afecta la separación usando Tubos CPT™, en gran parte porque los eritrocitos no se sedimentan a través del medio de centrifugación. Por lo que se deben usar medios de mayor resistencia osmótica para separar los componentes de la sangre. (47)

El procedimiento para el aislamiento de PBMC utilizando la función CPT difiere significativamente del enfoque Ficoll y Lymphoprep. En los CPT, el gradiente de densidad está presente debajo de una barrera de gel. Las poblaciones aisladas de CPT contenían más contaminación de eritrocitos. (58)

El tubo BD Vacutainer® CPT™ debe estar a temperatura ambiente oscilando entre los 18-25° C. Por lo que su utilización en lugares donde las condiciones no sean las adecuadas, puede causar cambios en los medios dentro del tubo, que no permitan el aislamiento celular, se ha observado que los tapones de gel pueden aflojarse y la separación de las células puede fallar(73).

Un volumen mínimo de sangre puede ser procesado (6.0 mL. Aprox.) pero, los parámetros hematológicos como un hematocrito (HCT) bajo o una concentración de hemoglobina corpuscular media baja, pueden afectar el rendimiento, mientras que con aumento de glóbulos rojos hay contaminación por encima de la barrera de gel; la contaminación de eritrocitos enrojecerá el sedimento de PBMC adquirido después de la centrifugación. Esto se ve a veces con CPT, en mayor medida que los protocolos tradicionales de Ficoll. (74)

El aislamiento de células mediante el uso de Ficoll, tiene como déficit la menor recuperación celular para fracciones de PBMC aisladas de sangre periférica, mostrando mayor recuperación celular con el uso de Lymphoprep. Mientras que en los tubos CPT, se muestra una mayor contaminación de eritrocitos. (72)

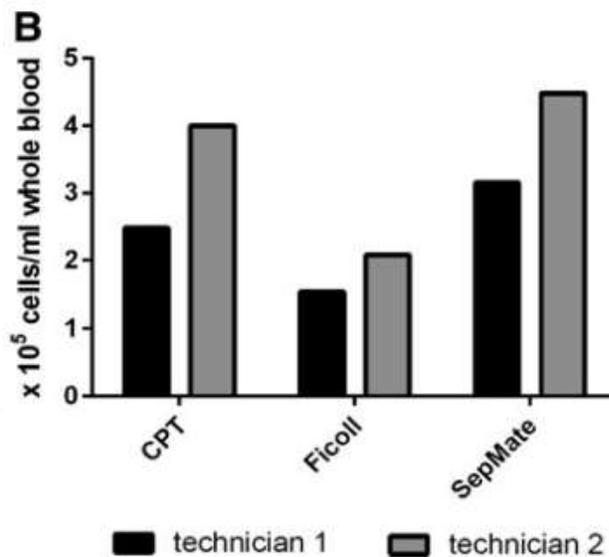


Figura 15: Se muestra una tabla de rendimiento celular, entre los métodos comparados: con tubos CPT, Ficoll y Lymphoprep usando tubos SepMate, evaluada por dos técnicos.

De acuerdo con la literatura, no se han encontrado diferencias significativas en la pureza media y recuperación de PBMC aisladas utilizando medios como Ficoll o CPT. (75) Mientras que las PBMC procesadas por Ficoll tienen mejor viabilidad que las procesadas con los tubos de preparación celular (CPT). (56)

Aunque Lymphoprep y Ficoll están compuestos de polisacáridos y diatrizoato, hay ligeras diferencias entre los dos medios de densidad. Ficoll-Paque contiene edetato de calcio disódico como agente quelante, mientras que Lymphoprep no contiene un agente quelante. Ficoll-Paque puede ser sustituido por Lymphoprep sin necesidad de cambiar sus protocolos. (42)

El uso de Lymphoprep en esta metodología, permitió sin dificultades el aislamiento celular, una vez llevada a cabo la centrifugación la separación de fases se hizo visible para su recolección.

Se calculó viabilidad y rendimiento de las PBMC obteniéndose un 88.8% de viabilidad celular, lo que hace posible sus usos posteriores para la investigación, así como el rendimiento obtenido, resultando en 2.8 millones de células por ml de sangre, tomando en cuenta el estado clínico del paciente se obtuvo una buena recuperación de PBMC.

