



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

Estandarización de técnicas de cultivo para la propagación *In vitro* del virus Zika

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN FARMACIA**

**PRESENTA:
MARÍA FERNANDA GARDUÑO LÓPEZ**

ASESOR: Dr. Salvador Fonseca Coronado

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

UNAM
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Estandarización de técnicas de cultivo celular para la propagación *In vitro* del virus Zika

Que presenta la pasante: **María Fernanda Garduño López**
Con número de cuenta: **311035852** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Farmacia**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 05 de Febrero de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Q.F.B. Ladislao Palomar Morales	
VOCAL	Dr. Salvador Fonseca Coronado	
SECRETARIO	M.C. Víctor Hugo Vázquez Valadez	
1er. SUPLENTE	M.C. Paola Edith Briseño Lugo	
2do. SUPLENTE	L.F. Miguel Ángel Trejo Rodríguez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

DEDICATORIAS

Primeramente a Dios que con su amor y bondad siempre ha puesto a las personas correctas en los tiempos correctos en mi vida, que a pesar de las pruebas y los obstáculos me ha demostrado que no estoy sola y que los cambios a pesar de mis miedos siempre traen algo nuevo y mejor, que ante todo él ha estado conmigo en cada momento respaldándome y cuidándome.

“Cuando pases por las aguas, yo estaré contigo; y si por los ríos, no te anegarán. Cuando pases por el fuego, no te quemarás, ni la llama arderá en ti.”

A mi mamá por ser mi mayor orgullo y figura de admiración, que me ha enseñado a persistir y luchar hasta lograr mis sueños. Gracias por ser mi mejor amiga, mi confidente, mi consejera, un hombro donde puedo llorar, gracias por todo lo que has hecho por mí porque es más de lo que cualquier persona puede pedir de una mamá, te amo, sin ti no estaría en donde estoy, tú eres el principio del sueño y mi tesoro más valioso.

A mi papá por ser un gran apoyo en mi vida. Gracias por todas las horas de trabajo que hicieron posible este sueño, gracias por todo el cariño y el sacrificio que has hecho estos años sé que tu vida la has dedicado a mí y mis hermanos, te estoy infinitamente agradecida, este triunfo también es tuyo.

A mis hermanos por ser parte muy importante de mi vida hemos salido adelante juntos y nos hemos demostrado que pese a las muchas diferencias que tengamos podemos contar siempre el uno con el otro, los quiero latosos.

A las personas maravillosas que en el tren de la vida me ha tocado conocer gracias por ser parte de mi vida, de este logro y por haber dejado un hermoso granito de arena, gracias por todos sus consejos, risas, apoyo, aventuras, motivaciones, travesuras, consuelos, enseñanzas, pero sobre todo gracias por ayudarme a ser una mejor persona, tienen un lugar en mi corazón para siempre, Jorge, Pablo "mi compadre", "Yayis", "Yare", "Dianita", Alexis "Rex", "Francis", "Brendita", "Gus", Juan Carlos "Charly", "José", "Mau", "Liz", Karen, Selene, Juan Carlos "Capi", a mis primos Adrián y Carlos, chicos son lo máximo gracias por creer en mí.

AGRADECIMIENTOS ACADEMICOS

En primer lugar quiero agradecer a la máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la oportunidad de pertenecer a esta gran institución, y así mismo darme la posibilidad para desarrollarme tanto académica como culturalmente.

A mi querida Facultad la cual me dio todo, en la que pase los momentos más agradables y también los más duros, donde conocí a los maestros, doctores e ingenieros que me enseñaron el valor y la importancia de la farmacia. Y de la cual siempre me sentiré orgulloso de llevar su nombre en alto.

A mi director de tesis el Dr. Salvador Fonseca Coronado por ser antes que todo un ejemplo a seguir y una persona a la que admiro profundamente. Gracias por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme trabajar a su lado, así como por compartir sus conocimientos, dedicarme su tiempo, tener la paciencia y el interés en mi desarrollo académico, gracias por convertirse en un amigo, creer en mí, alentarme a siempre ser mejor y contagiarme su pasión por la investigación.

Al M.C.B. Rubén Roberto González Fernández por todo el apoyo brindado y el tiempo que se tomó para explicarme y transmitirme sus conocimientos, con mucha amabilidad

A mis sinodales la M.C. Paola Briseño Lugo, al Q.F.B Ladislao Palomar Morales, al M.C. Victor Hugo Vazquez Valadez, al L.F. Miguel Ángel Trejo Rodríguez por su apoyo, comprensión y observaciones.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	9
INDICE DE TABLAS	9
ABREVIATURAS	11
Resumen.....	12
1. Introducción.....	13
2. Antecedentes.....	15
2.1 Historia	15
3. Virus.....	17
3.1 Agente etiológico.....	17
3.2 Ciclo de replicación de Zika virus.....	20
3.3 Signos y síntomas.....	21
3.4 Síndrome de Guillain-Barré	24
3.5 Microcefalia.....	27
3.6 Síndrome congénito asociado a virus de Zika.....	30
4. Diagnóstico.....	33
5. Formas de transmisión.....	35
5.1 Vectorial	35
5.1.1 Picadura de mosquito.	35
5.2 No vectorial	36
5.2.1 Sexual.....	36

5.2.2 Perinatal y Congénita.	37
5.2.3 Transfusión sanguínea y por trasplante de órganos.	38
5.2.4 Transmisión por contacto con secreciones corporales: saliva y orina.	39
6. Epidemiología.....	40
6.1 Tropicismo.....	46
6.2 Permisividad de las células humanas a la infección por ZIKV.....	48
6.3 Dificultad para el aislamiento de ZIKV.....	51
6.4 Costo del virus ZIKA.....	51
7. Justificación.....	53
8. Hipótesis.....	54
9. Objetivos.....	54
9.1 Objetivo general.....	54
9.2 Objetivos particulares.....	54
10. Plan de trabajo.....	55
11. Materiales y métodos.....	56
12. Resultados.....	57
12.1 Línea celular AaG2.....	57
12.2 Línea Celular Vero.....	58
12.3 Determinación de condiciones de mantenimiento y crecimiento de líneas celulares.....	59
12.3.1 Pruebas de condiciones fisicoquímicas Línea Celular Vero.	59
12.3.2 Pruebas de condiciones fisicoquímicas Línea Celular AaG2.	60
12.3.3 Determinación de % de SFB de crecimiento en las líneas celulares.....	60
12.4 Preparación y selección de medios de cultivo para línea celular Vero.....	62
12.4.1 Preparación de DMEM.	62

12.4.2 Preparación de MEM.....	63
12.4.3 Prueba de esterilidad y de viabilidad de medios de cultivo.	65
12.4.4 Selección de medio Línea Celular Vero.....	66
12. 5 Crecimiento, pases y criogenización celular.....	67
12.5.1 Crecimiento y pase de células VERO.....	67
12.5.2 Crecimiento y pase de células AaG2.....	68
12.5.3 Criogenización celular.....	68
12.6 Pruebas de infección de cultivos celulares confluentes bajo las condiciones predeterminadas.....	69
12.7 Titulación viral por formación de placas.....	71
13. Discusión.....	77
14. Conclusiones.....	83
15. Perspectivas.....	84
16. Referencias.....	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Bosque de Zika.	15
<i>Figura 2. Estructura del virus Zika.</i>)	19
Figura 3. Diagrama general del ciclo de vida del virus.	20
<i>Figura 4. Genoma del virus Zika.</i>	21
Figura 5. Síntomas asociados a la enfermedad por Zika.)	23
Figura 6. Afectación de células de Schwann por el Síndrome de Guillian Barre	24
Figura 7 Casos confirmados de Zika y de Guillain-Barre en México	26
Figura 8. Mecanismo de infección de la madre al niño. Adaptado de: (Noor, 2018)..	28
Figura 9. Infante con Microcefalia. (WHO, 2016).	30
Figura 10. Terapia a bebé con microcefalia.	31
Figura 11. Diagnóstico de microcefalia causado por Zika.)	34
Figura 12. Fotografía de Aedes Aegypti.	35
Figura 13. Mapa de áreas con riesgo de infección por ZIKV.	41
Figura 14 . Mapa de áreas con riesgo de infección por ZIKV.	47
Figura 15. Carga viral de ZIKV en líneas celulares humanas.	49
Figura 16. Carga viral de ZIKV en líneas celulares no humanas.	50
Figura 17. Preparación del medio de cultivo DMEM.	63
Figura 18. Preparación de medio de cultivo MEM.	65
Figura 19. Ensayo de infección de Zika en la línea celular AaG2.	70
Figura 20. Ensayo de infección de Zika en la línea celular Vero.	70
Figura 21. Botella de cultivo celular.	71
Figura 22. Monocapa confluyente de titulación viral por UFP.	72
Figura 23. Esquema de la titulación de ZIKV por ensayo en placas líticas.	73
Figura 24. Diluciones virales para titulación por placa.	73
Figura 25. Titulación de ZIKV por ensayo en placas líticas.	74
Figura 26. Placas por infección por ZIKV MXN en línea celular Vero.	76

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Síntomas clínicos de la Infección por Dengue, Chikungunya y Zika.....	22
Tabla 2 Malformaciones asociadas a ZIKV.....	32
Tabla 3. Datos bibliográficos de la línea celular AaG2.	57
Tabla 4. Condiciones de incubación de la línea celular AaG2.....	58
Tabla 5 Datos bibliográficos de la línea celular Vero.	58
Tabla 6 Condiciones de incubación de la línea celular Vero.....	59
Tabla 7. Condiciones fisicoquímicas de crecimiento de línea celular Vero.....	60
Tabla 8. Condiciones fisicoquímicas de crecimiento de línea celular AaG2.	60
Tabla 9. Porcentaje de SFB en línea celular Vero.....	61
Tabla 10. Porcentaje de SFB en línea celular Vero	61
Tabla 11. Evaluación de la línea celular Vero en DMEM.....	66
Tabla 12. Evaluación de la línea celular Vero en MEM.....	66
Tabla 13. Condiciones de crecimiento de la línea celular AaG2.	67
Tabla 14. Condiciones de crecimiento de la línea celular Vero.....	67
Tabla 15. Titulación de placas en células AaG2.	75
Tabla 16. Titulación de placas en células Vero.....	75

ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
CHIKV	Virus de Chikungunya
DENV	Virus del Dengue
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECP	Efecto citopático
EUA	Estados Unidos de América
GBS	Síndrome de Guillain-Barré
InDRE	Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
INPer	Instituto Nacional de Perinatología
JEV	Virus de la Encefalitis japonesa
NFP	Reglamento Sanitario Internacional
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PFN	Punto Focal Nacional
PFU	Unidades Formadoras de Placa
PIB	Producto Interno Bruto
Rd-RP	RNA polimerasa dependiente de RNA
RT -PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa con Retro transcriptasa
SE	Semana Epidemiológica
SFB	Suero Fetal Bovino
ssRNA	Ácido Ribonucleico de cadena sencilla
SSF	Solución Salina Fisiológica
USD	Dólar americano
WNV	Virus del Nilo Occidental
YFV	Virus de la fiebre amarilla
ZIKV	Virus de Zika
ZIKV-AFR	Virus de Zika Africano
ZIKV-BR	Virus de Zika Brasileño
ZIKV MXN	Virus de Zika Mexicano

Resumen

El virus de Zika (ZIKV) es un *flavivirus* perteneciente a la familia *Flaviviridae*, transmitido a los humanos principalmente por mosquitos del género *Aedes* y descrito como un virus causante de infecciones agudas de curso no grave para la salud humana hasta hace algunos años; sin embargo, recientemente se ha asociado con casos de síndrome congénito y microcefalia, así como con el Síndrome de Guillan-Barré, aunado a la descripción de capacidad de transmisión por vía sexual. Lo anterior hace pertinente la profundización en el conocimiento de nuevos métodos y técnicas para la replicación del virus que tengan impacto en el conocimiento de los mecanismos de replicación, de interacción y de inmunopatología de la enfermedad que hasta ahora no han sido descritos en su totalidad. Una de las principales limitantes para el estudio de ZIKV es la dificultad que presenta para su aislamiento y crecimiento en cultivo celular *in vitro*. Es por ello que en este trabajo se estandarizaron dos métodos para la adaptación y replicación de aislados virales de origen mexicano en las líneas celulares Vero y AaG2 para la obtención de títulos virales elevados, adecuados para la realización de estudios sobre el patógeno. La línea celular Vero fue la más permisible para la adaptación y el crecimiento óptimo de ZIKV en condiciones controladas, en tanto que la línea celular AaG2 fue menos eficiente para la adaptación y manejo de los aislados mostrándose menos permisiva a la infección y con requerimientos de crecimiento más demandantes. Los aislados clínicos de ZIKV adaptados a crecer en condiciones *in vitro*, permiten obtener títulos altos, y contar con abasto para estudios de caracterización y descripción de los mecanismos inmunopatológicos de la enfermedad y sus complicaciones.

1. Introducción

El virus Zika (ZIKV) es el más reciente virus emergente con implicaciones serias en Salud Pública descrito después del virus de Ébola. Anteriormente el ZIKV sólo era asociado a una enfermedad leve; sin embargo, después de una actividad moderada durante seis décadas, surgió como una amenaza importante para la salud humana, con reportes de casos de asociación con anomalías fetales evidentes, microcefalia, complicaciones neurológicas graves y trastornos autoinmunes como el síndrome de Guillain-Barré (Al-Qahtani et al, 2016; Cao-Lormeau et al, 2016; Carteaux et al, 2016; Mlakar et al, 2016; Singh et al, 2016, 2017).

ZIKV es un arbovirus de la familia *Flaviviridae* (género flavivirus) es transmitido principalmente por mosquitos de los géneros *Aedes aegypti* y *A. albopictus*, con un potencial de propagación rápida (Musso y Gubler, 2016; Weaver et a., 2016). También existen reportes de otras vías de transmisión como la parenteral (transfusión sanguínea), la transmisión vertical y la transmisión sexual, sugiriendo que el virus es capaz de replicarse en células del tracto genital. (Faria, N. et.al, 2016; loos, S. et al, 2014; Hamel et. al, 2016; Siemann, D. et al, 2017). ZIKV es un virus envuelto, que posee (ssRNA) RNA monocatenario que está estrechamente relacionado con el virus del dengue (DENV), el virus de la fiebre amarilla (YFV) y el virus del Nilo Occidental (WNV) (Fajardo et al, 2016; Kruger, 2016).

El primer aislamiento de ZIKV fue de la sangre de un mono Rhesus del bosque de Zika en Uganda, el cual había sido colocado en una jaula como centinela por el Instituto de Investigación de Virus de fiebre amarilla en 1947 (Hayes, 2009). Posteriormente, fue aislado de mosquitos y en humanos en 1952 (Dick G. et al, 1952).

La enfermedad por ZIKV se caracteriza por un proceso febril agudo, acompañado de mialgias, astenia, artralgias, dolor retro-orbital, cefalea, edema, rash maculopapular, conjuntivitis, dolor de cabeza, aunque se ha reportado que cerca del 75 % de los casos son asintomáticos. La falta de vacunas y medicamentos

adecuados para el tratamiento por infección de ZIKV ha dado como respuesta un complicado control a las recientes epidemias. Puesto que los tratamientos existentes siguen siendo únicamente de apoyo para el control de los síntomas, es importante la investigación sobre posibles tratamientos, métodos accesibles y fáciles para su diagnóstico, así como la propagación de información y vigilancia en las zonas susceptibles a riesgos de epidemia. (Haug et al, 2016; Troncoso, 2016). Es así como este proyecto ofrece dos métodos para la propagación y crecimiento viral que sirven como base para obtener abastos a títulos virales elevados para la realización de los múltiples estudios que aún no se han investigado en relación a ZIKV, puesto que el aislamiento y la reproducción del mismo sigue siendo una tarea difícil para los investigadores. (Landry y St. George, 2017; Rather et al, 2017).

2. Antecedentes

2.1 Historia

ZIKV fue descubierto en 1947 en monos Rhesus que servían como centinela para un monitoreo de fiebre amarilla dentro del bosque de Zika en Uganda, posteriormente fue encontrado también en mosquitos *Aedes africanus*, capturados dentro del mismo bosque (Dick G., 1952).



Figura 1. Bosque de Zika. Lugar donde se aisló por primera vez el virus de Zika, ubicado cerca del Lago Victoria en Uganda, (ZIKV) en un mono Rhesus en 1947.

El virus fue reportado por primera vez en humanos en Uganda y en Tanzania en 1952. En 1961, en el Bosque Zika, se aislaron 12 cepas diferentes de ZIKV. Durante 1971-1975, se realizó un estudio en el que el 40 % de las personas examinadas tenían anticuerpos neutralizantes anti ZIKV. Hasta 1981, se habían registrado sólo 14 casos de la infección en África (CDC., 2016; Haddow, A. et al, 1964; Haque, U. et al, 2016; OMS., 2016). Sin embargo, en 1969 en Malasia, se aisló el virus en mosquitos *A. aegypti*, siendo el primer reporte de la presencia del virus fuera de África. Otros casos de infección en humanos fuera del continente africano ocurrieron en Indonesia en el año de 1977 (Musso, D. y Gruber, D., 2016; Petersen, L. et al, 2016; Yun, S. y Lee, Y., 2017).

En 2007 se presenta el primer gran brote en la isla de Yap, en Micronesia, durante el cual se reportaron casos de una enfermedad “similar al dengue” en la que los pacientes presentaban fiebre, rash, artralgias y conjuntivitis, estimando que

alrededor de 5 000 de los casi 7 000 habitantes estaban infectados con ZIKV, aunque solo el 19 % presentó signos y síntomas clásicos de la infección y por consiguiente se da un cambio drástico en la perspectiva de la Infección por ZIKV y un interés creciente por el mismo dada la poca información con la que se contaba hasta el momento (Duffy, M. et al, 2009; Musso, D. y Gruber, D., 2016; Yun, S. y Lee, Y., 2017).

Posteriormente se registró un brote en la Polinesia Francesa, que inició a final de octubre de 2013 con un reporte de alrededor de 10 000 casos, de los cuales 70 fueron graves, con complicaciones neurológicas (síndrome de Guillain Barré, meningoencefalitis) o autoinmunes (púrpura trombocitopénica, leucopenia). Se llevó a cabo una investigación para determinar la asociación entre estas complicaciones y la co-infección primaria o secundaria por otros flavivirus, especialmente el virus del dengue. Los vectores relacionados fueron *Aedes aegypti* y *Aedes polynesiensis*. En el 2014, se registraron también casos en Nueva Caledonia y en Islas Cook (Duffy, M et al, 2009).

Durante marzo de 2015 se reportaron los primeros casos de la enfermedad en el continente americano, específicamente en Brasil, donde se confirmó el primer caso autóctono de ZIKV y se estimó que durante ese año, el número de casos de ZIKV en Brasil fue de entre 500 000 y 1 500 000. Para septiembre del mismo año, se reportó un aumento en el número de infantes que nacían con microcefalia en las mismas regiones donde se reportaban casos de ZIKV, convirtiéndose en el primer país en reportar una asociación entre la microcefalia y la infección. Cabe señalar que, entre 2014 y 2015 existieron pequeños brotes de la enfermedad en otras islas del Pacífico como Nueva Caledonia, Isla de Pascua, Islas Cook y Samoa, que se asocian a la ruta de entrada del virus a América (Atif, M. et al, 2016; Musso, D. y Gruber, D., 2016; Faria, N. et al, 2016; Petersen, L. et al, 2016).

En el 2015 también, el Punto Focal Nacional (PFN) del Reglamento Sanitario Internacional (NFI) de México notificó a la OPS/ OMS la detección de dos casos de Zika autóctonos, casos en los que se confirmó la infección por medio de vectores, en los estados de Nuevo León y Chiapas. Las pruebas de diagnóstico (RT-PCR) se

realizaron en el laboratorio nacional de referencia, el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) en donde el primer caso autóctono confirmado de Zika fue en un residente de Monterrey, Nuevo León (OMS, 2017).

A partir del 2016 al 2018 la Secretaría de Salud de México ha reportado casos autóctonos confirmados en 27 de 32 estados que componen el territorio mexicano. Dentro de los estados más afectados y con mayor índice de casos se encuentran los estados de Yucatán, Colima, Guerrero, Veracruz y Quintana Roo (OMS, 2017, Secretaria de Salud, 2019).