La metodología utilizando Lymphoprep como medio de separación es sencilla y rápida enfocando la purificación de PBMC teniendo como ventaja la recuperación de plasma de los pacientes para estudios posteriores. (48)

10. CONCLUSIÓN

- A pesar de las diferentes condiciones de trabajo que se presentaron al implementar la técnica, la viabilidad de las células fue favorable, existiendo un aislamiento que permite la conservación por largos periodos de tiempo.
- Para el aislamiento de PBMC de muestras de pacientes con infecciones agudas, es indispensable conocer los datos clínicos de los pacientes para llevar a cabo la recolección de muestra en tiempo y forma, y lograr el aislamiento de las células en el momento de la infección activa.
- Es de suma importancia llevar a cabo el proceso de preservación y congelación de acuerdo con el protocolo y vigilar la continuidad de la cadena de frío durante la preservación, así como en el traslado de estas, ya que de no hacerse podría existir una pérdida celular.
- La implementación de la técnica es reproducible en laboratorios que cuenten con la infraestructura adecuada, ya que debe realizarse vigilando altos parámetros de esterilidad y cuidando las condiciones que mantengan la viabilidad celular.
- Este tipo de técnicas permiten la realización de estudios posteriores, que involucren el estudio de la respuesta inmune del huésped frente a los distintos arbovirus mencionados en la presente investigación.
- Se requiere de más técnicas que implementen la investigación sobre las enfermedades virales emergentes, para poder aplicar su conocimiento en beneficio de los pacientes, así como de las instituciones de salud e implementar recursos que nos ayuden a contrarrestar estas enfermedades.

11. REFERENCIAS

1. Peruana AM, Ciro C, Vargas M, Maguiña C, Galán-Rodas E. AMP REVISIÓN El virus Zika: una revisión de literatura The Zika virus: a literature review. 2016;33(1):35–41.
2. Roth A, Mercier A, Lepers C, Hoy D, Duituturaga S, Benyon E, et al. CONCURRENT OUTBREAKS OF DENGUE , CHIKUNGUNYA AND ZIKA VIRUS INFECTIONS – AN UNPRECEDENTED EPIDEMIC WAVE OF MOSQUITO - BORNE VIRUSES IN THE PACIFIC 2012 – 2014. Euro Surveill. 2014;19(41):1–8.
3. Emergentes- El, Determinantes RYSUS. REEMERGENTES Y SUS DETERMINANTES. 2015;32(1):7–8.
4. JI A, JI, Méndez Herrera A MC. Arbovirus en Latinoamérica Arbovirus in Latin America. Inst Nac Pediatría Mex [Internet]. 2016;37(2):111–31. Available from: www.actapediatrica.org.mx
5. 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.
6. Organización Mundial de la Salud PE para I y C en E. DENGUE GUIAS PARA EL DIAGNÓSTICO, TRATAMIENTO, PREVENCIÓN Y CONTROL. In: OPS/OMS bolivia. Programa R. La Paz, Bolivia.: 2009; 2009.
7. Engla NEW. zika virus in the americas- yet another arbovirus threat. Perspective [Internet]. 2010;363(1):1–3. Available from: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:New+engla+nd+journal#0>
8. OPS. PREPARACIÓN Y RESPUESTA ANTE LA EVENTUAL INTRODUCCION DEL VIRUS CHIKUNGUNYA EN LAS AMÉRICAS. Washington, D.C.; 2011. 159 p.
9. Petersen L, Jamieson D, Powers A, Honein M. Zika Virus. N Engl J Med [Internet]. 2016;374(16):1552–63. Available from: <http://www.cdc.gov/zika/index.html>
10. Virus de Zika [Internet]. Asociación de Microbiología y Salud. Available from: <http://www.microbiologiaysalud.org/noticias/virus-de-zika/>
11. Salud S de. Enfermedades transmitidas por vector : Dengue , Chikungunya y Zika [Internet]. 01 de diciembre de 2015. 2015. p. 1–5. Available from: <https://www.gob.mx/salud/documentos/enfermedades-transmitidas-por-vector-dengue-chikungunya-y-zika-18649>
12. Martínez J, Hernández JC. Papel de las células dendríticas en la infección por el virus dengue: blancos de replicación y respuesta inmune. 2017;249–56.
13. Epidemiología S de S de prevención y P de la salud/Dirección G de. Panorama Epidemiológico de Fiebre por Dengue y Fiebre Hemorrágica por Dengue. Vol. 1, Secretaría de Salud. 2016.
14. OPS/OMS. Número de casos notificados de fiebre del dengue en las Américas. :6–8.