3. Virus

3.1 Agente etiológico.

El virus Zika (ZIKV) es un arbovirus miembro de la familia Flaviviridae y el género Flavivirus. La estructura de ZIKV contiene una nucleocápside aproximadamente de 25-30 nm de diámetro rodeado de una bicapa lipídica que contiene a las proteínas de envoltura E y M (figura 2). El virión es de aproximadamente 40-70 nm de diámetro, con proyecciones superficiales que miden aproximadamente 5 a 10 nm. Las proteínas de la superficie están dispuestas en una simetría de icosaedro (Sirohi, D. et al, 2016). La estructura del virus Zika es similar a otros Flavivirus, como el virus del dengue y el virus del Nilo occidental. Su superficie exterior está revestida con una capa de proteínas de envoltura bien empaquetada.

El virus Zika tiene un genoma de RNA monocatenario de sentido positivo que tiene un tamaño de aproximadamente 11 Kb. Como se muestra en la figura 3, el virus consta de tres genes estructurales codificando la cápside icosaédrica (C), la membrana lipídica externa (M), y proteína de envoltura (E); y siete genes no estructurales (NS) que codifican para las proteínas NS1 (352 aminoácidos), NS2A (217 aminoácidos), NS2B (139 aminoácidos), NS3 (619 aminoácidos), NS4A (127 aminoácidos), NS4B (255 aminoácidos) y NS5 (904 aminoácidos) la cual es la

proteína viral más grande y cuyo extremo C-terminal tiene actividad de RNA polimerasa dependiente de RNA (Rd-RP) y el extremo N-terminal está implicado en la protección del RNA debido a su actividad de metil-transferasa. La región 3' UTR del genoma de ZIKV contiene aproximadamente 428 nucleótidos, incluidos 27 patrones de plegamiento que pueden estar implicados en el reconocimiento por factores celulares o virales, la traducción, la estabilización del genoma, el empaquetamiento de RNA y la ciclación. En 2007 se identificó y publicó el genoma completo de ZIKV. Hasta el momento, solo se ha identificado un serotipo circulante con dos principales linajes: asiático y africano (Faye, O. et al, 2014; Abushouk, A. et al, 2016; Dowd, K. et al, 2016; Hamel, R. et al, 2016; Musso, D. y Gluber, D., 2016; Olagnier, D. et al, 2016; Shastry, S. et al, 2016; Sirohi, D. et al, 2016; Dyer, O. 2016;).

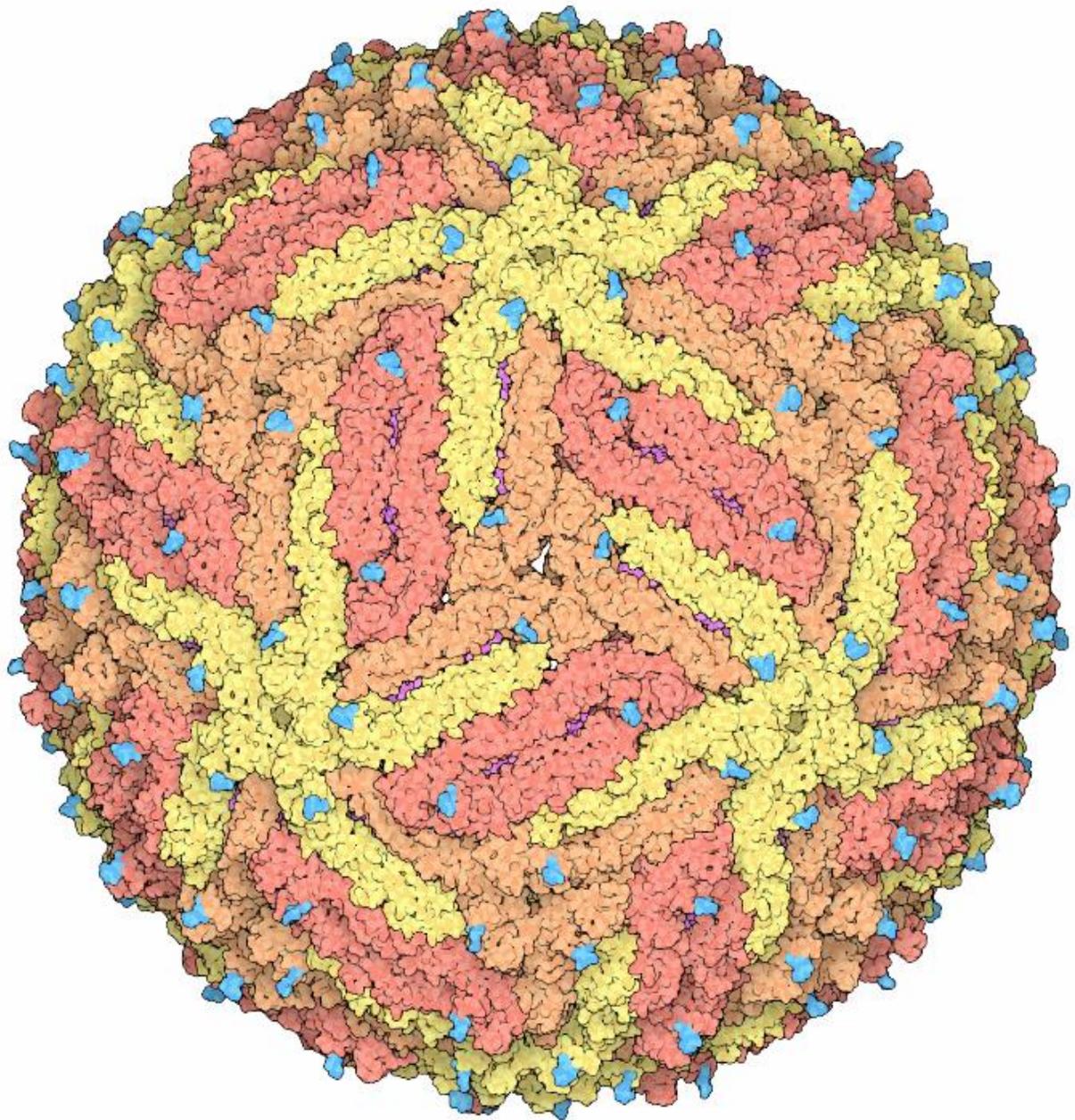


Figura 2. Estructura del virus Zika. (PBD, 2016).

3.2 Ciclo de replicación de Zika virus.

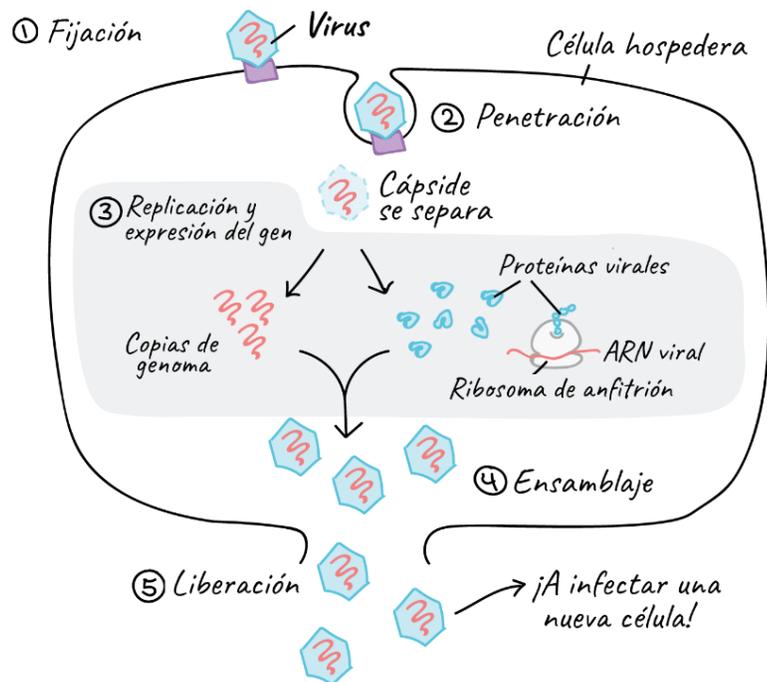


Figura 3. Diagrama general del ciclo de vida del virus.

La entrada del virus Zika a la célula hospedera está principalmente mediada por la proteína E, presente en la envoltura viral, que se une a receptores específicos que permiten la fijación y fusión de la partícula viral a la célula del huésped. Mediante el proceso de endocitosis, el virión entra en el citoplasma de las células. Después, la membrana viral se fusiona con la membrana endosomal y el RNA de cadena sencilla (ssRNA) se libera en el citoplasma de la célula infectada. Las proteínas no estructurales se unen al retículo endoplásmico, donde forman un complejo que permite la replicación del RNA viral. El RNA del virión es infeccioso y actúa como RNA mensajero (mRNA) y genoma viral (Faizan, I. et al, 2017; Meertens, L. et al, 2017). La replicación se produce principalmente en el citoplasma; sin embargo, se ha detectado RNA viral en el núcleo de la célula. Durante la replicación se produce RNA de doble cadena (dsRNA), el cual sirve como molde para transcribir nuevos ssRNA que se ensamblan junto con las proteínas virales dentro del retículo endoplasmático para formar nuevos viriones. Los viriones se transfieren al aparato de Golgi, mientras que las células se someten a un proceso de apoptosis y autofagia,

produciendo la liberación de las partículas del virus, que llega a espacios intracelulares y posteriormente al sistema linfático y a la sangre, desde donde el virus se disemina, produciendo las manifestaciones clínicas (Atif, M. et al, 2016; Hajra A et al, 2016; Hamel, R. et al, 2016; Olgarnier, D. et al, 2016; Salinas. S. y et al 2016; Yun, S. y Lee, Y., 2017).

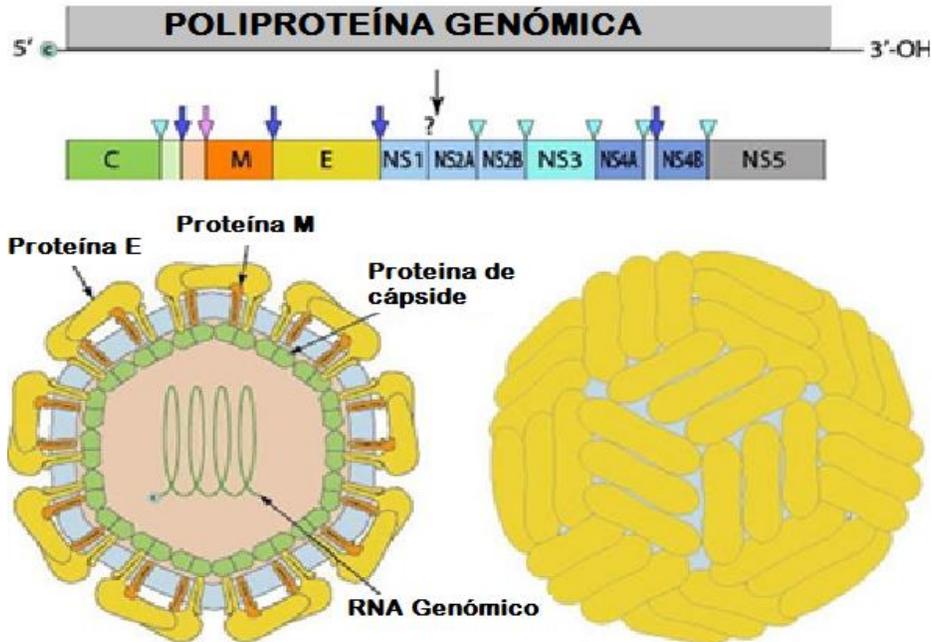


Figura 4. Genoma del virus Zika. El virus de Zika consta de tres genes estructurales que codifican la cápside (designada como **C**, 105 aa), la membrana (designada como **M**, 187 aa) y la envoltura (designado como **E**, 505 aa); y siete genes no estructurales que codifican **NS1** (352 aa), **NS2A** (217 aa), **NS2B** (139 aa), **NS3** (619 aa), **NS4A** (127 aa), **NS4B** (255 aa) y **NS5** (904 aa) (Dyer.O 2016).

3.3 Signos y síntomas.

La presentación clínica de la enfermedad por ZIKV, es muy similar a la producida por otros arbovirus como el virus del Dengue o Chikungunya, por lo que la correcta interpretación de los signos y síntomas resulta primordial para el diagnóstico clínico diferencial en la tabla 1 mostrada a continuación se muestra una comparativa de la

sintomatología que se ha reportado en casos clínicos entre DENV, CHIKV y ZIKV (loos, S, 2014; OPS, 2015).

Tabla 1. Síntomas clínicos de la Infección por Dengue, Chikungunya y Zika.

SINTOMAS	DENV	CHIKV	ZIKV
Fiebre	++++	+++	+++
Mialgia/artralgia	++	++++	++
Edema en extremidades	0	0	++
Exantema maculopapular	++	++	+++
Dolor retro-orbital	++	+	++
Conjuntivitis	0	+	+++
Linfoadenopatias	++	++	+
Hepatomegalia	0	+++	0
Leucopenia/Trombocitopenia	+++	+++	0
Hemorragia	+	0	0

El periodo de incubación del virus en el hospedero humano va de 3 a 12 días posteriores al momento de la picadura de un mosquito infectado y usualmente los síntomas se presentan durante 2 a 7 días, aunque el 75 % de los casos son asintomáticos. En los casos sintomáticos, con enfermedad moderada los síntomas se establecen de forma aguda, e incluyen: fiebre, conjuntivitis no purulenta, cefalea, mialgia y artralgia, astenia, exantema maculopapular, edema en miembros inferiores, edema de extremidades, fiebre moderada, dolor de cabeza, prurito, vértigo, mialgia y desórdenes digestivos y, menos frecuentemente, dolor retro-orbital, anorexia, vómito, diarrea, o dolor abdominal. Los síntomas duran de 4 a 7 días, y son auto limitados; los síntomas desaparecen de forma gradual y las complicaciones u hospitalización del paciente ocurre en raras ocasiones, a diferencia de dengue o fiebre amarilla donde la evolución a formas clínicas graves es más frecuente. Hasta el momento el tratamiento para la infección por ZIKV es solo sintomático y de soporte, ya que no existe vacuna o tratamiento antiviral específico (loos, S., et al, 2014; Atif, M. et al, 2016; Fauci, A. y Morens, D., 2016; Sampathkumar, P. y Sanchez, J., 2016).



Figura 5. Síntomas asociados a la enfermedad por Zika. (CDC, 2017)

El método más efectivo para detener la transmisión es el de control del vector, que consiste en disminuir el número de mosquitos mediante la eliminación de sitios de ovoposición (como fosos, depósitos de agua, llantas usadas, etc.) y el uso de insecticidas y pesticidas para eliminar las larvas del mosquito en agua estancada. La protección individual también es importante e incluye: usar pantalones largos y ropa de colores claros, así como playeras de manga larga y sombreros, usar repelentes para la piel y el uso de mosquiteros en casa para evitar el contacto con el mosquito vector (Sampathkumar, P. y Sanchez, J., 2016).

Aunque la enfermedad es leve y auto limitada, se ha relacionado con graves complicaciones neurológicas (Anaya JM., 2016). Debido al aumento en el número de casos de microcefalia, Síndrome de Guillain Barré (SGB) y Síndrome congénito, los cuales coinciden espacial y temporalmente con los recientes brotes, se declaró en febrero de 2016 por la Organización Mundial de la Salud como una emergencia de salud pública internacional (Krauer, F. et al, 2017).

3.4 Síndrome de Guillain-Barré

El síndrome de Guillain Barré (SGB) es una enfermedad inflamatoria y autoinmune del sistema nervioso periférico con parálisis ascendente. Esta enfermedad esta mediada por mecanismos inmunes que afectan fundamentalmente la mielina y los axones en el SNP en el que se ha constatado depósitos de inmunoglobulina y complemento en las superficies de los axones y las células de Schwann acompañado de infiltración de macrófagos y linfocitos T.

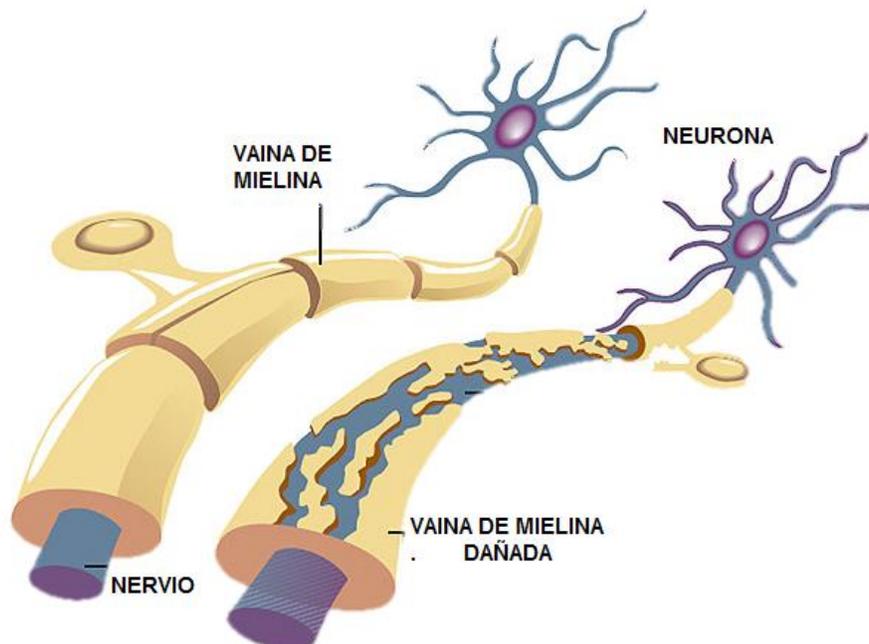


Figura 6. Afectación de células de Schwann por el Síndrome de Guillain Barre

Los síntomas suelen durar pocas semanas y la mayoría de los casos se recuperan sin complicaciones neurológicas graves a largo plazo. Los primeros síntomas consisten en debilidad u hormigueo, que suelen empezar en las piernas y pueden extenderse a los brazos y la cara. En algunos casos puede producir parálisis de las piernas, los brazos o los músculos faciales. En el 20 % a 30 % de los casos se ven afectados los músculos torácicos, con lo que se dificulta la respiración. En los casos

graves pueden verse afectadas el habla y la deglución. Estos casos se consideran potencialmente mortales y deben tratarse en unidades de cuidados intensivos. La mayoría de los casos, incluso los más graves, se recuperan totalmente, aunque algunos siguen presentando debilidad. Cabe mencionar que solo 3 % a 5 % de los pacientes con el síndrome mueren por complicaciones como la parálisis de los músculos respiratorios, septicemia, trombosis pulmonar o paro cardíaco (Cao-Lormeau V., 2016).

Debido a que el síndrome de Guillain-Barré puede llegar a ser mortal, los pacientes deben ser hospitalizados para mantenerlos en observación y con las medidas de apoyo que pueden llegar a ser requeridas dentro de las cuales se incluyen el monitoreo de la respiración, la actividad cardíaca y la tensión arterial. Los pacientes con dificultad para respirar suelen necesitar ventilación asistida y deben recibir vigilancia para detectar complicaciones como arritmias, infecciones, trombosis e hipertensión o hipotensión. Es importante saber que no hay cura para el síndrome de Guillain-Barré, pero el tratamiento puede mejorar los síntomas y acortar su duración (Espinoza, M., 2017).

La asociación entre ZIKV y SGB fue reportada por primera vez en 2013 durante el brote en la Polinesia Francesa, en julio de 2015 Brasil y Colombia reportaron síndromes neurológicos en pacientes que habían cursado la enfermedad (Araujo, L. et al, 2016; Parra, B. et al, 2016). El SGB puede presentarse incluso semanas después de presentarse la infección (Puga T., Padrón S., Bravo P., 2003).

Durante el 2017, la Secretaría de Salud de México ha notificado un total de 1 131 casos de síndrome de Guillain-Barré (GBS) en todo el país. De ellos, 11 se confirmaron como asociados con el virus del Zika. La figura 7 muestra la distribución del SGB y los casos confirmados de Zika por semana epidemiológica. El ligero aumento de SGB observado entre la SE 31 y la SE 42 de 2016 coincide con el mismo aumento observado con los casos de Zika.