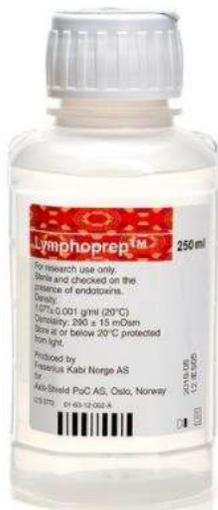
15. Organización panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud. Fiebre por chikungunya y dengue en las Américas Alerta Epidemiológica. :1–9.
16. OPS/OMS. Número de casos reportados de chikungunya en países o territorios de las Américas 2017. *Sem Epidemiológica* 38. 2017;2017:6524.
17. Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud. Reporte Epidemiológico Zika, Mexico. *Pan Am Heal Organ*. 2017;(September):2–7.
18. *Epidemiológica*. SN de V. BOLETÍN EPIDEMIOLÓGICO. Secr Salud [Internet]. 2017;68. Available from: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257040/sem36.pdf>
19. Secretaría de Salud. NORMA Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2014, Para la vigilancia epidemiológica, promoción, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vectores.
20. Fernando D, González S. Infección humana por Arbovirus.
21. Dra. Bacallo Martínez, Gloria Catalina/ Dr. Quintana Morales O. Dengue. Revisión bibliográfica. *Hosp Prov Univeritario*. 2013;13.
22. Halstead SB. Dengue Virus – Mosquito Interactions. *Annu Rev Entomol* 2008 53273–91 First. 2008;
23. Wu J, Zhao C, Liu Q, Huang W, Wang Y. Development and application of a bioluminescent imaging mouse model for Chikungunya virus based on pseudovirus system. *Vaccine* [Internet]. Elsevier Ltd; 2017;1–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.10.007>
24. Ángel M, Valdés S. Fiebre por virus Zika: una alerta necesaria Zika virus fever. A necessary alert. *Rev Habanera Ciencias Médicas* [Internet]. 2016;15(1):1–3. Available from: <http://scielo.sld.cu>
25. Icaza JT. El mosquito *Aedes aegypti* y el dengue en México. *Bayer Environ Sci*. 2010;
26. Vieira F, Abreu S De, Morais MM, Ribeiro SP, Eiras ÁE. Influence of breeding site availability on the oviposition behaviour of *Aedes aegypti*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(August):669–76.
27. Franz AWE, Kantor AM, Passarelli AL, Clem RJ. Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes. *Viruses*. 2015;3741–67.
28. Estandarizados L, *Epidemiol V. Zika*.
29. Bonizzoni M, Gasperi G, Chen X. The invasive mosquito species *Aedes albopictus*: current knowledge and future perspectives. *Trends Parasitol* [Internet]. 2013;29(9):460–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471492213001086>
30. Kuno G, Mackenzie JS, Junglen S, Plyusnin A, Gubler DJ. Vertebrate Reservoirs of Arboviruses : Myth , Synonym of Amplifier , or Reality ? *Viruses*. 2017;1–28.
31. Morrison TE. Re-emergence of chikungunya virus. *Dep Inmunol Microbiol Univ Color Sch Med*. 2014;(July):12.
32. Lee VJ, Chow A, Zheng X, Carrasco LR, Cook AR, Lye DC, et al. Simple Clinical and Laboratory Predictors of Chikungunya versus Dengue Infections in Adults. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(9).
33. Sanguínea S de S/ CN de T. DIAGNÓASTICO DIFERENCIAL DENGUE,

- CHIKUNGUNYA, VIRUS ZIKA [Internet]. Available from:
http://cnts.salud.gob.mx/interior/DIAGNOSTICO_DIFERENCIAL_DENGUE_CHIKUNGUNYA_ZIKA.pdf
34. Charre RNIL-G. State of knowledge on Zika virus for an adequate laboratory response. *Bull World Heal Organ*. 2016;1–29.
 35. OPS. GUÍAS PARA LA ATENCIÓN DE ENFERMOS EN LA REGIÓN DE LAS AMÉRICAS. 2.a ed. Washington D.C.; 2016.
 36. OMS. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Ginebra (Suiza).; 2009.
 37. OPS/OMS. INSTRUMENTO PARA EL DIAGNÓSTICO Y LA ATENCIÓN A PACIENTES CON SOSPECHA DE ARBOVIROSIS. [Internet]. 2016th ed. OPS, editor. Washington, D.C.; 2016. 102 p. Available from: (www.paho.org).
 38. Salud y Medicina. Sangre Periférica [Internet]. 2018. Available from: <https://www.saludymedicina.info/sangre-periferica/>
 39. ARENAS CEM. TEJIDO SANGUÍNEO Y HEMATOPOYESIS. UNAM.
 40. Miyahira A. Types of immune cells present in human PBMC. *Biosci Sang*. 2012;
 41. Dickinson B and C. BD Vacutainer® CPT™ Mononuclear Cell Preparation Tube - Sodium Heparin [Internet]. BD Biosciences. 2018. Available from: <https://www.bdbiosciences.com/us/applications/blood-collection/cell-biomarker-preservation/bd-vacutainerreg-cpttrade-mononuclear-cell-preparation-tube---sodium-heparin/p/362753>
 42. ANMANT C colaborador de LAN de MA y TM. Heparina [Internet]. Available from: <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/h004.htm>
 43. BD. Vacutainer ® CPT™. 2009; Available from: https://www.bdbiosciences.com/ds/ab/others/PI_CPT_heparin_March_2016_VDP40105-07_web_500010323.pdf
 44. Lu Y, Ahmed S, Harari F, Vahter M. Impact of Ficoll density gradient centrifugation on major and trace element concentrations in erythrocytes and blood plasma. *J Trace Elem Med Biol* [Internet]. Elsevier GmbH.; 2014;8–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtemb.2014.08.012>
 45. SIGMA. Ficoll® PM 400 [Internet]. 2018. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/f4375?lang=es®ion=MX>
 46. Ficoll Gradient Protocol [Internet]. 2018. Available from: https://imagemag.ru/img-ba_ficoll-gradient-protocol.html
 47. NutShell H in a. PBMC Isolation using Lymphoprep [Internet]. Available from: <http://textbookhaematology4medical-scientist.blogspot.mx/2014/07/pbmc-isolation-using-lymphoprep.html>
 48. Edited O, Lopez-camacho C. WORKSHOP : STANDARD OPERATING PROCEDURES FOR THE ISOLATION AND PRESERVATION OF PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS FOR ANALYSIS OF ANTIGEN-REACTIVE T. Univ Oxford. 2015;51.
 49. SIGMA A. FBS [Internet]. 2018. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/>
 50. Hatim Hemed, Bernd Giebel WW. Evaluation of human platelet lysate

- versus fetal bovine serum for culture of mesenchymal stromal cells. *Cell Ther.* 2014;16(2):170–80.
51. UASLP L de GV y HF de M. Preparación de Phosphate Buffered Saline (PBS). *Stand Oper Proced.* 2008;
 52. ALDRICH SIGMA. RPMI-1640 Medium [Internet]. 2018. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/SIGMA>
 53. Cultek. Bancos de muestras biológicas [Internet]. 2018. Available from: http://www.cultek.com/aplicaciones.asp?p=Aplicacion_Almacenamiento&opc=tecnicas&idap=58
 54. Biocision. CRIOPRESERVACION DE CELULAS. 2018; Available from: <http://www.biocision.com/campaigns/cell-cryopreservation>
 55. Gastroenterol WJ. Cryopreservation for delayed circulating tumor cell isolation is a valid strategy for prognostic association of circulating tumor cells in gastroesophageal cancer. *Gastroenterol J.* 2018;
 56. Ruitenberg JJ, Mulder CB, Maino VC, Landay AL, Ghanekar S a. VACUTAINER CPT and Ficoll density gradient separation perform equivalently in maintaining the quality and function of PBMC from HIV seropositive blood samples. *BMC Immunol.* 2006;7:11.
 57. Baptista-gonzález HA. Hacia la participación de los biobancos en la investigación biomédica en México. *Inst Nac Perinatol.* 2010;17(3):152–6.
 58. NievesDoménech García. NataliaCal Purriños. Biobanks and Their Importance in the Clinical and Scientific Fields Related to Spanish Biomedical Research. *Reumatol Clínica.* 2014;10(5):304–8.
 59. INS/OGAT-V.01. Directiva para Muestras Biológicas en Ensayos Clínicos. 2005;1–12.
 60. Domínguez G, Estudios I. Estudios a partir de muestras biológicas almacenadas en biobancos 2. *Guías Oper CEIC/CEI-III* [Internet]. 2015;(August). Available from: <https://www.researchgate.net/publication/281291415%0AGalende>
 61. Ley General de Salud N° 26842.
 62. Declaración Internacional sobre los Datos Genéticos Humanos de la UNESCO.
 63. Norma Serrano-Díaz^{1, 2}, María C. Páez-Leal², María L. Luna-González² EG-M. Biobanks: critical tool for today's biomedical research. *Univ Ind Santander.* 2016;
 64. Biobank U. No Title [Internet]. 2017. Available from: <http://www.ukbiobank.ac.uk/about-biobank-uk/>
 65. Alberto L, Cabrera V, Ceballos CW, Lucía M, López S, Ruth N, et al. Consideraciones éticas y legales de los biobancos para investigación Research biobanks : ethical and legal considerations . *Rev Colomb Bioética.* 2010;5(1):121–41.
 66. El Convenio sobre Derechos Humanos y Biomedicina del Consejo de Europa. 1997.
 67. Mohamadkhani A PH. Repository of human blood derivative biospecimens in biobank: technical implications. *Middle East.* 2015;(7):61–8.
 68. Garza-Rodríguez ML. El Biobanco Institucional como pilar de las ciencias médicas. *Salud Publica Mex.* 2016;