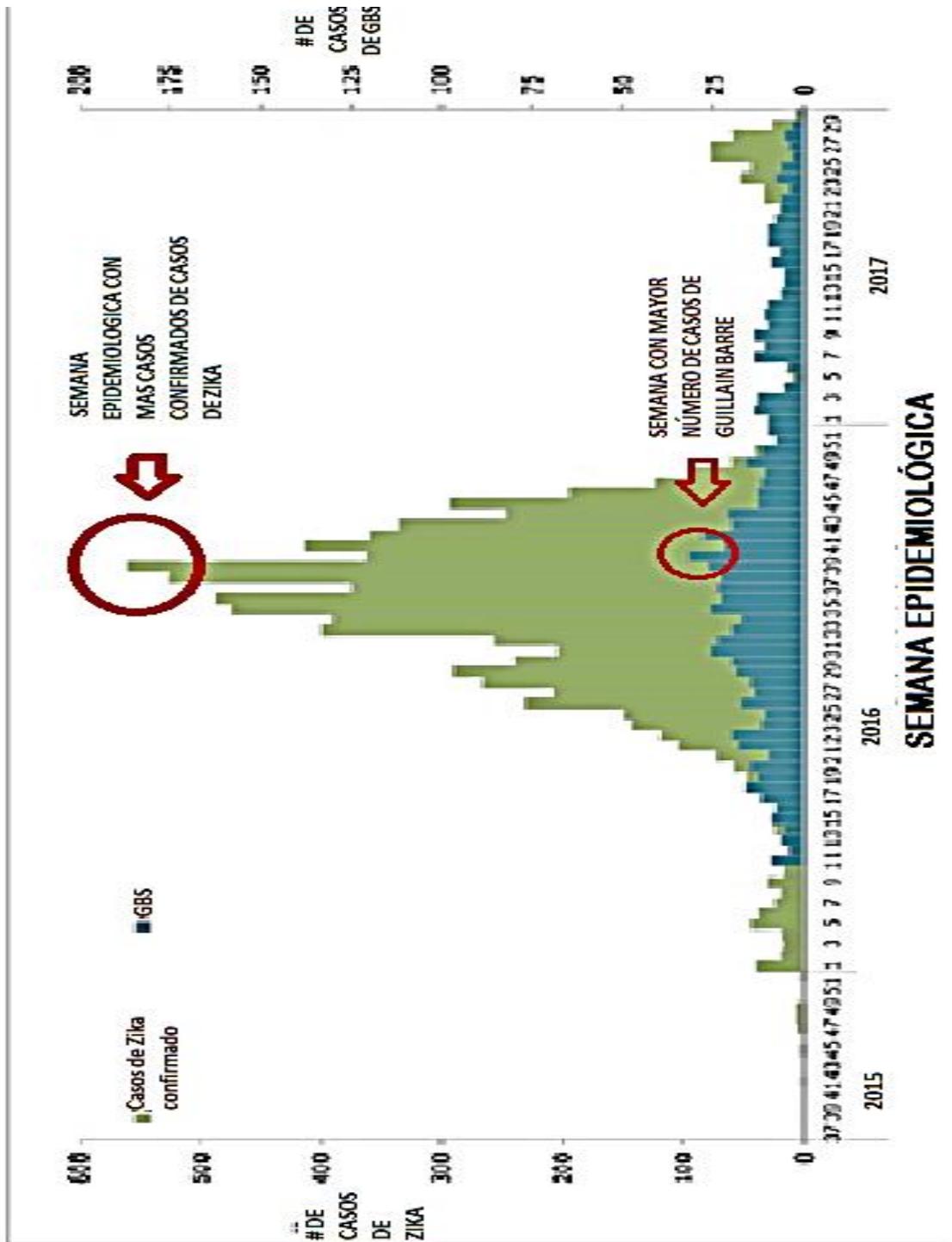


Figura 7. Casos confirmados de Zika y de Guillain-Barre en México del 2015-2017. Reportado por OPS/OMS por el Punto Focal Nacional (NFP) del Reglamento Sanitario Internacional de México (RSI) el 10 de agosto de 2017.

3.5 Microcefalia.

La microcefalia es una malformación en la que los recién nacidos nacen con una cabeza pequeña o esta deja de crecer después del parto. Los niños nacidos con microcefalia pueden tener convulsiones y presentar discapacidades físicas y de aprendizaje cuando crecen. En los humanos, la microcefalia representa un defecto congénito grave y junto con la mayoría de las anomalías congénitas, tiene mecanismos causales complejos que a menudo tiene etiologías multifactoriales. Se reconocen dos tipos: La primera ocurre cuando el cerebro no alcanza su tamaño apropiado durante el embarazo, alrededor de las 32 semanas del período de gestación, y es causada por una disminución gradual en la producción de neuronas. La segunda se refiere a un tamaño cerebral normal en el momento del nacimiento, pero no existe un crecimiento posterior debido a la pérdida de las conexiones dendríticas. Hasta el momento no se cuenta con un tratamiento específico para tratar la microcefalia (Faizan, I. et al, 2017; Singh, 2018; Rodriguez, A., 2016; Alvarado, M. y Schwartz, D., 2017; OMS,2018).

En la figura 8 se muestra el mecanismo de infección hasta ahora descrito, en la cual la madre embarazada se infecta con ZIKV, ya sea por picadura de mosquito, transfusión de sangre, de personas infectadas con Zika o contacto sexual sin protección con la pareja infectada con Zika. Después de ingresar a las mujeres embarazadas, los virus invaden el embrión y se adhieren a las células madre y se multiplican allí. Estas células madre infectadas proliferan para producir tipos celulares anormales. ZIKV también puede infectar las células progenitoras que, en última instancia, se suponía que producían células nerviosas que forman la corteza cerebral. Pero después de infectarse, las células progenitoras producen una corteza defectuosa que puede ser determinada por la disminución de la corteza y el tamaño de la cabeza. Tal condición se llama clínicamente microcefalia. Después del nacimiento, se pueden observar algunos síntomas en los bebés, como anomalías neurológicas, enanismo, distorsión facial, función motora retardada, etc.

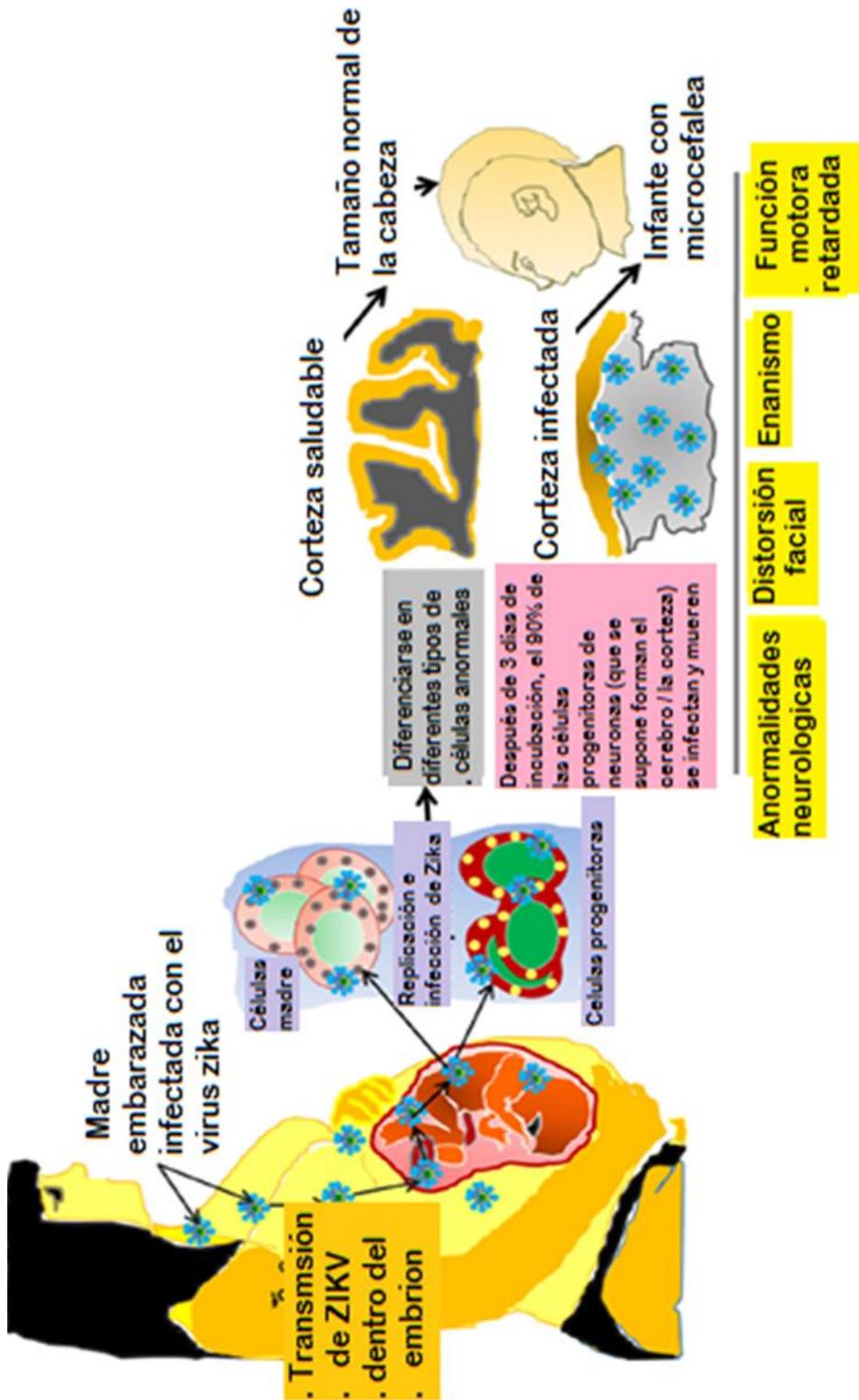


Figura 8. Mecanismo de infección de la madre al niño. Adaptado de: (Noor, 2018).

Desde la identificación del virus en el estado de Pernambuco (Brasil) a principios de 2015, un aumento en el número de niños con microcefalia se observó por primera vez en septiembre de 2015, un año después del reconocimiento de la transmisión de ZIKV en el país. El 17 de noviembre de 2015, el Ministerio de Salud de Brasil informo de la presencia de RNA de ZIKV en muestras de líquido amniótico tomado de dos mujeres embarazadas en el estado de Paraíba, cuyo feto mostro microcefalia, las dos madres tenían síntomas compatibles con la enfermedad ZIKV en la semanas 18 y 19 de gestación, en la semana 20 la ecografía reveló calcificación en los cerebros de los fetos y en la semana 28 es confirmado el diagnóstico de microcefalia; sin embargo, las muestras de suero y orina de las madres fueron negativos para la detección genómica de ZIKV, pero la amniocentesis fue positiva para ambos casos con una carga viral de 10 000 veces más alto que lo encontrado en la sangre de adultos con infección aguda y exantema (Liuzzi, G. et al 2016).

A principios de 2016, la tasa de incidencia de la microcefalia se incrementó 20 veces, llegando a 99.7 casos por cada 100 000 recién nacidos, de los cuales, 76 fueron decesos. La posible asociación del Zika con la microcefalia es controversial, ya que jamás se ha demostrado que los flavivirus causen defectos de nacimiento en seres humanos por lo que las investigaciones en Brasil y Colombia están en proceso; además que no existen informes de problemas durante el embarazo o durante el parto en el brote anterior en las Islas del Pacífico (Fernández, I., et al, 2016; Rasmussen, S., et al,2016; Scully y Robinson., 2016).

Según reporta la OMS en México el número mensual de casos de microcefalia por cada 100 000 nacimientos vivos fue significativamente más alto después de la introducción del virus que antes especialmente entre bebés de mujeres viviendo en altitudes menores a 2 200 m.



Figura 9. Infante con Microcefalia. (WHO, 2016).

3.6 Síndrome congénito asociado a virus de Zika.

A pesar de que la microcefalia ha sido de las complicaciones más estudiadas vinculadas al virus Zika, existen otras malformaciones fetales asociadas poco descritas que en conjunto se han denominado como síndrome congénito asociado a ZIKV (CZS).



Figura 10. Terapia a bebé con microcefalia. (Secretaría de Salud, 2018).

Este síndrome presenta características tales microcefalia severa en que el cráneo colapsa de forma parcial, tejido cerebral disminuido con un patrón específico de daño cerebral, articulaciones con limitaciones en el movimiento, como pie equinovaro, demasiada tonicidad muscular que restringe el movimiento del cuerpo apenas después del nacimiento, así como también una variedad de anomalías del desarrollo, que incluyen manifestaciones musculo esqueléticas, oculares, craneofaciales, genitourinarias, pulmonares y de otros tipos como problemas para alimentarse, dificultad para tragar, pérdida de la audición y convulsiones. (Tabla 2) (Coyne, C. y Lazear, H., 2016; Schwartz, D., 2017; CDC.,2018).

Tabla 2 Malformaciones asociadas a ZIKV. (Modificado de Alvarado, M. y Schwartz, D., 2017).

Nivel	Manifestaciones clínicas
Neurológico	Microcefalia
	Hidrocefalia
	Micracefalia
	Lisencefalia
	Polimicrogiria
	Pachygyria
	Agyria
	Holoprosencefalia
	Ventriculomegalia
	Anomalías del cuerpo calloso
	Calcificaciones intracerebrales
	Lesiones cerebrales destructivas
	Ocular
Anomalías del nervio óptico	
Maculopatías	
Anormalidades vasculares	
Músculo esquelético	Artrogriposis
	Anomalías craneofaciales (craneosinostosis)
	Pie deforme
	Displasia acetabular
Genitourinario	Criptorquidia
	Hipospadias
Otro	Restricción de crecimiento intrauterino
	Anasarca
	Hipoplasia pulmonar
	Arteria umbilical único

4. Diagnóstico

Aunque aún no se ha podido demostrar del todo la relación de ZIKV con enfermedades como GBS o el Síndrome Congénito, existe claramente una relación temporal entre el aumento de la notificación de casos de microcefalia y la epidemia de ZIKV, principalmente en el Nordeste de Brasil. Sin embargo, el desarrollo de técnicas diagnósticas que confirmen una relación de causa y efecto, los mecanismos de la patogénesis de la infección por ZIKV en el sistema nervioso central y criterios diagnósticos más adecuadamente definidos para la identificación de los casos de microcefalia que deben ser sometidos a investigación (Nunes, 2016).

Dado el contexto anterior, es de total relevancia la investigación de los mecanismos moleculares, celulares, de transmisión y epidemiológicos que permitan la asociación de la infección por ZIKV y los síndromes descritos. Hasta el momento se han realizado estudios de patogenicidad, capacidad infectiva y de diferentes aspectos clínicos, así como la implementación de técnicas moleculares de diagnóstico basados en RT-PCR diferencial de DENV y CHIKV, Sin embargo, existen aún múltiples aspectos de la infección que no han sido elucidados y cuya limitante ha sido la capacidad de aislamiento y propagación de virus provenientes de muestras clínicas (Raj, K., et al, 2018).

Desde 2007, más de 55 países en América, Asia, África, el Caribe y la región del Pacífico han reportado casos con GBS, lesiones retinales / oculares, y/ o aumento de la incidencia de microcefalia confirmada por RT -PCR, IgM ELISA, o pruebas serológicas neutralizantes basadas en anticuerpos (Carod-Artal, 2016; Pyzocha et al, 2017). En el caso de la microcefalia no hay pruebas específicas para determinar si un niño nacerá con microcefalia, aunque a veces la ecografía en el tercer trimestre permite identificar el problema (Singh, 2018; OMS, 2018).

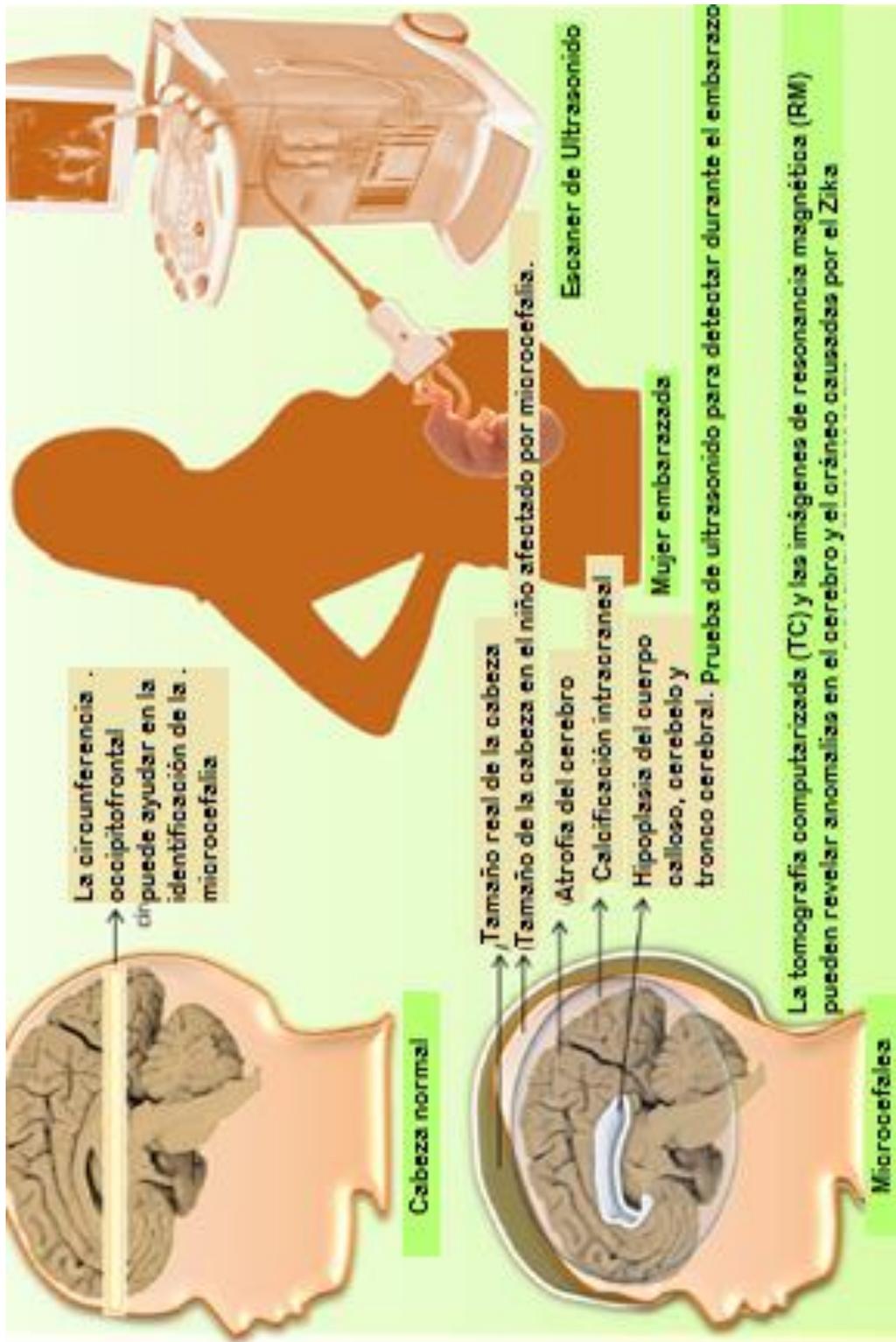


Figura 11. Diagnóstico de microcefalia causado por Zika. Modificado de (Singh, 2018).

5. Formas de transmisión

El virus tiene una gran capacidad para infectar diferentes tipos de células y tejidos con esto se abre la posibilidad a que este llegue a diferentes partes del cuerpo y con ello la facilidad para que la infección se dé a partir de diferentes formas de transmisión, dentro de las vías de transmisión podemos distinguir dos tipos las formas de transmisión vectoriales y las no vectoriales.

5.1 Vectorial

5.1.1 Picadura de mosquito.

La principal vía de transmisión de ZIKV es la transmisión vectorial a través de los mosquitos cuando el insecto pica a un ser humano, su pieza bucal busca a tientas un vaso sanguíneo. Al hacerlo, deposita partículas virales en la epidermis y la dermis de la víctima. Los mosquitos se infectan cuando pican y toman sangre que contiene ZIKV de un hospedero infectado. Los mosquitos que se han infectado pueden transmitir el virus a otro hospedero a través de la saliva la cual está cargada de virus (Monaghan, A. et al, 2016).



Figura 12. Fotografía de Aedes Aegypti. Principal vector de transmisión de ZIKV, picando a un ser humano.

Aunque se ha visto que el vector más importante en la transmisión del ZIKV es *A. aegypti*, el virus ha sido identificado en muchas especies, como *A. albopictus*, *A. africanus*, *A. apicoargenteus*, *A. vitattus*, *A. furcifer*, *A. luteocephalus*, y *A. hensilli*. Las diferentes especies de mosquitos *Aedes* diversas partes del mundo, por ejemplo, *A. Aegypti* se encuentra principalmente en las regiones tropicales y subtropicales, mientras que *A. albopictus* puede ser hallado en los países mediterráneos. *A. aegypti* es ampliamente distribuido en todo el continente americano, con excepción de Chile. *A. albopictus* generalmente se encuentra en las zonas rurales y cerca de las ciudades. Se alimentan de muchas aves y mamíferos. Se cree que los vectores urbanos *A. aegypti* y *A. albopictus* han participado en el ciclo urbano de la transmisión en África en el 2008. En las epidemias del Pacífico de 2007 a 2013, *A. helsiini* y *A. aegypti* eran vectores probables de ZIKV debido a su alta presencia en entornos domésticos durante los brotes (Ayres, C., 2016; Demir, T., Kilic, S., 2016; Fernández, I., Danis, R., Casas M., 2015).

5.2 No vectorial

Conforme se han presentado casos de infección por ZIKV a lo largo de las diversas epidemias, han ido surgiendo diferentes formas de transmisión del virus aparte de la transmisión por picadura de mosquito como la transmisión sexual, perinatal, congénita, por trasplante de sangre u órganos, y por contacto con secreciones corporales por saliva y orina.

5.2.1 Sexual.

En 2011, un informe de caso sugirió una ruta de transmisión viral no vectorial a través del contacto sexual cuando un científico estadounidense que trabajaba en Senegal regreso con su esposa a Colorado, E.U.A, quien a su vez mostró síntomas similares al Zika 9 días después del regreso de su marido. En diciembre de 2013,

se publicó el informe de caso que confirma la presencia de partículas virales en el semen de un hombre de 44 años que había sido diagnosticado con infección por ZIKV dos semanas antes, en este caso se hicieron pruebas moleculares para ZIKV dando resultado negativo en sangre, pero positivo en semen, lo que sugiere que existe replicación viral en el tracto genital (Musso, D. y cols., 2015). Las partículas virales replicativas, así como el RNA viral (a menudo con un alto número de copias), se han identificado en semen incluso si el paciente se ha realizado la vasectomía, se ha detectado la permanencia del virus hasta 93 días después del inicio de los síntomas (Atkinson, B. et al, 2016; Petersen, L. et al, 2016; Huits, R. et al, 2017) y la mayoría de los casos suelen presentarse durante los primeros 19 días del comienzo de los síntomas. Por el contrario, solo se ha informado del caso de un paciente de sexo femenino que presentó la infección 44 días después de que su pareja presentó los primeros síntomas. Además, está reportado que ZIKV puede transmitirse a través de sexo anal y vaginal, y se tiene la sospecha de que posiblemente también por sexo oral (Abushouk, A. et al, 2016; D'Ortenzio, E. et al, 2016).

Otros estudios *in vitro* han demostrado que además de los fibroblastos dérmicos humanos y los macrófagos placentarios, los fibroblastos uterinos (célula histioarquitectónica primaria del útero y el endometrio) también son permisivos a la infección por ZIKV, lo que fundamenta el hecho de la transmisión sexual en mujeres, aunque no se han descrito los mecanismos ni capacidad de persistencia viral (Chen, J. et al, 2016).

5.2.2 Perinatal y Congénita.

Las mujeres embarazadas son susceptibles a la infección por ZIKV principalmente en el primer trimestre del embarazo, la transmisión de ZIKV de madre a hijo puede ocurrir en el útero o perinatalmente (Atif, M. et al, 2016), lo que se confirmó por dos casos ocurridos en la Polinesia Francesa, donde se identificó la presencia de ZIKV

tanto en las madres como en los recién nacidos, uno de los recién nacidos presentaba síntomas característicos de la enfermedad mientras que el otro fue asintomático (Besnard, M. et al, 2014; Abushouk, A. et al, 2016). En 2017, Aagaard y colaboradores demostraron que ZIKV puede replicarse en trofoblastos placentarios humanos sin destrucción de la célula huésped, es decir, sirven como una especie de reservorio permisivo a la infección generando un riesgo latente de que el recién nacido presente alguna complicación neurológica o microcefalia. También existen reportes de que las células estromales endometriales, son altamente permisivas a la infección por ZIKV, siendo una fuente potencial de propagación del virus a los trofoblastos placentarios humanos durante el embarazo (Pagani, I. et al, 2017).

5.2.3 Transfusión sanguínea y por trasplante de órganos.

Durante el brote de ZIKV en la Polinesia Francesa, 42 de 1 505 donantes de sangre, que en el momento de la donación de sangre eran asintomáticos, se encontraron positivos para ZIKV por RT-PCR. En 2016, Barjas-Castro y sus colaboradores reportaron el caso de un hombre de 48 años que 3 días después de haber donado sangre comenzó a presentar síntomas de dengue, pruebas serológicas y moleculares descartaron infección por dengue, sin embargo, las muestras almacenadas de la donación fueron positivas por RT-PCR para ZIKV. Una investigación retrospectiva demostró que el concentrado de plaquetas de este donador se había transfundido a un paciente después de un trasplante de hígado. Al hacer pruebas moleculares al paciente transfundido, estas dieron un resultado positivo para ZIKV (Musso, D. et al, 2014; Marano G. et al, 2016).

5.2.4 Transmisión por contacto con secreciones corporales: saliva y orina.

Recientemente se ha aislado ZIKV de la saliva de un paciente, durante la infección aguda y se observó que la diseminación del virus se prolonga hasta por 29 días. En estudios realizados a pacientes portadores de la enfermedad, se obtuvo mayor frecuencia del virus en la saliva que en la sangre, además de que los títulos virales son más altos, esto cobra relevancia al determinar un diagnóstico puesto que es mucho menos invasivo y doloroso para el paciente obtener una muestra de saliva que de sangre y tiene mejores resultados por el título viral presente en esta secreción. (Liuzzi G, et al, 2016; Musso D, et al, 2015).

La orina es otro tipo de secreción que se utiliza cada vez más para la detección de una infección por ZIKV, especialmente en etapas posteriores de la infección. En principio, este fluido corporal también podría funcionar como medio de transporte. La primera detección de ZIKV en orina ocurrió en un país sin ZIKV transmitido por mosquitos, es decir, en un viajero japonés que regresa de Polinesia francesa en enero de 2014. Ella fue diagnosticada con enfermedad de Zika tras la detección de partículas de ZIKV en la orina mientras que el ARN viral fue negativo en la muestra de suero del 5to día después del inicio de los síntomas. Otros estudios han confirmado Estos hallazgos iniciales de que el ZIKV se puede detectar en la orina por más tiempo que en el suero, con una presencia de virus de hasta 29 o 30 días después del inicio de los síntomas (Gourinat, AC, et al, 2015).

6. Epidemiología

Los primeros casos de infección por Zika fueron reportados hasta 1952 después de 7 años del descubrimiento del virus estos casos se presentaron en el mismo sitio donde fue descubierto el virus en Uganda y la República Unida de Tanzania. Y en los subsiguientes fue reportado como causante de infecciones humanas esporádicas en África tropical y en algunas zonas del sudeste asiático. En el año 2007 se da la primera epidemia en la Isla de Yap en los Estados Federados de Micronesia, en donde el 75 % de la población fue infectada, poniendo así al virus como foco de interés para la investigación, ya que al haber prácticamente nula información del virus, por la poca importancia que hasta el momento se le había prestado, se complica el control de la infección después de esta epidemia reaparecen casos de infección por ZIKV todos reportados por transmisión de vector hasta el 2011; donde se presenta el primer caso por contagio humano a humano, el cual se cree fue transmitido por saliva, o transmisión sexual.

En el 2013 la Polinesia francesa sufrió el mayor brote de infecciones por el virus de Zika registrado hasta ahora en ese territorio. En ese periodo se investigó la posible infección de 32 000 pacientes (el 11.5 % de la población), y el sistema nacional de vigilancia notificó 8 750 casos sospechosos, de los cuales 383 se confirmaron posteriormente mediante RCP-RT. Consecuente a esto comienzan a reportarse casos en el continente americano en 2014, Chile reportó casos de transmisión de ZIKV en indígenas, y en 2015 se propagó a Brasil, para mayo del mismo año la Organización Panamericana de la Salud, confirmó la transmisión de ZIKV en el noroeste de Brasil.

MAPA DEL MUNDO DE AREAS CON RIESGO DE ZIKA

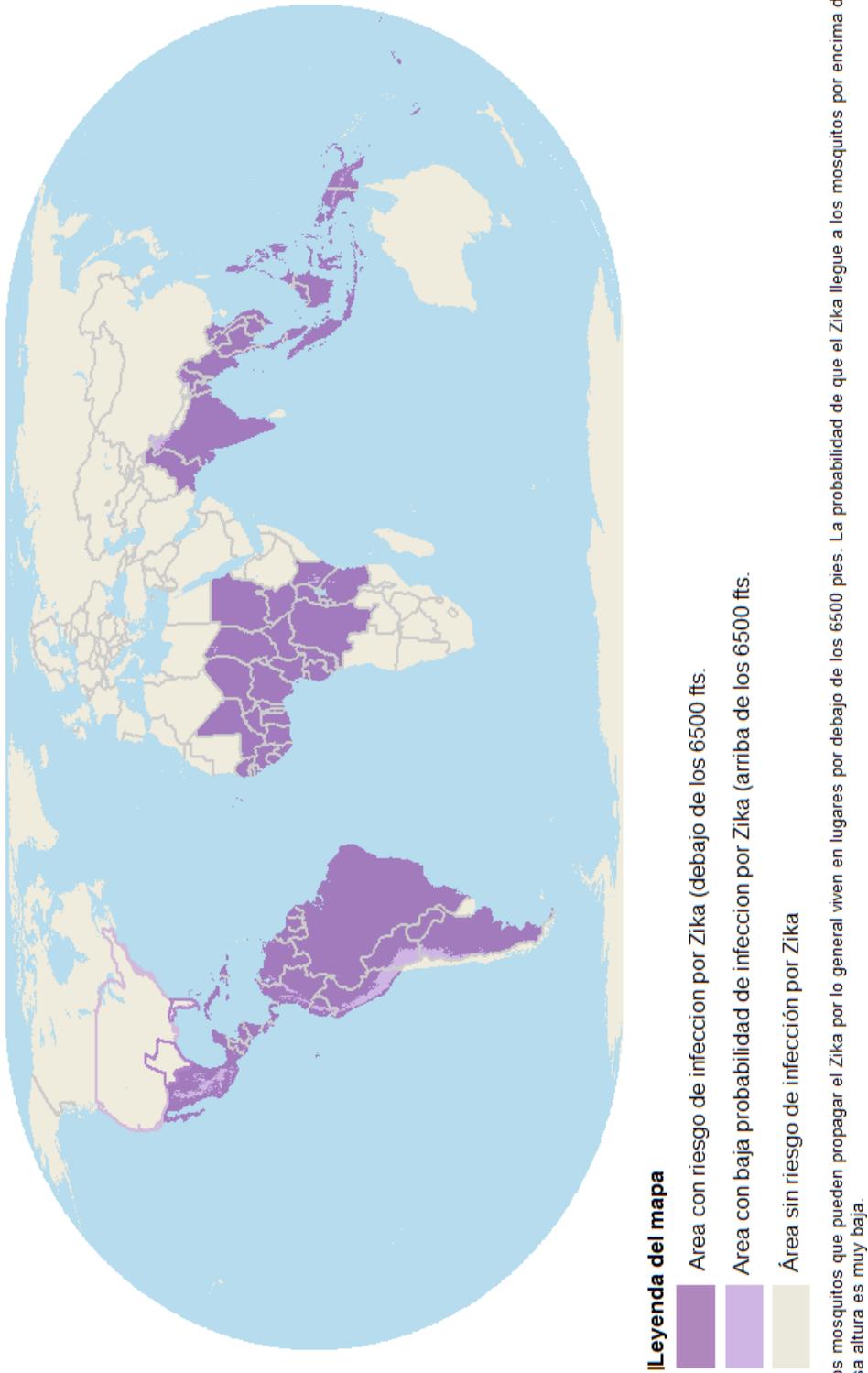


Figura 13. Mapa de áreas con riesgo de infección por ZIKV.

Desde octubre de 2015, otros países de las Américas han tenido reportes de Zika. En febrero de 2016, la transmisión de ZIKV ha tenido un reporte total de 44 países, del cual Brasil tiene el mayor número de casos (estimados entre 497 593 y 1 482 701 casos), Colombia, el área siguiente más afectada, tenía 20 297 casos reportados entre octubre 2015 y enero 2016. Dada la rápida propagación mundial de ZIKV y la pandemia actual en América Latina y el Caribe, ahora se considera como un agente infeccioso emergente. Hasta la fecha, la biología de la infección por ZIKV sigue siendo deficientemente entendida, en comparación con otros arbovirus emergentes como la fiebre amarilla, el dengue (DENV), Encefalitis japonesa (JEV) y Chikungunya (CHIKV) (CDC, 2016; Duffy M., Chen, T., Hancock, W., 2009; OMS., 2016; Tognarelli, J., Ulloas, S., Villagra, E., 2014).

Del 2015 al 2017 la Secretaría de Salud de México ha reportado casos autóctonos de ZIKV confirmados en 27 de 32 estados. Dentro de los estados que reportaron el mayor puntaje acumulado tasa de incidencia de casos fue Yucatán (61 casos por 100 000 habitantes), Colima (40 casos por 100 000), Guerrero (25 casos por 100 000), Veracruz (25 casos por 100 000) y Quintana Roo (24 casos por 100 000). Con el aumento de casos por Zika para presento el aumento en recién nacidos Síndrome congénito y pacientes con síndrome de Guillain Barre, Para el 2018 el número de casos confirmados en la población mexicana y el numero casos confirmados de enfermedades asociadas a Zika se muestran desglosados en la (Tabla 3) donde podemos observar que el número de casos durante el 2018 disminuyó notablemente en comparación al periodo del 2015 al 2017 en México en la mayoría de estados, en Sonora el caso es el contrario ya que hasta el momento durante el 2018 se han reportado 273 casos de Zika en comparación a los 84 casos presentados durante el periodo de 2005-2017 (OMS, 2017).

Tabla 3. Casos Confirmados Autóctonos por SIKV, México, 2015-2019.
(Secretaría de Salud, 2019).

Entidad Federativa	Casos Confirmados	Casos Confirmados	Total
	2015-2018	2019	
Aguascalientes	1	0	1
Baja California	3	0	3
Baja California Sur	111	0	111
Campeche	94	0	94
Coahuila	336	0	336
Colima	297	0	297
Chiapas	821	0	821
Durango	5	0	5
Guanajuato	5	0	5
Guerrero	887	0	887
Hidalgo	285	0	285
Jalisco	630	0	630
México	48	0	48
Michoacán	70	0	70
Morelos	509	0	509
Nayarit	706	0	706
Nuevo León	950	0	950
Oaxaca	517	0	517
Puebla	225	0	225
Querétaro	17	0	17
Quintana Roo	390	0	390
San Luis Potosí	532	0	532
Sinaloa	302	1	303
Sonora	433	0	433
Tabasco	375	0	375
Tamaulipas	802	0	802
Veracruz	2 103	0	2 103
Yucatán	1 325	0	1 325
Zacatecas	1	0	1
Total	12 780	1	12 781

Dentro de todos los casos clínicos reportados por la Secretaría de Salud hasta el 2018 en la Tabla 4 se observa de forma detallada los casos confirmados como autóctonos en mujeres embarazadas que es el punto de enfoque más sensible al

contagio debido a la implicaciones que la enfermedad puede implicar para él bebe se han confirmado hasta el momento 7 012 casos de los cuales solo 101 se reportaron durante el 2018 viendo una disminución notable entre los casos presentados en el periodo del 2015-2017.

Tabla 4. Casos Confirmados Autóctonos de ZIKV en Mujeres Embarazadas, México 2015-2019. (Secretaría de Salud, 2019)

Entidad Federativa	Casos Confirmados	Casos Confirmados	Total
	2015-2018	2019	
Baja California Sur	12	0	12
Campeche	55	0	55
Coahuila	177	0	177
Colima	204	0	204
Chiapas	562	0	562
Durango	1	0	1
Guerrero	481	0	481
Hidalgo	151	0	151
Jalisco	132	0	132
México	4	0	4
Michoacán	21	0	21
Morelos	322	0	322
Nayarit	383	0	383
Nuevo León	679	0	679
Oaxaca	211	0	211
Puebla	72	0	72
Querétaro	5	0	5
Quintana Roo	334	0	334
San Luis Potosí	416	0	416
Sinaloa	73	0	73
Sonora	27	0	27
Tabasco	286	0	286
Tamaulipas	692	0	692
Veracruz	888	0	888
Yucatán	926	0	926
Zacatecas	1	0	1
Total	7 115	0	7 115

Tabla 5 Casos de Síndrome Congénito asociado a ZIKV en México

Caso	Trimestre de infección de la madre	Entidad federativa	Institución que realizó seguimiento y reporte	Diagnóstico	Estado del paciente
1	No presentó cuadro clínico durante el embarazo	Oaxaca	INPer	Sx congénito asociado a Zika + Microcefalia	Falleció 05/Nov/2016
2	Primero	Veracruz	INPer	Sx congénito asociado a Zika + Microcefalia	Vivo
3	Primero	Veracruz	INPer	Sx congénito asociado a Zika + Macrocefalia	Vivo
4	Primero	Veracruz	INPer	Sx congénito asociado a Zika + Hidrocefalia	Falleció 08/Dic/2016
5	Primero	Chiapas	INPer	Sx congénito asociado a Zika + Microcefalia	Vivo
6	No presentó cuadro clínico durante el embarazo	Guerrero	INPer	Sx congénito asociado a Zika + Microcefalia	Vivo
7	No presentó cuadro clínico durante el embarazo	Oaxaca	Hospital de la mujer y neonatología de Tehuacán. Secretaría de Salud	Sx congénito asociado a Zika + Microcefalia	Vivo
8	Primero	Hidalgo	Hospital Regional Valle de Mezquital. Secretaría de Salud	Sx congénito asociado a Zika + Anencefalia	Mortinato 25/Feb/2017

Los casos de Síndrome de Guillian Barré que se han registrado en México (Tabla 6) han sido 19 hasta el 2018 confirmados por técnicas de laboratorio de PCR la mayoría de los casos se presentaron en la zona sur del país siendo esta una zona muy amigable con el vector, dentro de los casos registrados se puede observar también que la mayor parte de la población afectada se tratan de adultos hombres.

Tabla 6 Casos confirmados de SGB asociado a ZIKV en México.

Caso	Edad	Sexo	Entidad federativa de infección	Institución que realizó seguimiento y reporte	Diagnóstico	Estado del paciente
1	5	F	Chiapas	Secretaría de Salud	PCR	Vivo
2	5	M	Tabasco	Secretaría de Salud	PCR	Vivo
3	6	F	Tabasco	Secretaría de Salud	PCR	Vivo
4	48	M	Guerrero	Secretaría de Salud	PCR	Vivo
5	59	F	Chiapas	ISSTECH	PCR	Vivo
6	37	M	Chiapas	Instituto Mexicano del Seguro Social	PCR	Vivo
7	26	M	Quintana Roo	Hospital Privado	PCR	Vivo
8	39	F	Guerrero	Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía	PCR	Vivo
9	25	M	Michoacán	Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía	PCR	Vivo
10	60	M	Guerrero	Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía	PCR	Vivo
11	45	F	Veracruz	Instituto Mexicano del Seguro Social	PCR	Vivo
12	75	M	Guerrero	Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía	PCR	Vivo
13	39	F	Veracruz	Secretaría de Salud	PCR	Vivo
14	16	M	Guerrero	Secretaría de Salud	PCR	Vivo
15	37	M	Guerrero	Secretaría de Salud	PCR	Vivo
16	36	M	Sin precisión, notificado por Estado de México	Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía	PCR	Vivo
17	57	M	Yucatán	ISSSTECALI, Baja California	PCR	Vivo
18	50	M	Morelos	Instituto Mexicano del Seguro Social	PCR	Vivo
19	9	M	Morelos	Instituto Mexicano del Seguro Social	PCR	Vivo

6.1 Tropicismo

ZIKV exhibe un amplio tropismo y persistencia en los tejidos y fluidos corporales, lo que contribuye a las manifestaciones clínicas y epidemiología observada durante la epidemia actual.



Figura 14 . Mapa de áreas con riesgo de infección por ZIKV.