69. Ma Ángeles MM. Obtención, Procesado Y Almacenaje de Muestras de Plasma. Red Nac Biobancos - Isc [Internet]. 2009; Available from: www.redbiobancos.es
70. OECD. Guidelines on Human Biobanks and Genetic Research Databases. Organ Econ Co-Operation Dev [Internet]. 2009. Available from: <http://www.oecd.org/sti/biotech/44054609.pdf>
71. ISO 9001. 2015.
72. Blood P, Cells M, Grievink HW, Luisman T. Comparison of Three Isolation Techniques for Human. 2016;0(0):1–6.
73. DIKYSA. Tubo BD Vacutainer® CPT™ con Gel Separador, Anticoagulante y Ficoll™ [Internet]. 2016. Available from: <http://dikysa.com.mx/index.php/producto/tubo-bd-vacutainer-cpt-con-gel-separador-anticoagulante-y-ficoll/>
74. Puleo, Alaina. / Carroll C. Isolation of PBMCs Using Vacutainer® Cellular Preparation Tubes (CPT™). Bio-protocol LLC [Internet]. 2017;7(2). Available from: <https://bio-protocol.org/e2103>
75. Corkum CP, Ings DP, Burgess C, Karwowska S, Kroll W, Michalak TI. Immune cell subsets and their gene expression profiles from human PBMC isolated by Vacutainer Cell Preparation Tube (CPT™) and standard density gradient. BMC Immunol [Internet]. BMC Immunology; 2015;16(1):48. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4549105&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
76. Bioscience Nexcelom. Accurately count PBMC & measure viability whitout lysing RBC [Internet]. Cellometer. Available from: <http://www.nexcelom.com/Applications/blood-based-3-count-and-measure-pbmcs.php>

12. ANEXOS



Contiene:

- diatrizoato de sodio (9.1% p / v)
- Polisacárido (5.7% p / v)
- Otros ingredientes

Subtipo: Densidad Gradiente Media (Densidad de 1.077 g / mL.)

Tipo de célula: células mononucleares

Especie: humana

Fuente de muestra: médula ósea; Sangre de cordón; Sangre pura

Aplicación: aislamiento celular

Marca: Lymphoprep #Catálogo. 07801, 07851



Material del tubo: vidrio

Tamaño del tubo: 16x125 mm

Volumen: 8 mL

Tipo de cierre: Tope convencional

Color de cierre: rojo / verde

Etiqueta Mylar: (transparente)

Separador celular: Sí (Gel)

Anticoagulante: heparina sódica

Aditivos: Solución Ficoll™ Hypaque™

Autoclave de esterilización: SAL 10-6, ISO17665-1

Catalog No.362753



CARTA DE CONSENTIMIENTO NIÑOS

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN
Y POLÍTICAS DE SALUD
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD



CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO (NIÑOS Y PERSONAS CON DISCAPACIDAD)

Lázaro Cárdenas, Michoacán a _____

Se le invita a participar en este estudio, registrado ante el Comisión Nacional de Investigación Científica del Instituto Mexicano del Seguro Social con el número de registro: _____ y titulado “Eestudio de biomarcadores inflamatorios y de activación plaquetaria en infecciones virales emergentes en México: Dengue, Chikungunya y Zika”.

El siguiente documento le proporciona información detallada sobre el mismo. Por favor léalo atentamente.

JUSTIFICACION

Usted vive en una región del Estado de Michoacán donde con mucha frecuencia pueden adquirir enfermedades que son transmitidas por mosquitos conocidas como Dengue, Chikungunya y Zika; estas enfermedades cuando inician producen síntomas difíciles de diferenciar. Sin embargo, en ocasiones pueden desarrollar complicaciones que les pueden ocasionar una mala calidad de vida, mal funcionamiento de algún órgano o incluso la muerte. También se ha informado que el Zika, cuando afecta a mujeres embarazadas puede provocarles malformaciones neurológicas a sus hijos. Actualmente solo existe tratamiento para aliviar los síntomas ya que aún se desconoces muchos aspectos en estas enfermedades, por lo que este estudio tiene como objetivo describir en forma más precisa algo que se llama “respuesta inflamatoria” de cada una de estas enfermedades, con el propósito de identificar medicamentos que puedan ser más específicos para tratar estas enfermedades.