Los estudios en humanos y modelos animales (ratones y primates no humanos) han detectado ZIKV en células de la placenta, incluidas células de Hofbauer (*in vitro* y en explantación) tejido placentario humano), trofoblastos (ratones, primates no humanos y humanos) y células endoteliales (*in vitro* en tejido placentario humano explantado e *in vivo* en placenta de ratones). Otras dianas celulares de ZIKV incluyen tipos de células neuronales, incluyendo células progenitoras neuronales y neuronas maduras (ratones, primates no humanos y humanos) y astrocitos (cultivos de células humanas *in vitro*). Además, el ZIKV infecta los tejidos oculares, incluida la córnea, la retina neurosensorial y el nervio óptico (ratones), como, así como el humor acuoso de la cámara anterior (humanos). ZIKV también ataca las células del tracto reproductivo, incluidas las células espermatogonias, Sertoli y Leydig, células (en el testículo de ratones), espermatozoides (muestras de ratones y seres humanos) y el epitelio vaginal (ratones) y fibroblastos uterinos (infección *in vitro* de muestras humanas).

El extenso tropismo da como resultado la detección de ZIKV en múltiples fluidos corporales, incluidos el líquido conjuntival o lágrimas (ratones y humanos), saliva (primates no humanos y humanos), semen (ratones, primates no humanos y

humanos), moco cervical (humanos), lavados vaginales (ratones y humanos) y orina (primates no humanos y humanos) (Miner, 2017).

6.2 Permisividad de las células humanas a la infección por ZIKV

Se sabe que diferentes tipos de células, como los fibroblastos, queratinocitos epidérmicos, células dendríticas, macrófagos, células endoteliales, células de Sertoli, trofoblastos, células de Leydig y neuronas, son permisivas a la infección por ZIKV (Hamel et al, 2015; Chen, J. et al, 2016; Liu, S. et al, 2016; Rajah, M. et al, 2016; Faizan, I. et al, 2017; Kumar, A. et al, 2018; Siemann, D. et al, 2017).

En 2016, Chan y colaboradores evaluaron la susceptibilidad de 18 líneas celulares humanas y 15 líneas celulares no humanas a la infección por ZIKV encontrando que existe replicación activa de ZIKV en las líneas celulares de placenta (JEG-3), neuronal (SF268), músculo (RD), de retina (ARPE19), pulmonares (Hep-2 y HFL), de colon (Caco-2) y hepática (Huh-7). Asimismo, reportaron que las líneas celulares de próstata (LNCaP), testicular (833KE) y renal (HEK) mostraron un aumento en la carga viral de ZIKV y/o expresión de proteína NS1 sin inducir ECP, lo que sugiere su posible papel en la transmisión sexual con replicación viral en estos sitios anatómicos (Figura 5). Entre las líneas celulares no humanas, células de primate (Vero y LLC-MK2), cerdo (PK-15), conejo (RK-13), hámster (BHK21) y pollo (DF-1) soportaron la replicación activa de ZIKV, por lo que estas especies animales podrían utilizarse como modelos experimentales de infección para el mantenimiento y propagación de ZIKV (Figura 16).

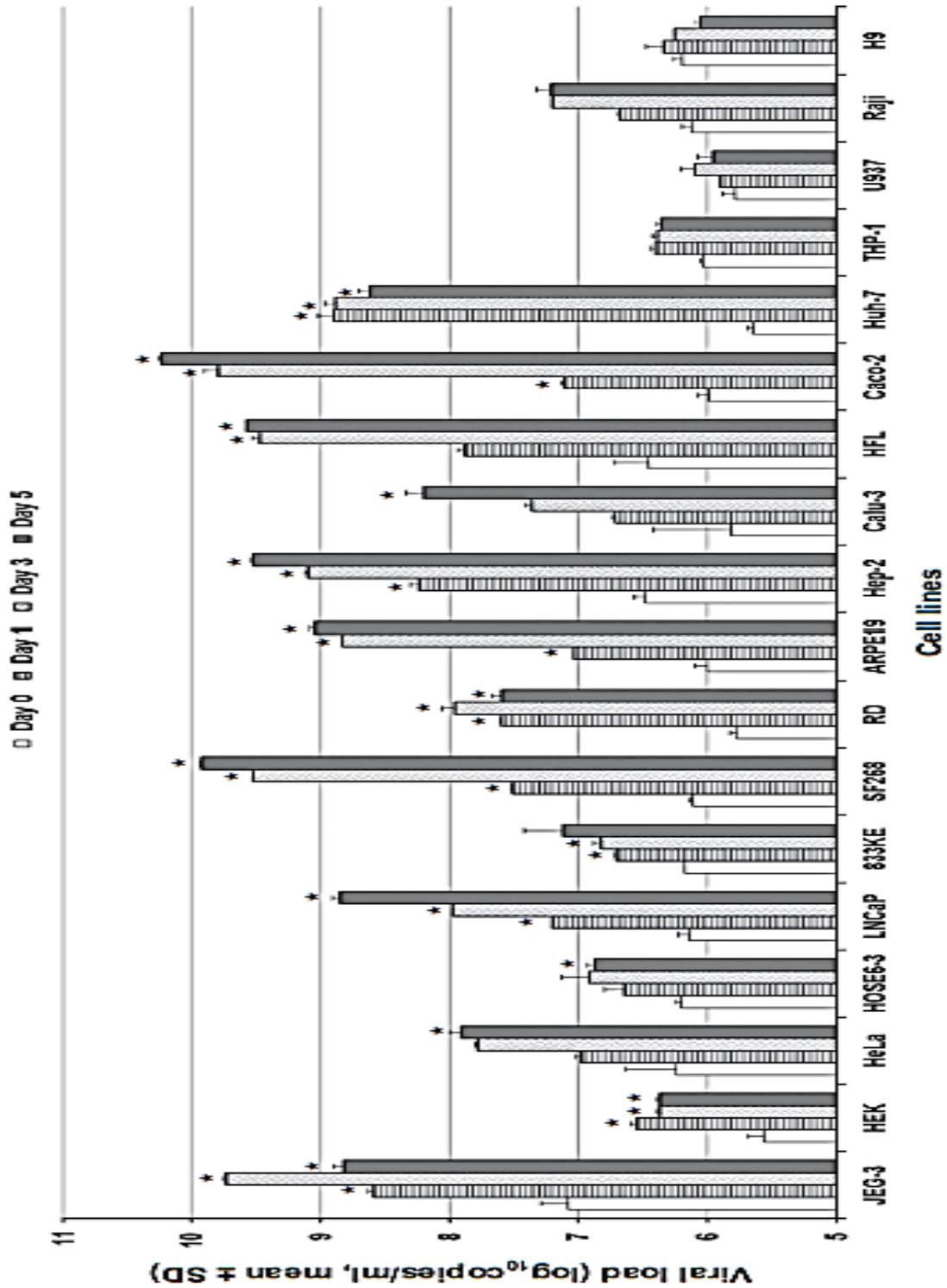


Figura 15. Carga viral de ZIKV en líneas celulares humanas. (Chan, J. et al, 2016).

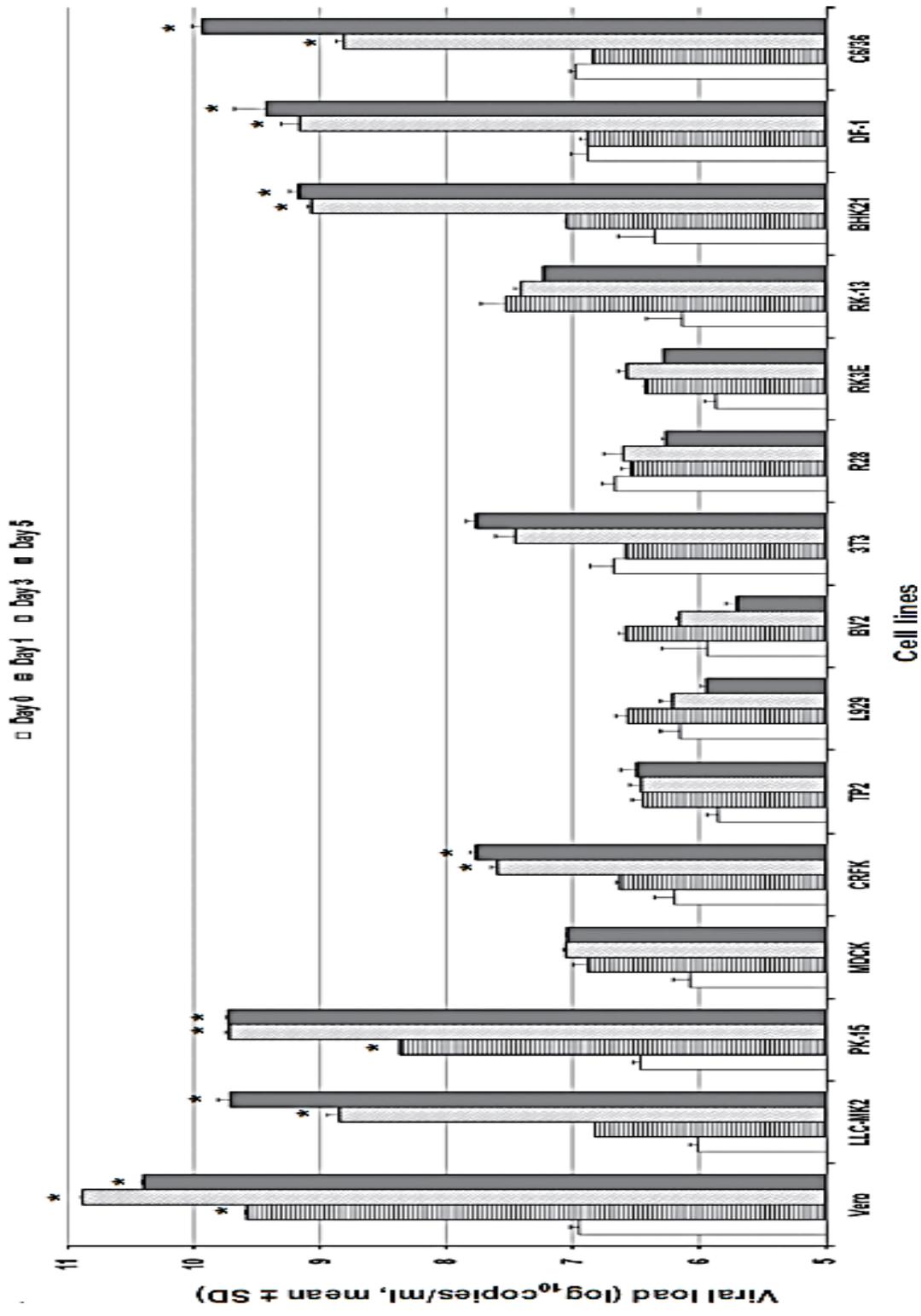


Figura 16. Carga viral de ZIKV en líneas celulares no humanas. (Chan, J. et al, 2016).

6.3 Dificultad para el aislamiento de ZIKV

A pesar de el gran número de casos clínicos que existen y han surgido hasta el momento, la propagación y el aislamiento de ZIKV sigue siendo un desafío, puesto que no se ha logrado crear una técnica estandarizada que permita la producción de ZIKV a escala con el fin de obtener títulos altos del virus tanto para la producción de vacunas y tratamientos, como para fines de investigación; dado que las diferentes cepas tienden a tener comportamientos diferentes en el mantenimiento *in vitro* de estas, porque la manipulación y el mantenimiento de la cepa es un reto actual para los investigadores, dado que también es importante considerar y evaluar críticamente el diseño de procesos productivos.

Dado que se ha encontrado que los rendimientos máximos de virus varían en dos órdenes de magnitud, lo que indica una fuerte influencia impulsada por su diferentes orígenes e historias (paciente, región, historia de la muestra), cabe además destacar que los resultados sugieren que los aislados deben ser elegidos cuidadosamente para la producción de grandes cantidades de virus. Puesto que las propiedades del sistema de la célula huésped y los rendimientos específicos de la célula deben tener una adecuada adaptación de aislados de virus, así como la identificación de las condiciones óptimas para estas. Así mismo las condiciones de infección, y la elección de los medios puede permitir mejorar los rendimientos de las cepas actuales de ZIKV (Coelho, et al, 2017).

6.4 Costo del virus ZIKA

El ZIKA además de tener fuertes implicaciones de salud en los pacientes infectados conlleva a pérdidas económicas. El Banco Mundial (BM) ha calculado el posible costo de un brote de virus Zika en unos USD \$ 3 500 millones para los países de América Latina y el Caribe. A la vez, se ha anunciado un paquete de ayuda a la región de USD \$ 150 millones, dirigida, a labores de vigilancia y control, atención de

las personas en riesgo como mujeres embarazadas y en edad reproductiva, y cuidado prenatal y postnatal ante complicaciones neurológicas.

El BM cree que los países que dependen del turismo como fuente de ingresos serán los más afectados económicamente. En ese sentido, la entidad destacó que México y Cuba, tendrán pérdidas de US \$ 744 millones y US \$ 664 millones, respectivamente; siendo las naciones más afectadas por la propagación del virus. En la República Dominicana las pérdidas serían de US \$ 318 millones, en Brasil US \$ 310 millones y en Argentina de US \$ 229 millones.

De esta cifra, 3 500 millones de dólares serán ingresos perdidos a consecuencia del virus, un 0.06% del PIB de la región, y 420 millones de repercusión fiscal, un 0.01 % del PIB. Algunos estados isleños podrían perder ingresos que representan hasta el 1.6 % de su PIB y que, para la mayoría de las naciones afectadas, el impacto fiscal se podría situar en el 0.3 % del PIB. En relación con el PIB, el país más afectado será Belice, que perderá el 1.22 % de su PIB en ingresos, mientras que el cálculo para Cuba es del 0.86 % del PIB.

7. Justificación

Ante los brotes y la presencia de casos clínicos reportados en México a partir del año 2015, el ZIKV cobra especial relevancia como problema de Salud Pública y un alto interés para estudios de investigación, entre los que se encuentran la búsqueda de posibles tratamientos y la generación de métodos de identificación que faciliten su diagnóstico. Esto crea la necesidad de contar con una metodología para su crecimiento *in vitro* en líneas celulares, lo que ha sido complicado hasta el momento dada su baja capacidad infectiva; por ello, es necesario conocer técnicas, cultivos celulares y métodos de laboratorio que sean viables para el manejo, replicación y aislamiento del virus. En este proyecto se busca encontrar una línea celular que sea permisiva al virus y que permita al mismo tiempo obtener altos títulos virales, para facilitar y agilizar futuras investigaciones sobre este agente patógeno infeccioso.

8. Hipótesis

Si las líneas celulares AaG2 y Vero son líneas altamente permisivas a la infección por el virus de Zika autóctono de México entonces a partir de ellas se puede estandarizar un método para la replicación *in vitro* del virus.

9. Objetivos

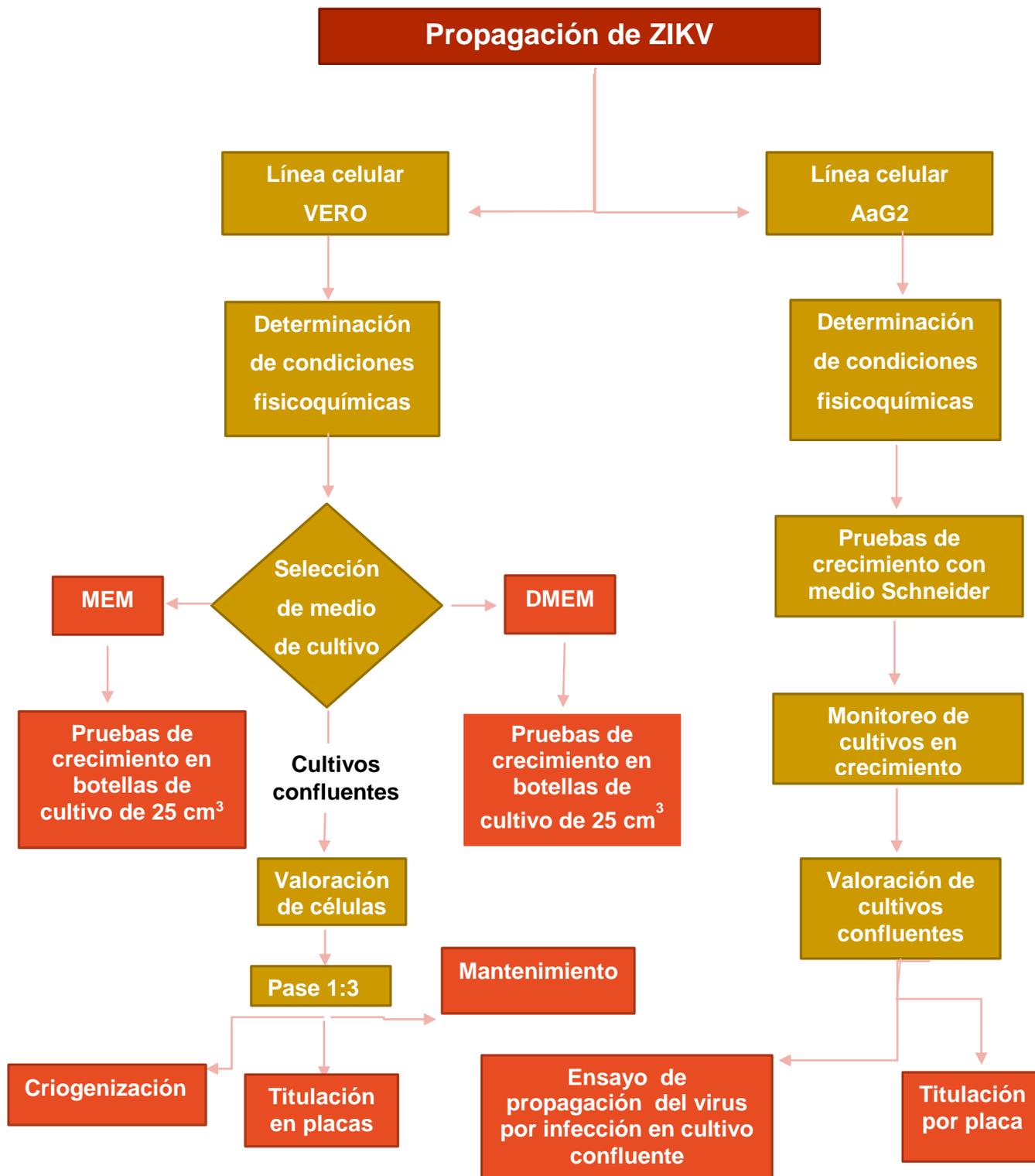
9.1 Objetivo general

Estandarizar métodos para la replicación *in vitro* del virus de ZIKA mexicano (ZIKV-MXN) mediante el manejo e inoculación de las líneas celulares AaG2 y Vero para establecer la capacidad infectiva y de replicación del virus y facilitar la obtención de altos títulos virales de aplicación en estudios de investigación.

9.2 Objetivos particulares

- Demostrar la permisividad de las líneas celulares Vero y AaG2 a la infección por ZIKV-MXN mediante la manipulación en el laboratorio a condiciones específicas
- Establecer condiciones óptimas de crecimiento de las líneas celulares utilizadas.
- Realizar ensayo de placas para titulación viral que nos permitan cuantificar el virus.

10. Plan de trabajo



11. Materiales y métodos

Se trabajó con dos líneas celulares provenientes de diferentes organismos la línea celular AaG2 y Vero las cuales fueron donadas por el Laboratorio de Virología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, a las cuales se le realizaron distintas pruebas tales como, porcentaje de SFB, atmósfera, temperatura y prueba de medio de cultivo para poder establecer las mejores condiciones de mantenimiento además de un rápido y óptimo crecimiento en dichos cultivos con el fin de llegar a tener cultivos celulares confluentes sanos en el menor tiempo posible y con las menores cantidades de reactivos necesarios para llegar a este fin, las células fueron crecidas en botellas de cultivo de 25 cm³ las cuales tienen un tratamiento en la superficie que facilita la adherencia de las células y con ello permite que el cultivo sea más uniforme y haya menor pérdida de crecimiento, con dichos cultivos obtenidos se realizaron en la medida que fue posible pruebas de permisividad y a su vez se hicieron placas de titulación por formación de placas para la evaluación de la capacidad de infección de ZIKV autóctono de México.

Dentro de los equipos y reactivos utilizados están, los medios de cultivo Schneider, MEM y DMEM que fueron de la marca Gibco; la incubadora utilizada para la línea celular Vero fue de la marca NUAIRE y para la línea celular AaG2 fue una incubadora ECOSHEL las cuales son importantes mencionar debido a las condiciones que fueron sometidos los cultivos y los eventos que se suscitaron con las células AaG2 se vieron directamente relacionados con los equipos que se utilizaron para su mantenimiento, los estudios de infección se llevaron a cabo en un gabinete de bioseguridad Clase II NUAIRE. El microscopio utilizado para el monitoreo de crecimiento e infección de las placas y cultivos fue un microscópico óptico LABOMED.

12. Resultados

12.1 Línea celular AaG2

Esta línea celular es de células epiteliales de larva de mosquito *Aedes aegypti* el principal vector de transmisión del virus en México, las características principales de estas células es que son adherentes y crecen a $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, su requerimiento de CO_2 es mínimo de apenas el 5 % y pueden crecer en medio MEM, pero en esta ocasión se utilizó Schneider un medio especial para el crecimiento de células de insectos.

Tabla 3. Datos bibliográficos de la línea celular AaG2.

ORGANISMO	<i>Aedes aegypti</i>
IMAGEN DEL ORGANISMO	
TEJIDO	Larva
MORFOLOGIA	Epitelial
TIPO DE CULTIVO	Adherente

Las células se mantuvieron creciendo en botellas de cultivo de plástico de 25 cm^3 con medio Schneider suplementado con 1 % de L-Glutamina, aminoácidos no esenciales, vitaminas, penicilina, estreptomina y Suero Fetal Bovino como factor de crecimiento que adicionó al medio en un 10 % bajo las siguientes condiciones Una vez que se obtuvo una monocapa confluyente de células AaG2 se procedió a infectar el cultivo con Virus Zika proveniente de un aislado clínico utilizado en el

laboratorio para otros experimentos. Después de realizar la infección se monitoreo el cultivo cada 24 horas por un lapso de 7 días. Y se anotaron observaciones.

Tabla 4. Condiciones de incubación de la línea celular AaG2.

TEMPERATURA	ATMOSFERA	MEDIO
28 °C	Aire 100 %	Schneider

12.2 Línea Celular Vero

La segunda línea celular a partir de la cual se trabajó fue la línea celular Vero (CCL-81). Esta línea es usada ampliamente en estudios de virología por su eficacia en la replicación de varios virus como el sarampión, el dengue y la rubeola (Takata et al 1994, Barth, 2000; Schatzmayr, et al, 2009). Son células epiteliales de riñón de mono *Cercopithecus aethiops* son células de tipo adherentes y crecen bajo una atmósfera de 5 % de CO₂ a 37 °C, el medio recomendado por ATCC el proveedor de la línea es MEM.

Tabla 5 Datos bibliográficos de la línea celular Vero.

ORGANISMO	<i>Cercopithecus aethiops</i>
IMAGEN DEL ORGANISMO	
TEJIDO	Riñón
MORFOLOGIA	Epitelial
TIPO DE CULTIVO	Adherente

En el presente estudio, los cultivos de células Vero se manejaron en cajas de cultivo de 25 cm³ con medio esencial mínimo MEM (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) suplementado con 1 % de L-Glutamina, aminoácidos no esenciales, vitaminas, penicilina, estreptomycin y con 10 % de Suero fetal bovino como factor de crecimiento.

Tabla 6 Condiciones de incubación de la línea celular Vero.

TEMPERATURA	ATMOSFERA	MEDIO
37 °C	Aire 95 % CO ₂ 5 %	Medio Esencial Mínimo (MEM)

12.3 Determinación de condiciones de mantenimiento y crecimiento de líneas celulares

12.3.1 Pruebas de condiciones fisicoquímicas

Línea Celular Vero.

Para definir las condiciones fisicoquímicas a las que se iban a manejar los cultivos celulares de células Vero se revisaron referencias entre las cuales está la base de datos de ATCC que es una empresa proveedora de diferentes líneas celulares en ella se encontró que la condición de atmosfera para esta línea celular es de 95 % aire y 5 % de CO₂ así como la temperatura optima recomendada que es 37 °C. Con estos datos obtenidos, en botellas de cultivo por triplicado se colocó un 1 mL de suspensión de células con MEM y SFB al 10 %, se probaron las células en una incubadora de inyección de CO₂ automático, NUAIRE Modelo NU-4750, y se evaluó la apariencia y el crecimiento de las células durante 3 días.

Tabla 7. Condiciones fisicoquímicas de crecimiento de línea celular Vero.

PH	Temperatura	Atmosfera	Observaciones
7	37 °C	95 % Aire 5 % CO ₂	Se probaron experimentalmente las condiciones encontradas en fuentes bibliográficas y se probó que las condiciones fueran realmente favorables para obtener un buen resultado en el crecimiento de las células

12.3.2 Pruebas de condiciones fisicoquímicas

Línea Celular AaG2.

Para definir las condiciones fisicoquímicas a las que se iban a manejar los cultivos celulares de células AaG2 se probaron las condiciones de atmósfera para esta línea celular en 100 % aire debido a que la incubadora que se utilizó para mantener la línea no tenía un control de inyección de CO₂, se mantuvieron a 28 °C intentando en la mayor medida posible no tener variaciones en la temperatura se manejaron en botellas de cultivo por triplicado se colocó un 1 mL de suspensión de células con medio Schneider y SFB al 10 %, con ello se evaluó la apariencia y el crecimiento de las células durante 3 días.

Tabla 8. Condiciones fisicoquímicas de crecimiento de línea celular AaG2.

PH	Temperatura	Atmósfera	Observaciones
7.2	28 °C	Aire 100 %	Debido a las posibilidades en infraestructura del laboratorio las células se probaron a 100 % de aire a pesar de que la recomendación era de 95 % aire y 5 % CO ₂ . Se observó que el cultivo si crecía bien a pesar de la pequeña adaptación de atmósfera a la que se sometió.

12.3.3 Determinación de % de SFB de crecimiento en las líneas celulares.

Con la finalidad de encontrar la mejor concentración de SFB para la obtención de cultivos confluentes sanos en el menor tiempo posible y con la menor cantidad de

reactivo posible se realizaron diferentes pruebas de cultivos con distinta concentración, para ello en cajas de cultivos de 25 cm³ se colocó 1 mL de células en 5 sistemas independientes y a este se le añadió medio de acuerdo a la línea celular para las células AaG2 se utilizó Schneider y para las células Vero se ocupó medio DMEM recomendando por ATCC a continuación los cultivos se mantuvieron a 28 °C y atmosfera de 100 % Aire para la línea AaG2 y 37 °C en una atmosfera de 95 % aire y 5 % CO₂ para las células Vero, estos cultivos fueron monitoreados cada 24 horas hasta obtener una monocapa confluyente o el de caso de no haber crecimiento hasta empezar a notar el desprendimiento celular, señal clara de muerte celular.

Tabla 9. Porcentaje de SFB en línea celular Vero.

Porcentaje de SFB	1	3	5	8	10
Confluencia al 90 %	No hubo crecimiento	No hubo crecimiento	10 días	6 días	3-4 días
Observaciones	Los primeros días las células se mantuvieron vivas, pero comenzaron a despegarse a partir del día 2.	No se observó un crecimiento notable y las células se mantuvieron durante	La confluencia se obtuvo con mucha dificultad.	Las células crecen bien, solo se observan algunas puntilladas cuando se alcanza la confluencia.	Las células tienen buen crecimiento y buena apariencia

Tabla 10. Porcentaje de SFB en línea celular Vero

Porcentaje de SFB	1	3	5	8	10
Confluencia al 90 %	Sin crecimiento	Sin crecimiento	7 días	4 días	2 días

Observaciones	Las células se mantuvieron durante 15 días aunque al final presentaban un poco de puntillero.	Las células se mantienen bien, solo con cambio de medio necesario al 3er día.	Se alcanzó la confluencia. Pero las células tienen una mala apariencia.	Las células crecieron bien y con buena apariencia.	Las células tienen buena apariencia y el crecimiento fue mucho más rápido.
----------------------	---	---	---	--	--

12.4 Preparación y selección de medios de cultivo para línea celular Vero

12.4.1 Preparación de DMEM.

Se realizaron los cálculos pertinentes para preparar 500 mL de medio esta cantidad fue la considerada la necesaria para trabajar apropiadamente sin tener tanto riesgo de gastar reactivos de más y tomando en cuenta también la perdida en caso de tener contaminación, los cálculos correspondientes son los siguientes:

CALCULOS

DMEM

1X10 L

El frasco indica 133.7 g para 10 L

13.37 g para 1 L

500 mL

1 L-13.37 g

0.5 L-6.685 g Medio en polvo de DMEM

BICARBONATO DE SODIO

3.7 g-1 L

1.85 g-0.5 L de Bicarbonato de sodio

Cálculo de volumen de agua destilada o desionizada

$V_i = 500 \text{ mL}$

$V_i/V_o = 465 \text{ mL de agua destilada}$

$V_o \text{ (Vol. De suplementos)} = 35 \text{ mL}$

<p>SUPLEMENTAR</p> <p>Vitaminas 5 mL</p> <p>NEAA 5 mL</p> <p>Glutamina 5 mL</p> <p>Antibiótico 5 mL</p> <p>Hepes 5 mL</p> <p>Piruvato 5 mL</p> <p>Anfotericina B 5 mL</p> <p>VOLUMEN SUPLEMENTO 35 mL</p>
--

Primeramente se enjuago el material con agua destilada después por separado se pesó el medio DMEM y el bicarbonato de sodio calculado, en pesa muestras utilizando una balanza analítica BOECO Modelo BBI-31, Germany, además se midió en el recipiente principal el agua destilada necesaria, se colocó una barra magnética dentro del recipiente y se puso en agitación a continuación se le añadió el medio previamente pesado, una vez que el medio se disolvió completamente se adicionó el bicarbonato de sodio, una vez disuelto todo se ajustó el pH a 7, se llevó a la campana de flujo laminar previamente esterilizada 15 min con luz UV y limpiada con solución de alcohol etílico al 70 %, dentro de la campana se adicionaron al medio los suplementos (vitaminas, NEAA, antibióticos, HEPES, piruvato, L-glutamina y anfotericina posteriormente se trasvaso a una unidad de filtración conectada al vacío y se procedió a filtrar, finalmente se rotulo y se guardó a -5 °C en refrigeración.



Figura 17. Preparación del medio de cultivo DMEM.

12.4.2 Preparación de MEM.

Se realizaron los cálculos pertinentes para preparar 500 mL de medio esta cantidad fue la considerada la necesaria para trabajar cómodamente sin tener tanto riesgo de gastar reactivos de más y tomando en cuenta también la perdida en caso de tener contaminación, los cálculos correspondientes son los siguientes:

CALCULOS

MEM1X10 L

El frasco indica 96.1 g para 10 L

9.6 g para 1 L

500 mL

1 L-9.6 g

0.5 L- 4.805 g Medio en polvo de DMEM

SUPLEMENTAR

Vitaminas 5 mL

NEAA 5 mL

Glutamina 5 mL

Antibiótico 5 mL

Hepes 5 mL

Piruvato 5 mL

Anfotericina B 5 mL

VOLUMEN SUPLEMENTO 35 mL

BICARBONATO DE SODIO

2.2 g-1 L

1.1 g-0.5 L de Bicarbonato de sodio

Cálculo de volumen de agua destilada o desionizada

$V_i = 500 \text{ mL}$ $V_i/V_o = 465 \text{ mL}$ de agua destilada

V_o (Vol. De suplementos) = 35 mL

El material enjuagado con agua destilada fue utilizado para pesar el medio MEM y el bicarbonato de sodio en una balanza analítica BOECO Modelo BBI-31, Germany, además se midió en el recipiente principal el agua destilada necesaria, se colocó una barra magnética dentro del recipiente y se puso en agitación a continuación se le añadió el medio previamente pesado, una vez que el medio se disolvió completamente se adicionó el bicarbonato de sodio, una vez disuelto todo se ajustó el pH a 7, se llevó a la campana de flujo laminar previamente esterilizada 15 min con luz UV y limpiada con solución de alcohol etílico al 70 %, dentro de la campana se adicionaron al medio los suplementos (vitaminas, NEAA, antibióticos, HEPES, piruvato, L-glutamina y anfotericina posteriormente se trasvaso a una unidad de filtración conectada al vacío y se procedió a filtrar, finalmente se rotulo y se guardó a $-5 \text{ }^\circ\text{C}$ en refrigeración.

Para seleccionar el medio de cultivo más adecuado para el cultivo de células Vero se decidió probar dos medios diferentes esto con el propósito de valorar si existía

un cambio favorable entre la aceptación y el crecimiento de la cepa dependiendo del medio. Para ello en triplicado por separado se colocó en una botella de cultivo de 25 cm³ en la cual se colocó 1 mL de suspensión de células y 4.5 mL de medio DMEM y SFB al 10 % (0.5 mL), dichos cultivos se pusieron a las condiciones fisicoquímicas determinadas y probadas anteriormente, se monitorearon cada 24 horas hasta obtener un cultivo confluyente, se anotaron las observaciones pertinentes y se criogenizaron. El mismo procedimiento y cantidades se siguió con el medio MEM.

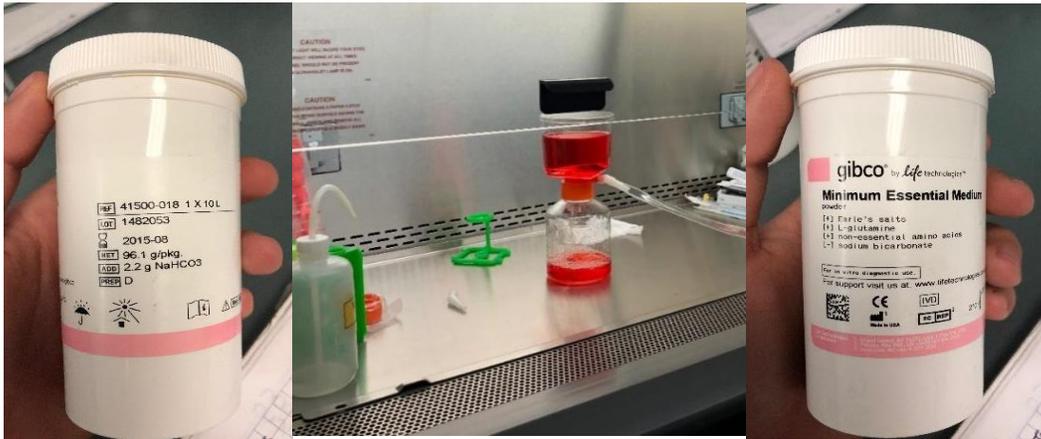


Figura 18. Preparación de medio de cultivo MEM.

12.4.3 Prueba de esterilidad y de viabilidad de medios de cultivo.

Una vez preparado los medios y antes de utilizarlos con las líneas celulares se monitorearon para corroborar la esterilidad del medio para esto se colocaron 3 botellas de cultivo de 25 cm³ con 5 mL de medio cada una y se colocaron dentro de la incubadora a 37 °C y se monitorearon cada 24 horas durante 7 días, posterior a eso y corroborando que el medio era viable, el medio podía ocuparse.

12.4.4 Selección de medio Línea Celular Vero.

Tabla 11. Evaluación de la línea celular Vero en DMEM.

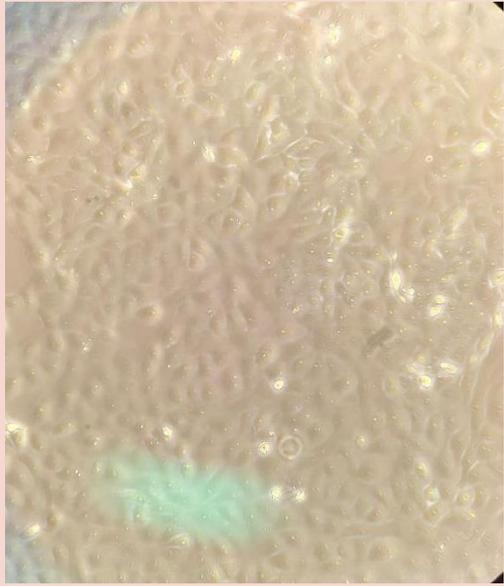
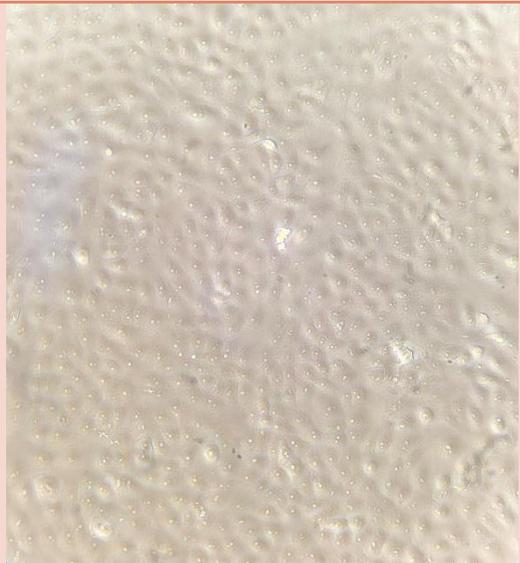
EVALUACION	RESULTADO	IMAGEN
Aspecto	Las células crecieron bien, alcanzaron la confluencia con 10 % de SFB en 2 días no presentaron ningún tipo de puntilleo.	
SUPLEMENTOS	Aminoácidos no esenciales, L-Glutamina, Vitaminas, Hepes, Piruvato, antibiótico y antimicótico (anfotericina, estreptomycin y penicilina)	
SFB	10 %	

Tabla 12. Evaluación de la línea celular Vero en MEM.

EVALUACIÓN	RESULTADO	IMAGEN
Aspecto	Las células crecieron sin problemas y no presentaron puntilleo, el tiempo en el que alcanzaron la confluencia fue aceptable de 2 días.	
SUPLEMENTOS	Aminoácidos no esenciales, L-Glutamina, Vitaminas, Hepes, Piruvato, antibiótico y antimicótico (anfotericina, estreptomycin y penicilina)	
SFB	10 %	

Dada la buena adaptación de la línea celular para con ambos medios de cultivo y al notar que no existía una diferencia significativa para con el crecimiento y la apariencia de las células se seleccionó el medio basándose en las cantidades y la disponibilidad de reactivo disponible en el laboratorio, por lo cual para todas las siguientes pruebas de laboratorio que se realizaron fueron trabajadas con MEM como medio para la línea celular Vero.

12. 5 Crecimiento, pases y criogenización celular

Condiciones finales a las que se determinó utilizar los cultivos celulares.

Tabla 13. Condiciones de crecimiento de la línea celular AaG2.

TEMPERATURA	ATMÓSFERA	MEDIO	% SFB	CONFLUENCIA AL 90%
28 °C	100 % Aire	Schneider	10 %	3 días

Tabla 14. Condiciones de crecimiento de la línea celular Vero.

TEMPERATURA	ATMÓSFERA	MEDIO	% SFB	CONFLUENCIA AL 90%
37 °C	95 % Aire 5 % CO2	DMEM	10 %	3 días

12.5.1 Crecimiento y pase de células VERO

Para el crecimiento celular una vez ya establecidas las condiciones y los medios a ocupar las células se colocaron en botellas de cultivo de 75 cm³ para hacer un pase a escala se utilizó un cultivo confluyente de células de 25 cm³ el cual se revisó al microscopio para corroborar que las células estuvieran bien y no presentaran ningún tipo de contaminación posteriormente se les retiro el medio que tenían, se les añadió 800 µL de tripsina se metió a la incubadora por 5 min, se añadió 9 mL de medio MEM y 1 mL de SFB, con ayuda de la pipeta se realizaron algunos lavados a la caja con el fin de llevarnos el mayor número de células posibles, a continuación se tomó

toda la suspensión, se llevó a una caja de 75 cm³ y se metió a la incubadora a 37 °C con 5 % de CO₂.

12.5.2 Crecimiento y pase de células AaG2

Debido al espacio y material disponible esta línea celular se mantuvo en crecimiento en cajas de 25 cm³, para ello se hicieron pases 1:3 de la caja confluyente de células que se tenía de las pruebas realizadas con anterioridad, esto quiere decir que de una caja de células se sacaron 3 en cada caja se colocó 1 mL de suspensión de células las cuales fueron despegadas únicamente con fuerza mecánica, a continuación se les colocó 4.5 mL de medio Schneider y 0.5 mL de SFB, a continuación se homogenizaron, se observaron al microscopio y se metieron a la incubadora.