PROCEDIMIENTOS

A todas las personas que por sus síntomas se sospecha tienen la probabilidad de tener Dengue, Chikungunya, o Zika, habitualmente se les toman 2 muestras de su sangre una de 3ml en un tubo con anticoagulante EDTA (morada) y otra de 5ml en un tubo seco (rojo), las cuales son enviadas a un laboratorio (laboratorio central) de la Secretaría de Salud para el diagnóstico de Dengue o Chikungunya, mientras que a las personas que como usted tienen síntomas que sugiere es Zika o si está embarazada y tiene esos síntomas se toma una muestra de su sangre de 5 ml en un tubo seco (sin anticoagulante) el cual es enviado al Laboratorio Central de Epidemiología situado en el Centro Médico Nacional “la Raza” en la Ciudad de México donde se le realizan los estudios especiales para el diagnóstico de Zika. Si usted acepta participar en este estudio, el laboratorio Estatal de la Secretaría de Salud nos proporcionará una cantidad pequeña del suero que es obtenido de su muestra de sangre y solo si usted por sus síntomas se sospecha tiene Zika o está embarazada adicionalmente se le tomará en un tubo seco (rojo) una muestra adicional de 5ml de su sangre (para su mejor comprensión la cantidad total de sangre que se le extraerá es el equivalente a dos o tres cucharaditas). Esta muestra adicional será utilizada para hacer estudios que sirven de indicadores en la respuesta inflamatoria llamados biomarcadores; algunas de estas muestras se seleccionarán y serán almacenadas en el Laboratorio de Hemostasia y Biología Vasculare en la Facultad de Medicina de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo para otros biomarcadores más específicos.

RIESGOS Y MOLESTIAS

El procedimiento para tomarle su muestra de sangre de su antebrazo generalmente solo le provoca una ligera molestia o dolor al introducir o retirar la aguja; ocasionalmente se puede lastimar la vena y se puede producir un hematoma (moretón) en el sitio de la punción.

INFORMACIÓN DE RESULTADOS Y ALTERNATIVAS DEL TRATAMIENTO

Los resultados de los estudios que se le realizan para el diagnóstico de estas enfermedades usted los conocerá siguiendo las instrucciones que la(s) personas responsables de hacerle seguimiento

seguramente le proporcionarán. Usted también tiene derecho a conocer los resultados de sus estudios que se le realicen si usted acepta participar en este estudio, lo cual usted los conocerá en cuanto se tengan disponibles y que podrá ser de manera directa o a través de su unidad médica a la cual usted acude regularmente.

PARTICIPACIÓN O RETIRO

Usted podrá tener contacto con los investigadores para resolver cualquier duda. Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Es decir, que, si usted no desea participar en el estudio, su decisión, no afectará su relación con el IMSS ni su derecho a obtener los servicios de salud u otros servicios que ya recibe.

PRIVACIDAD Y CONFIDENCIALIDAD

Su nombre y datos personales de la investigación clínica, así como los resultados de laboratorio serán confidenciales y estarán protegidos por la Ley Federal de Protección de Datos Personales, aunque en caso de auditorías, inspecciones, presencia de eventos adversos serios, verificación de los datos del estudio, o certificación de los datos clínicos, los investigadores autorizados, el personal de la Comisión Nacional de Bioética, la Comisión Nacional de Investigación Científica, así como personal de la Secretaría de Salud de México tienen el derecho de revisar su expediente. La privacidad y confidencialidad de los expedientes y su contenido están protegidas por la ley; sin embargo, la información científica derivada de los resultados obtenidos de este estudio puede ser publicada con la obligación de mantener su identificación de manera confidencial

COLECCIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO

- NO autorizo que se tome la muestra

- SI autorizo que se tome la muestra para este estudio

- SI autorizo que se tome la muestra para este estudio y estudios futuros

BENEFICIOS AL TERMINO DEL ESTUDIO

Es importante que sepa que no recibirá ninguna compensación económica por participar en este estudio y que también el estudio no implica ningún gasto para usted. Al término del estudio se logrará conocer más acerca de la respuesta inflamatoria en estas enfermedades, que probablemente en un futuro permita poder desarrollar tratamientos más específicos.

PERSONAL DE CONTACTO EN CASO DE DUDAS O ACLARACIONES

Si tiene dudas sobre su participación puede comunicarse de 8:00 a 16:00 horas, de lunes a viernes con la Dra. Georgina Ortiz Martínez mail: darzee001@yahoo.com.mx Teléfono. (443) 312 05 10, el Dr. Cleto Álvarez Aguilar al Teléfono 01 (443) 322 2600 Ext. 1017 en Michoacán; la D. C. Martha Eva Viveros Sandoval al Teléfono (443) 312 05 10.