12.5.3 Criogenización celular

Para llevar a cabo la criogenización el cultivo celular fue necesario que este se encontrara entre 80- 90 % de confluencia y que además no presentarán ningún tipo de contaminación. La criogenización celular se llevó a cabo bajo las mayores medidas de esterilización posibles. Se trabajó dentro de una campa de flujo laminar se sacó el cultivo a criogenizar bien cerrado de la incubadora y observo al microscopio se le retiró el medio de cultivo y se realizó lavados con SSF, se añadió de 0.5-1 mL de tripsina se dejó por 5 min a continuación se añadió 4 veces más medio que la cantidad de tripsina colocada, para parar la reacción de la tripsina en el caso únicamente de las células Vero, en las AaG2 únicamente se dieron con mucha precaución unos pequeños golpes a la caja esto con el fin de desprender todas las células de la botella de cultivo, una vez que las células se encontraban suspendidas fueron trasvasadas a tubos para centrifuga y se sometieron a 3500 rpm por 10 min, transcurrido el tiempo en la centrifuga se retiró cuidadosamente el medio que quedaba para no llevarse el botón de células que se formó al fondo del tubo se

añadió 2.7 mL de SFB al tubo y se re suspendió el botón de células con ayuda de un vortex, una vez re suspendido se agregaron 300 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) se homogenizo y se llevó a crio viales con su correspondiente rotulo, se colocaron dentro de un contenedor con isopropanol se puso 24 horas a -20 °C, finalmente se guardaron a refrigeración de -70 °C.

12.6 Pruebas de infección de cultivos celulares confluentes bajo las condiciones predeterminadas

Las células de riñón de mono verde africano (Vero) se mantuvieron a 37 °C en medio esencial mínimo de Eagle (MEM) que contenía un 10 % de suero bovino fetal-FBS (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, California, E.U.A) Suplementado con piruvato de sodio (Gibco), aminoácidos no esenciales (Gibco), gentamicina 10 µg/mL y anfotericina B 1 µM. Las monocapas confluentes de células Vero se inocularon con la cepa del virus Zika mexicano seguida de adsorción del virus en 37 °C durante 1 h. Las células se mantuvieron en el medio descrito anteriormente, con FBS al 1 % (Gibco), y se incuba a 37 °C durante cuatro días; las células se observaron diariamente hasta que se produjo el efecto citopático (CPE). Cuando las células mostraron un 90 % de CPE, los medios y las capas celulares se recolectaron para la producción de antígeno.

Mientras que las células de larva de mosquito *A. aegypti* se mantuvieron a 28 °C en medio Schneider que contenía un 10 % de suero bovino fetal-FBS (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, California, E.U.A.) Suplementado con piruvato de sodio 1 % (Gibco), aminoácidos no esenciales 1 % (Gibco), gentamicina con penicilina 1 % y anfotericina B 1 %. Las monocapas confluentes de células Vero se inocularon con la cepa del virus Zika mexicano seguida de adsorción del virus en 28 °C durante 1 h. Las células se mantuvieron en el medio descrito anteriormente, con FBS al 1 % (Gibco), y se incuba a 28 °C durante siete días; las células se observaron diariamente hasta que se produjo el efecto citopático (CPE). Cuando las células

mostraron un 90 % de CPE, en cuanto se comenzó a observar desprendimiento de la monocapa se retiró y se realizaron las observaciones pertinentes.



Figura 19. Ensayo de infección de Zika en la línea celular AaG2.

crecidas bajo las condiciones de cultivo predeterminadas, la cual se monitoreo durante una semana y se tomó en cuenta el día en el que se observa la presencia marcada de la formación de placas causadas por el efecto del virus sobre la monocapa, para las células AaG2 las placas se presentan al 5to día post infección.

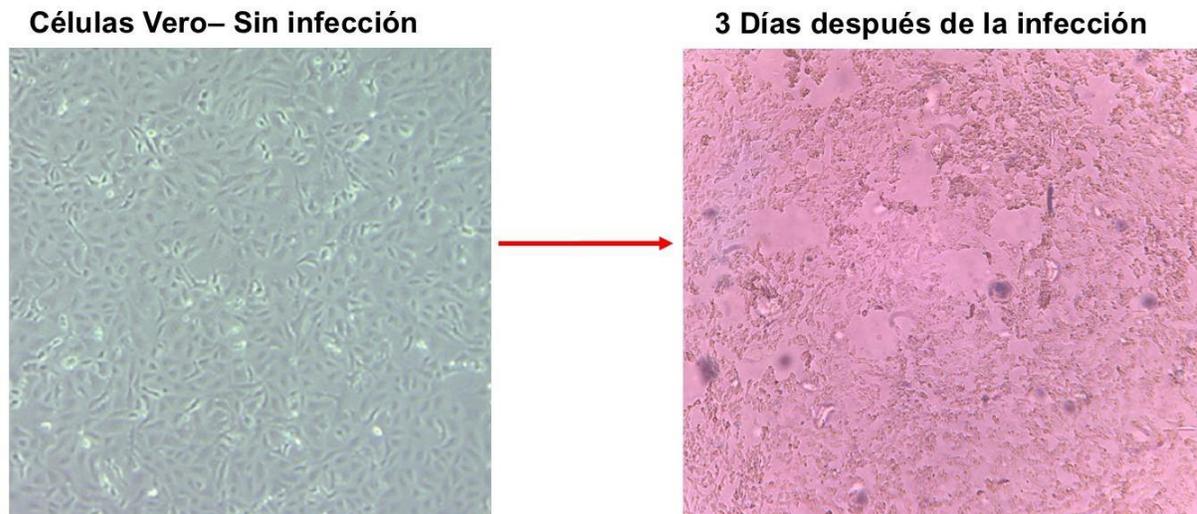


Figura 20. Ensayo de infección de Zika en la línea celular Vero.

crecidas bajo las condiciones de cultivo predeterminadas, la cual se monitoreo durante una semana y se tomó en cuenta el día en el que se observa la presencia marcada de la formación de placas que en este caso fue al tercer día.

12.7 Titulación viral por formación de placas

La titulación viral mediante la técnica de placas se considera en virología un método altamente cuantitativo y preciso para el análisis de la infectividad viral. Permite estudiar en forma segura la capacidad neutralizante de agentes antivirales y de anticuerpos, y posibilita la purificación de un agente a partir del clonaje de sus placas.

Para poder realizar este procedimiento se requiere tener por lo menos una botella de cultivo celular con el 90-100 % de confluencia ya que al pasar las células a la placa estas deben quedar casi confluentes puesto que es más complicado la manipulación y el cambio de medio en las placas, además de que no es conveniente para los procesos de titulación de virus ya que a mayor tiempo en la placa más probabilidad de tener contaminación.

Cada botella de cultivo de 25 mL tiene una superficie de 25 cm² la cual tiene una capacidad de albergar a un cultivo de 4.5×10^6 células aproximadamente.

Cada una de las placas utilizadas en el procedimiento tiene 24 pozos cada uno de los pozos tiene la capacidad de albergar alrededor de 2.5×10^5 células.



Figura 21. Botella de cultivo celular.

La titulación viral se realizó tomando primeramente como base el protocolo publicado por Coelho y colaboradores en 2017 en un artículo que habla

precisamente sobre la propagación del virus de Zika en diferentes líneas celulares. Se sembró una botella de cultivo de 25 cm² de células Vero y una vez confluyente se agregó tripsina para re suspender las células en 24 mL de MEM suplementado con 10 % de SFB, estas se sembraron en una placa de 24 pozos a razón de 250 000 células/mL/pozo.

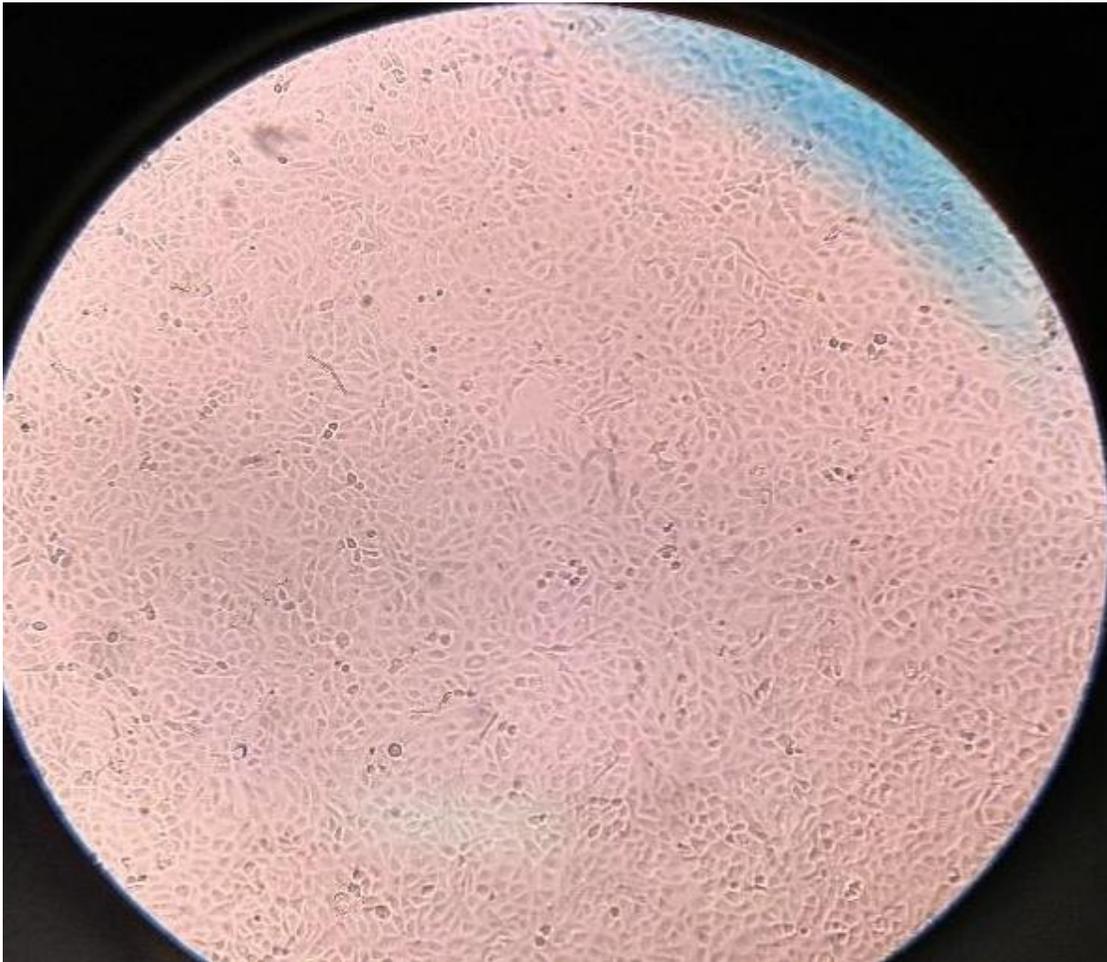


Figura 22. Monocapa confluyente de titulación viral por UFP.

Una vez que las monocapas estuvieron totalmente confluentes, se lavaron con PBS y se añadieron 200 µL de diluciones virales seriadas a cada pozo, dejando al inicio de cada serie un pozo sin infectar como control negativo (solo se coloca medio libre de suero), tal y como se ilustra en la figura 9. Las placas se incubaron por 2 h a 37 °C con 5 % de CO₂.

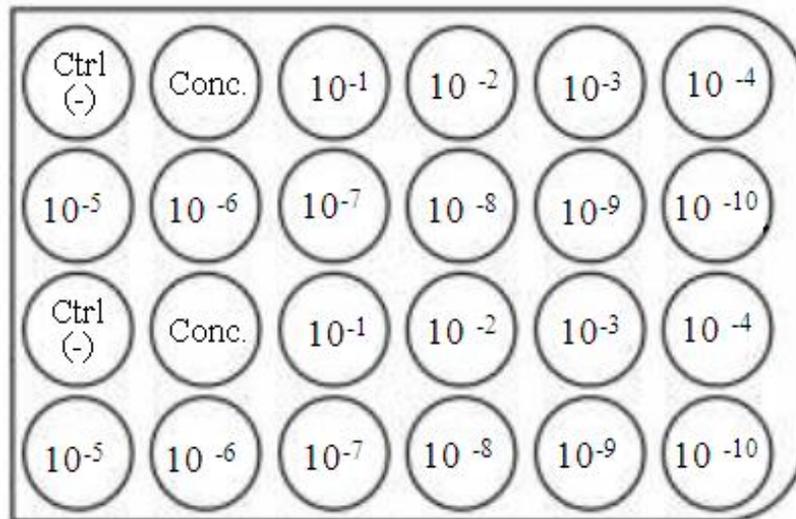


Figura 23 Esquema de la titulación de ZIKV por ensayo en placas líticas.

Las diluciones virales se realizaron de la siguiente manera: se tomaron 100 μ L del virus concentrado y se colocó en un tubo eppendorf de 1.8 mL, a este se le adicionaron 900 μ L de medio MEM (esta fue la dilución 10^{-1}), de esta primera dilución se tomaron 100 mL en otro tubo eppendorf de 1.8 mL y se adicionaron 900 μ L de medio MEM (dilución 10^{-2}), se repitió este procedimiento hasta llegar a la dilución de 10^{-10} .

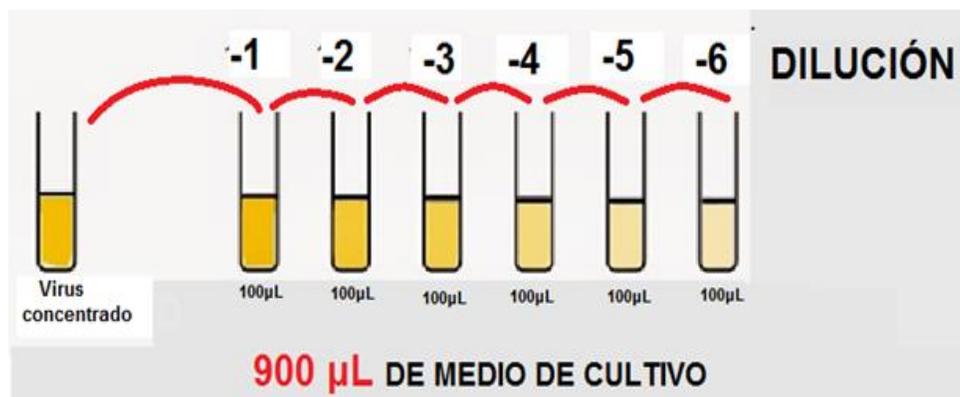


Figura 24. Diluciones virales para titulación por placa.

Posterior al tiempo de incubación, se retiró el medio y se añadieron 1.5 mL de medio libre de suero con 1.5 % de metilcelulosa y se incubaron a 37 °C con 5 % CO₂, se la observación la formación de placas cada 24 horas hasta que se observó el efecto

citopático, se retiró la metilcelulosa con lavados de SSF cuidando no desprender la monocapa y a continuación se fijaron las células con una mezcla de alcohol/acetona (1:1) por 15 min. Posteriormente se dejó la placa en un tiempo de secado de aproximadamente 30 min a 1 hora a la intemperie, se le añadió cristal violeta a cada pozo a modo que la superficie se cubriera completamente, se dejó teñir por 30 min, transcurrido este tiempo se lavó la placa con agua corriente y se dejó secar toda la noche. La titulación viral se determinó contando directamente el número de placas líticas observadas en la dilución más alta, considerando:

$$\text{UFP/mL} = \# \text{ placas} \times 5 \times \text{DF}$$

En donde:

UFP: unidades formadoras de placas

DF: factor de dilución

5: factor de corrección correspondiente a 0.2 mL del inóculo viral.



Figura 25. Titulación de ZIKV por ensayo en placas líticas.

Tabla 15. Titulación de placas en células AaG2.

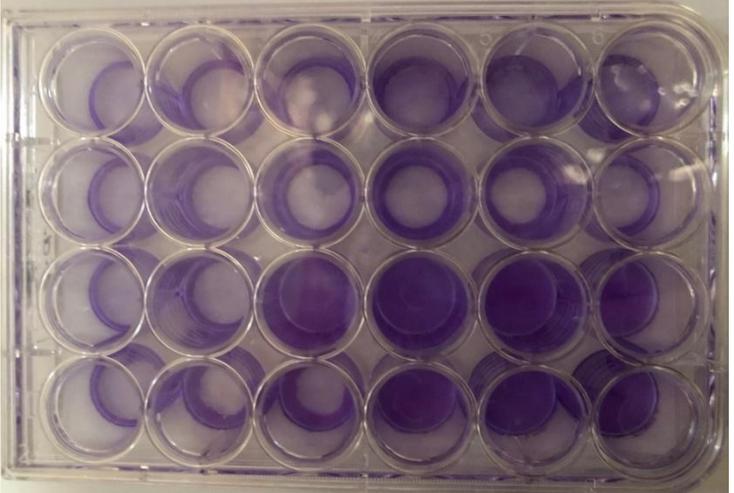
Observaciones	IMAGEN
<p>Se intentó realizar una placa para la titulación con esta línea celular, pero se encontró que esto no es posible debido a que las células no tienen una gran fuerza de adhesión a las placas y a las botellas de cultivos por lo que al realizar la placa al momento de retirar la metilcelulosa para teñir, todas las células se despegan y se van con los lavados de metilcelulosa.</p>	

Tabla 16. Titulación de placas en células Vero.

DILUCIÓN	# DE PLACAS	IMAGEN
10⁻⁵	8	
	9	
	4	
	7	
	7	
	7	
PROMEDIO	7	

Titulación por placa

FORMULA

$UFP = (\# \text{ de placas}) (D) (Fd)$

D= Dilución

Fd=Factor de dilución

CALCULO

$UFP = (7) (10^5) (5)$

$UFP = 3.5 \times 10^6 \text{ UFC}$

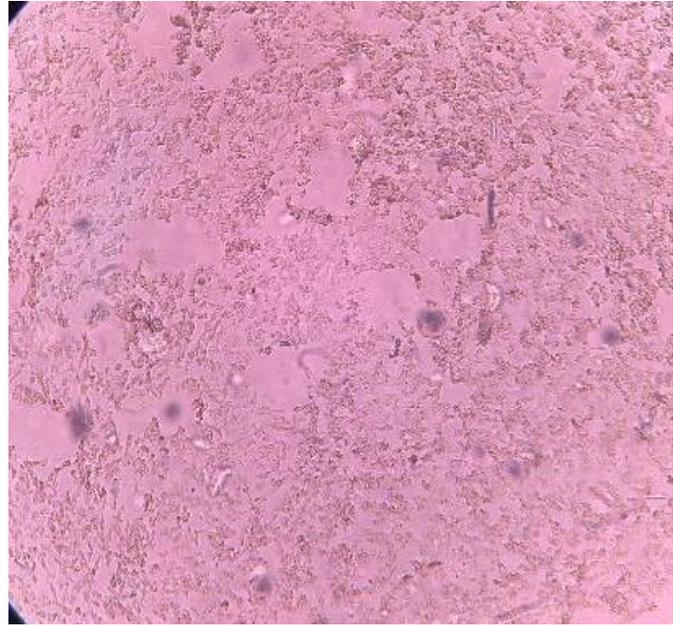


Figura 26. Placas por infección por ZIKV MXN en línea celular Vero.

13. Discusión

La emergencia de ZIKV y los padecimientos graves asociados a la infección, como el síndrome congénito y el síndrome de Guillain Barré, han puesto de manifiesto la necesidad de generar investigación sobre los mecanismos de replicación y propagación viral, para los cuales existe información muy limitada a la fecha. El conocimiento sobre ZIKV y sus implicaciones a nivel virológico y epidemiológico, así como sus mecanismos inmutopatológicos y las consecuencias sobre la salud, hasta el momento no son bastos. En consecuencia, ha surgido una necesidad de obtener cepas virales de referencia y de preservación de aislados clínicos de ZIKV para apoyar estudios *in vitro* e *in vivo* que permitan conocer y entender con mayor claridad la naturaleza del virus. Sin embargo, no se puede garantizar un suministro rápido de partículas virales de ZIKV, ya que las líneas celulares permisivas no generan grandes títulos virales en condiciones estándares de crecimiento y requieren ser optimizadas (Alexander N. y cols., 2018).

Las estrategias actuales para la propagación del ZIKV en células se han basado principalmente en células epiteliales de riñón de mono verde, células de larvas de mosquitos, así como también en células neurales, en líneas de hepatocitos y células epiteliales de pulmón de humano.

Una de las líneas celulares en las que se ha demostrado tener títulos razonablemente altos de ZIKV es la línea celular Vero que como en el caso de la cepa africana de ZIKV MR para la que diversos estudios confirman que se han obtenido títulos elevados de virus con esta la línea celular (Barreto-Vieira, D., Barth, O. et al, 2016).