Si Usted tiene dudas o preguntas sobre sus derechos al participar en un estudio de investigación, puede comunicarse con los responsables de la Comisión de Ética en Investigación del IMSS, a los Tel. 56276900-21230, de 9 a 16:00 horas., o si lo prefiere, al correo electrónico: comiteeticainv.imss@gmail.com. La Comisión de Ética se encuentra ubicada en el Edificio del Bloque B, Unidad de Congresos piso 4, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Av. Cuauhtémoc 330 Colonia Doctores, C.P. 06725, México D.F.

Declaración de Consentimiento

Se me ha explicado con claridad en qué consiste este estudio, además he leído (o alguien me ha leído) el contenido de este formato de consentimiento. Se me han dado la oportunidad de hacer preguntas y todas mis preguntas han sido contestadas a mi satisfacción. Se me ha dado una copia de este formato.

Al firmar este formato estoy de acuerdo en participar en la investigación que aquí se describe.

Nombre y firma de ambos padres o tutores o representante legal

Firma del encargado de obtener el consentimiento informado

Le he explicado el estudio de investigación al participante y he contestado todas sus preguntas. Considero que comprendió la información descrita en este documento y libremente da su consentimiento a participar en este estudio de investigación.

Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento
Fecha _____

Firmas de los testigos

Mi firma como testigo certifica que el/la participante firmó este formato de consentimiento informado en mi presencia de manera voluntaria.

FIRMA TESTIGO 1
Nombre _____
Parentesco con participante _____
Fecha _____

FIRMA TESTIGO 2
Nombre _____
Parentesco con participante _____
Fecha _____

Anexo 3. CARTA CONSENTIMIENTO (ADULTO)



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN
Y POLÍTICAS DE SALUD
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD



CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO (Adultos)

Lázaro Cárdenas, Michoacán a _____

Se le invita a participar en este estudio, registrado ante el Comisión Nacional de Investigación Científica del Instituto Mexicano del Seguro Social con el número de registro: _____ y titulado “Estudio de biomarcadores inflamatorios y de activación plaquetaria en infecciones virales emergentes en México: Dengue, Chikungunya y Zika”.

El siguiente documento le proporciona información detallada sobre el mismo. Por favor léalo atentamente.

JUSTIFICACION

Usted vive en una región del Estado de Michoacán donde con mucha frecuencia pueden adquirir enfermedades que son transmitidas por mosquitos conocidas como Dengue, Chikungunya y Zika; estas enfermedades cuando inician producen síntomas difíciles de diferenciar. Sin embargo, en ocasiones pueden desarrollar complicaciones que les pueden ocasionar una mala calidad de vida, mal funcionamiento de algún órgano ó incluso la muerte. También se ha informado que el Zika, cuando afecta a mujeres embarazadas puede provocarles malformaciones neurológicas a sus hijos. Actualmente solo existe tratamiento para aliviar los síntomas ya que aún se desconoces muchos aspectos en estas enfermedades, por lo que este estudio tiene como objetivo describir en forma más precisa algo que se llama “respuesta inflamatoria” de cada una de estas enfermedades, con el propósito de identificar medicamentos que puedan ser más específicos para tratar estas enfermedades.

PROCEDIMIENTOS

A todas las personas que por sus síntomas se sospecha tienen la probabilidad de tener Dengue, Chikungunya, o Zika, habitualmente se les toman 2 muestras de su sangre una de 3ml en un tubo con anticoagulante EDTA (morada) y otra de 5ml en un tubo seco (rojo), las cuales son enviadas a un laboratorio (laboratorio central) de la Secretaría de Salud para el diagnóstico de Dengue o Chikungunya, mientras que a las personas que como usted tienen síntomas que sugiere es Zika o si está embarazada y tiene esos síntomas se toma una muestra de su sangre de 5 ml en un tubo seco (sin anticoagulante) el cual es enviado al Laboratorio Central de Epidemiología situado en el Centro Médico Nacional “la Raza” en la Ciudad de México donde se le realizan los estudios especiales para el diagnóstico de Zika. Si usted acepta participar en este estudio, el laboratorio Estatal de la Secretaría de Salud nos proporcionará una cantidad pequeña del suero que es obtenido de su muestra de sangre y solo si usted por sus síntomas se sospecha tiene Zika o está embarazada adicionalmente se le tomará en un tubo seco (rojo) una muestra adicional de 5ml de su sangre (para su mejor comprensión la cantidad total de sangre que se le extraerá es el equivalente a dos o tres cucharaditas). Esta muestra adicional será utilizada para hacer estudios que sirven de indicadores en la respuesta inflamatoria llamados biomarcadores; algunas de estas muestras se seleccionarán y serán almacenadas en el Laboratorio de Hemostasia y Biología Vascular en la Facultad de Medicina de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo para otros biomarcadores más específicos.

RIESGOS Y MOLESTIAS

El procedimiento para tomarle su muestra de sangre de su antebrazo generalmente solo le provoca una ligera molestia o dolor al introducir o retirar la aguja; ocasionalmente se puede lastimar la vena y se puede producir un hematoma (moretón) en el sitio de la punción.

INFORMACIÓN DE RESULTADOS Y ALTERNATIVAS DEL TRATAMIENTO

Los resultados de los estudios que se le realizan para el diagnóstico de estas enfermedades usted los conocerá siguiendo las instrucciones que la(s) personas responsables de hacerle seguimiento seguramente le proporcionarán. Usted también tiene derecho a conocer los resultados de sus estudios que se le realicen si usted acepta participar en este estudio, lo cual usted los conocerá en

cuanto se tengan disponibles y que podrá ser de manera directa o a través de su unidad médica a la cual usted acude regularmente.

PARTICIPACIÓN O RETIRO

Usted podrá tener contacto con los investigadores para resolver cualquier duda. Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Es decir, si usted no desea participar en el estudio, su decisión, no afectará su relación con el IMSS ni su derecho a obtener los servicios de salud u otros servicios que ya recibe.

PRIVACIDAD Y CONFIDENCIALIDAD

Su nombre y datos personales de la investigación clínica, así como los resultados de laboratorio serán confidenciales y estarán protegidos por la Ley Federal de Protección de Datos Personales, aunque en caso de auditorías, inspecciones, presencia de eventos adversos serios, verificación de los datos del estudio, o certificación de los datos clínicos, los investigadores autorizados, el personal de la Comisión Nacional de Bioética, la Comisión Nacional de Investigación Científica, así como personal de la Secretaría de Salud de México tienen el derecho de revisar su expediente. La privacidad y confidencialidad de los expedientes y su contenido están protegidas por la ley; sin embargo, la información científica derivada de los resultados obtenidos de este estudio puede ser publicada con la obligación de mantener su identificación de manera confidencial

COLECCIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO

- NO autorizo que se tome la muestra
- SI autorizo que se tome la muestra para este estudio
- SI autorizo que se tome la muestra para este estudio y estudios futuros

BENEFICIOS AL TERMINO DEL ESTUDIO

Es importante que sepa que no recibirá ninguna compensación económica por participar en este estudio y que también el estudio no implica ningún gasto para usted. Al término del estudio se logrará conocer más acerca de la respuesta inflamatoria en estas enfermedades, que probablemente en un futuro permita poder desarrollar tratamientos más específicos.

PERSONAL DE CONTACTO EN CASO DE DUDAS O ACLARACIONES

Si tiene dudas sobre su participación puede comunicarse de 8:00 a 16:00 horas, de lunes a viernes con la Dra. Georgina Ortiz Martínez mail: darzee001@yahoo.com.mx Teléfono. (443) 312 05 10, el Dr. Cleto Álvarez Aguilar al Teléfono 01 (443) 322 2600 Ext. 1017 en Michoacán; la D. C. Martha Eva Viveros Sandoval al Teléfono (443) 312 05 10.

Si Usted tiene dudas o preguntas sobre sus derechos al participar en un estudio de investigación, puede comunicarse con los responsables de la Comisión de Ética en Investigación del IMSS, a los Tel. 56276900-21230, de 9 a 16:00 hrs., o si lo prefiere, al correo electrónico: comiteeticainv.imss@gmail.com. La Comisión de Ética se encuentra ubicada en el Edificio del Bloque B, Unidad de Congresos piso 4, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Av. Cuauhtémoc 330 Colonia Doctores, C.P. 06725, México D.F.

Declaración de Consentimiento

Se me ha explicado con claridad en qué consiste este estudio, además he leído (o alguien me ha leído) el contenido de este formato de consentimiento. Se me han dado la oportunidad de hacer preguntas y todas mis preguntas han sido contestadas a mi satisfacción. Se me ha dado una copia de este formato.

Al firmar este formato estoy de acuerdo en participar en la investigación que aquí se describe.

Nombre y firma del participante
Fecha _____

Nombre y firma del encargado de obtener el consentimiento informado

Le he explicado el estudio de investigación al participante y he contestado todas sus preguntas. Considero que comprendió la información descrita en este documento y libremente da su consentimiento a participar en este estudio de investigación

Nombre y firma de quien obtiene el CI

Fecha _____

Firmas de los testigos

Mi firma como testigo certifica que el/la participante firmó este formato de consentimiento informado en mi presencia de manera voluntaria.

FIRMA TESTIGO 1

Nombre _____

Parentesco con participante _____

Fecha _____

FIRMA TESTIGO 2

Nombre _____

Parentesco con participante _____

Fecha _____