Las células Vero se han utilizado ampliamente en estudios de virología por su eficacia en la replicación de varios virus como el sarampión, los poxvirus, el dengue y la rubeola, esta línea celular tiene un perfil de seguridad extraordinario y es ampliamente utilizada como un sustrato aprobado para la producción de vacunas virales humanas a escala comercial. (Nikolay A., Leda R., Udo R, Genzel Y., 2018)

Por otro lado, las líneas celulares de mosquitos C6/36 y AaG2 (larvas de *Aedes albopictus* y *Aedes aegypti*) se han utilizado y reportado en menor medida como líneas permisivas a la infección, este tipo de líneas celulares también han sido utilizadas en algunos estudios para la propagación de otros arbovirus. La importancia de utilizar una de las líneas celulares de mosquito radica principalmente en que es el vector principal de transmisión de la enfermedad y en México la especie que se ha encontrado predominante en el mosquito *Aedes aegypti*, es por ello el uso en esta investigación de la línea celular AaG2, que además ha sido reportada como permisiva a la infección mostrando en otros estudios efecto citopático al tercer día post- infección y la formación de placas como consecuencia de la infección (Takata et al, 1994; Barth, 2000; Schatzmayr et al, 2009).

En lo que concierne a la línea celular Vero, a pesar de tener antecedentes de presentar títulos virales de ZIKV importantes su uso para la producción de vacunas se ve un poco restringido debido a que se requiere de una tripsinización para la ampliación y el pase celular. En consecuencia, la identificación y la determinación de parámetros de manejo, así como la manipulación de una línea celular capaz de producir títulos de virus altos fue una contribución significativa de este trabajo para el establecimiento de una plataforma de múltiples aplicaciones y estudios con ZIKV. Esto abre la posibilidad de que la línea celular AaG2 pueda ser una opción viable para la producción de virus puesto que con los experimentos realizados en el presente estudio se observó que la línea si es permisiva a la infección y que además las fuerzas de adhesión de las células a las botellas de cultivo son muy débiles y estas pueden desprenderse por acción mecánica aunque esto implique que la línea se vea limitada debido también a que no puede ser utilizada para ciertos propósitos como la cuantificación del virus por el método de titulación por placa, pues como se describió, la monocapa tiende a desprenderse con mucha facilidad al momento de intentar retirar la metilcelulosa para teñir la placa.

Las condiciones de trabajo de ambas líneas celulares manipuladas en el laboratorio pudieron ser determinadas gracias a la recopilación de datos de varios artículos y bases de datos en las cuales se realizaba el crecimiento de las células Vero a una

temperatura de 37 °C en una atmosfera de 95 % Aire y 5 % CO₂ con Medio Mínimo Esencial (MEM) o Medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) mientras que la cantidad de SFB utilizado fue variando de 2-10 %. Siguiendo esta información se hicieron diferentes pruebas experimentales en las cuales se utilizó una concentración diferente de SFB con el fin de poder determinar cuál era la más apropiada para reducir costos, pero al mismo tiempo obtener cultivos confluentes en tiempos razonables. Se determinó que la concentración factible para el estudio en ambas líneas celulares era a 10 % de SFB esto debido a que los cultivos se obtenían en un menor tiempo lo cual disminuía el riesgo de cualquier tipo de contaminación; además, se observó que con concentraciones menores las células tardaban más días en crecer y esto ocasionaba un efecto en la morfología de las células con la consecuente pérdida de la confluencia (Barreto-Vieira, 2016).

En un estudio realizado por Barreto-Vieira y colaboradores en 2016 trabajaron con células Vero las cuales infectaron con sangre de una muestra clínica positivo a ZIKV, en dicho trabajo se encontraron grupos de partículas virales dentro de las vesículas citoplasmáticas, el diámetro de estas partículas de virus promedió 50 nm. Además de las partículas de virus envueltas, también se observaron nucleocápsides que indicaban que se produjo replicación viral, sin embargo, se requieren más estudios sobre los resultados encontrados lo cual lleva a que la facilidad de poder tener condiciones estandarizadas para una línea que tiene precedentes de ser una línea permisiva a la infección es de apoyo para agilizar investigaciones subsecuentes, en la actualidad la producción del virus sigue presentando serias limitaciones y esto conlleva un impacto relevante al momento de realizar más investigaciones que permitan conocer más acerca de este virus además de limitar la posibilidad de la producción de un tratamiento o vacuna que permita tratar o controlar la infección.

En México para el 2016 se pone en pie la primera declaratoria de emergencia epidemiológica para todas las entidades federativas del país ante la presencia de un número elevado de casos autóctonos de infección por ZIKV, con el fin de fortalecer y reforzar las acciones de atención y manejo clínico, prevención,

promoción y control para reducir el impacto de la enfermedad entre la población, con énfasis en las mujeres embarazadas dada la presencia de nacimientos que presentan síndrome congénito y casos de Guillain Barre confirmados con antecedentes de infección por ZIKV, no obstante, aunque el número de casos para 2018 disminuye, la presencia de casos por ZIKV sigue siendo un problema de salud actual dado que la última alerta epidemiológica de infección por ZIKV fue dada el 18 de mayo por la OPS (Organización Panamericana de Salud), a pesar de esto los trabajos realizados con cepas autóctonas han sido mínimos, es por ello que se espera que con el desarrollo de métodos de propagación *in vitro* aislados de muestras clínicas endémicas se de apertura a la investigación para obtener mayor información, sobre la capacidad infectiva de cepas de ZIKV circulante en México; agilizando así diversas investigaciones futuras que permitan caracterizar genotipificar estas cepas. Con los experimentos realizados y bajo las condiciones ya establecidas en este trabajo se ve de forma viable el manejo de la cepa con las líneas celulares Vero y AaG2 obteniendo de estas un rendimiento similar en cuanto permisividad de la infección por el virus, no obstante, la línea celular AaG2 requiere de mayores cuidados y es una línea limitada para la cuantificación del virus por placa.

En algunas investigaciones anteriores se han buscado estrategias de propagación para la producción de virus de diferentes partes del mundo, un artículo publicado en el 2018 por Alexander Nikolay y colaboradores encontraron que la línea celular Vero y una línea celular de mosquito que fue la línea C6/36 proveniente de larvas de mosquito de *Aedes Albopictus* son líneas de las que se obtienen títulos apropiados de ZIKV africano y brasileño, aunque marca que para la cepa africana el manejo con el mejor rendimiento es en células Vero y para la cepa brasileña se obtuvieron mejores resultados en células C6/36. Dicho trabajo pone de manifiesto las diferencias que existen entre las diversas cepas de ZIKV y con ello la importancia del presente estudio en el cual se puede señalar que la línea celular VERO señalada en varias ocasiones como la línea estándar es una línea óptima para el manejo de

las cepas de aislados de México dada la dificultad para mantener la línea AaG2 aunque se requieren de más estudios para reforzar los presentes.

También es importante mencionar que si bien la línea celular Aag2 es una línea que se comprobó es permisiva a la infección por ZIKV, y también es formadora de placas, esta línea presenta algunas limitaciones y controversias al momento de ser utilizadas ya que las células son muy poco tolerantes a la variación de temperatura dentro de la incubadora y es por ello que el crecimiento de esta línea celular fue más restrictivo en comparación con la línea celular Vero, esto además implicó pérdidas de cultivos y un retraso significativo en su crecimiento, es además una línea celular con una débil capacidad de adherencia lo cual puede ser una ventaja si la investigación pertinente se requiere evitar el uso de tripsina por cualquier sean sus causas puesto que para el pase y manejo de las células solo es requerido aplicar un poco de fuerza dando unos ligeros golpes y posterior a ello las células se desprenden, cualidad también que como se observó en los experimentos realizados es poco favorable para realizar y utilizar la línea celular para titulaciones por placa, ya que con el uso de metilcelulosa la titulación por este método se vuelve muy complicado.

En los últimos años se ha detectado un fenómeno que es cada vez más recurrente dentro de las infecciones por arbovirus a través de un vector y esta es la presencia de coinfecciones, dado que se ha visto un aumento de casos clínicos en los que el mismo vector transmite más de un arbovirus. Esto toma una gran importancia para tanto para el diagnóstico del paciente, como para la investigación del virus y más importante aún para la producción y replicación del virus es por ello que hoy en día es de vital importancia conocer la procedencia y tener en la mayor medida posible el historial de una muestra clínica ya que con ello poder descartar la probabilidad de una confección. En un artículo publicado por Suwanmanee y colaboradores en 2018 se realizaron estudios sobre las coinfecciones en Tailandia se hicieron varios análisis mediante pruebas serológicas (ELISA) con un número determinados de pacientes y se encontró 89.56 % fueron positivos para DENV, con la presencia de infecciones duales con DENV y CHIKV para el 3.29 % y solo 0.61 % para casos con

DENV y ZIKV Todos los pacientes infectados con CHIKV fueron positivos para DENV, 4 casos con DENV-2 y 2 casos con DENV-3. El paciente infectado con ZIKV fue coinfectado con DENV-1. Además, se observó que en el caso de pacientes con infección por DENV una infección secundaria por DENV, 88.34 % entre los casos positivos, 79.12 % entre todos los participantes, que esto sugiere que, aunque la infección de ZIKV con DENV es mínima esta puede ser probable, además de que también con dicho estudio es posible decir que en la infección natural entre arbovirus por el vector DENV tiene la mayor capacidad infectiva y de adaptabilidad. Durante el siglo XXI ZIKV ha infectado a miles de personas y se ha propagado en gran parte de mundo. La introducción de ZIKV tuvo un fuerte impacto en la salud pública en México, y el manejo de las cepas de referencia y aislados de pacientes, estuvo hasta hace poco tiempo, restringido a las Institutos de Salud de referencia; es por ello que es de suma importancia identificar una línea celular susceptible, de uso continuo, que permita el aislamiento y la identificación del virus a partir de muestras de pacientes para su producción en títulos altos y, que permita la realización de diversos estudios como las pruebas de susceptibilidad a fármacos y estudios de atenuación o manipulación en busca de vacunas candidatas. Además, también permite hacer estudios de biología molecular con fines de diagnóstico y optimizar en determinado momento la prueba de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real (qRT-PCR) para detectar el genoma viral; así como para aislamiento del virus para estudiar la estructura de la partícula viral y su comportamiento y replicación dentro de diversas estirpes celulares.

14. Conclusiones

Se generaron dos métodos para la estandarización del crecimiento *in vitro* de un aislado clínico de ZIKV autóctono de México adaptado a condiciones óptimas en cultivo, los cuales permiten obtener abastos virales suficientes para los estudios de caracterización y comprensión de los mecanismos inmunopatológicos de la enfermedad y sus complicaciones.

15. Perspectivas

Se sugieren más experimentos para probar un método estandarizado de titulación por RT-PCR y eliminar el método de titulación por placa que es de mayor trabajo y considerar de gran importancia el origen de la muestra clínica para evitar trabajar con coinfecciones.

16. Referencias

- Aagaard, K., Lahon, A., Suter, M., Arya, R., Seferovic, M. (2017). Primary human placental trophoblasts are permissive for zika virus (ZIKV) Replication Scientific Reports, 7,1–14.
- Abushouk, A. I., Negida, A., & Ahmed, H. (2016). An updated review of Zika virus. Journal of Clinical Virology, 84, 53-58.
- Al-Qahtani A. A., Nazir N., Al-Anazi M. R., Rubino S., Al-Ahdal M. N. (2016). Zika virus: a new pandemic threat. The Journal of Infection in Developing Countries,10, 201–207.
- Alexander, N., Leda, R. Castilho, U., Yvonne G. (2018). Propagation of brazilian Zika virus strains in static and suspension cultures using Vero and BHK cells. Vaccine, 36, 3140-3145.
- Anaya JM, Ramírez-Santana C, Salgado-Castaneda I, Chang C, Ansari A, et al. (2016). Zika virus and neurologic autoimmunity: the putative role of gangliosides. BMC Medical, 14, 49.
- Alvarado, M., & Schwartz, D. A. (2017). Zika virus infection in pregnancy, microcephaly, and maternal and fetal health: what we think, what we know, and what we think we know. Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 141, 26–32.
- Araujo, L. M., Ferreira, M. L. B., & Nascimento, O. J. M. (2016). Síndrome de Guillain-Barré associada ao surto de infecção por vírus Zika no Brasil. Arquivos de Neuro-Psiquiatria, 74, 253–255.
- Atif, M., Azeem, M., Sarwar, M. R., & Bashir, A. (2016). Zika virus disease: a current review of the literature. Infections, 44, 695–705.
- Atkinson, B., Hearn, P., Afrough, B., Lumley, S., Carter, D., et al (2016). Detection of zika virus in semen. Emerging Infectious Disease, 22, 940.
- Ayres, C. (2016). Identification of Zika virus vectors and implications for control. The Lancet Infectious Diseases, 16, 278–279.
- Barjas-Castro, M. L., Angerami, R. N., Cunha, M. S., Suzuki, A., Nogueira, J. et al. (2016). Probable transfusion-transmitted Zika virus in Brazil. Transfusion, 56, 1684–1688.
- Barreto-Vieira, D., Barth, O., Nunes da Silva, M., Cardoso-Santos, C., da Silva-Santos, A. et al. (2016). Ultrastructure of Zika virus particles in cell cultures. Mem Inst Oswaldo Cruz, 111(8):532-534.
- Barreto-Vieira, D., Jácome, F., Nunes da Silva, M., Cardoso-Caldas, G., Bispo de Filippis, A. et al. (2017). Structural investigation of C6/36 and Vero cell cultures infected with a Brazilian Zika virus. PloS one, 12 12(9): e0184397.
- Barth OM. (2000). Atlas of dengue viruses morphology and morphogenesis. Oswaldo Cruz Foundation & Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, Brazil.

- Barzon L, Pacenti M, Berto A, Sinigaglia A, Franchin E, et al (2016) Isolation of infectious Zika virus from saliva and prolonged viral RNA shedding in a traveller returning from the Dominican Republic to Italy. *Euro Surveill Bull* 21, 67-81.
- Besnard, M., Lastere, S., Teissier, A., Vm, C.-L., & Musso, D. (2014). Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Euro Surveill*, 19, 8–11.
- Cao-Lormeau VM, Blake A., Mons S., Lastère S., Roche C. et al. (2016). Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet*, 387, 1531-1539.
- Carod-Artal, F. J. (2016). Epidemiology and neurological complications of infection by the Zika virus: a new emerging neurotropic virus. *Rev. Neurology*, 62, 317–328.
- Carteaux G., Maquart M., Bedet A., Contou D., Brugières P. et al. (2016). Zika virus associated with meningoencephalitis. *NEJM*, 374, 1595–1596.
- Chan, J. F. W., Yip, C. C. Y., Tsang, J. O. L., Tee, K. M., Cai, J. (2016) Differential cell line susceptibility to the emerging Zika virus: implications for disease pathogenesis, non-vector-borne human transmission and animal reservoirs. *Emerging Microbes & Infections*, 5, 93-99
- Chen, J. C., Wang, Z., Huang, H., Weitz, S. H., Wang, A., et al. (2016). Infection of human uterine fibroblasts by Zika virus in vitro: implications for viral transmission in women. *International Journal of Infectious Diseases*, 51, 139–140.
- Coelho, S. V. A., Neris, R. L. S., Papa, M. P., Schnellrath, L. C., Meuren, L. M. et al. (2017). Development of standard methods for Zika virus propagation, titration, and purification. *Journal of Virological Methods*, 246, 65-74.
- Coyne, C. B., & Lazear, H. M. (2016). Zika virus-reigniting the TORCH. *Nature Reviews Microbiology*, 14, 707–715.
- Demir, T., Kilic, S. (2016). Zika virus: a new arboviral public health problem. *Folia Microbiology*, 2, 45-51
- Dick G. W. (1952). Zika virus. II. Pathogenicity and physical properties. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygienem*, 46, 521–534.
- Donald, C., Brennan, B., Cumberworth, S., Rezelj, V., Clark J., Cordeiro M., et al (2016). Full genome sequence and sfRNA interferon antagonist activity of Zika Virus from Recife, Brazil. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10, 321-345.
- D’Ortenzio, E., Matheron, S., de Lamballerie, X., Hubert, B., Piorkowski, G. et al. (2016). Evidence of sexual transmission of Zika Virus. *NEJM*. 374, 2195–2198.
- Dowd, K. A., DeMaso, C. R., Pelc, R. S., Speer, S. D., Smith, A. R. Y. et al. (2016). Broadly Neutralizing Activity of Zika Virus-Immune Sera Identifies a Single Viral Serotyp. *Cell Reports*, 16,1485–1491.
- Duffy, M. R., Chen, T., Hancock, W., Powers, A., Kool, J., et al. (2009). Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *NEJM*. 360, 2536–2543.

- Dyer O. (2016). Jamaica advises women to avoid pregnancy as Zika virus approaches. *Brazilian Medical Journal*, 1, 352-383.
- Espinoza, M. (2017). Aspectos clínicos de la infección por el virus Zika. *An Fac med*, 78, 79-82
- Faizan, M. I., Abdullah, M., Ali, S., Naqvi, I. H., Ahmed, A. et al. (2017). Zika Virus-Induced Microcephaly and Its Possible Molecular Mechanism. *Intervirology*, 59, 152–158.
- Faria, N., Azevedo, S., Kraemer, M. (2016). Zika virus in the Americas: early epidemiological and genetic findings. *Science*, 352, 345–349.
- Fajardo A., Cristina J., Moreno P. (2016). Aparición y potencial de propagación del virus Zika. *Microbiology*, 7, 16-67.
- Fauci, D. M. Morens, A. S. (2016). Zika Virus in the Americas - Yet Another Arbovirus Threat. *NEJM*, 374, 601–604.
- Faye, O., Freire, C. C. M., Iamarino, A., Faye, O., de Oliveira, J. et al. (2014). Molecular evolution of zika virus during its emergence in the 20th century. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8,26-36.
- Fernández, I., Danis, R., Casas M. (2015). Historical inability to control *Aedes aegypti* as a main contributor of fast dispersal of chikungunya outbreaks in Latin America. *Antiviral Res.*, 124, 30–42.
- Fernández, I., Díaz, E., López, H., Alpuche, C. (2016). Chikugunya and zika virus dissemination in the Americas: different arboviruses reflecting the same spreading routes and poor vector-control policies. *Curr Opin Infect Dis*. 29(5):467–475.
- Foy, B., Kobylinski, K., Foy, J., Blitvich, B., Rosa, A. (2011). Probable Non-Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. *Emerging Infectious Diseases*, 17, 880–882.
- Gourinat A-C, O'Connor O, Calvez E, Goarant C, Dupont-Rouzeyrol M. (2015). Detection of Zika virus in urine. *Emergency Infection Dis.*, 21, 84.
- Haddow, A., Williams, M., Woodall, J., Simpson, D., Goma, L. (1964). Twelve isolations of Zika virus from *Aedes (Stegomyia) africanus* (Theobald) taken in and above a Uganda forest. *Bulletin of the World Health Organization*, 31, 57–69.
- Hajra A, Bandyopadhyay D, Hajra S. (2016). Zika virus: a global threat to humanity: a comprehensive review and current developments. *North America Journal Medical Science*, 8,123-128.
- Hamel, R., Dejarnac, O., Wichit, S., Ekchariyawat, P., Neyret, A. et al. (2015). Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells". *Journal of Virology*, 89, 8880–8896.
- Hamel R., Liègeois, F., Wichit, S., Pompo, J., Diop., F. (2016). Zika virus: epidemiology, clinical features and host-virus interactions. *Microbes and Infection*, 18, 441-449
- Haque, U., Ball, J., Zhang, W., Hossain, M., Treviño, J. (2016). Clinical and spatial features of Zika virus in Mexico. *Acta Tropical*, 162, 5-10.

- Haug CJ, Kieny MP, Murgue B. (2016). The Zika Challenge. *North America Journal Medical Science*, 374, 1801–1803.
- Huits, R., De Smet, B., Ariën, K. K., Van Esbroeck, M., Bottieau, E. et al. (2017). Zika virus in semen: a prospective cohort study of symptomatic travellers returning to Belgium. *Bulletin of the World Health Organization*, 95, 802–809.
- loos, S., Mallet, H. P., Goffart, I. L., Gauthier, V., Cardoso, T. et al. (2014). Current Zika virus epidemiology and recent epidemics, *Medicines et maladies infectieuses*. 44, 302-307.
- Krauer, F., Riesen, M., Reveiz, L., Oladapo, O., Martínez-Vega, et al. (2017). Zika Virus infection as a cause of congenital brain abnormalities and Guillain–Barré Syndrome: Systematic review. *PLoS Medicine*, 14,1–27.
- Kruger, R. P. (2016). Zika virus on the move. *Cell*, 164, 585–587
- Kumar, A., Jovel, J., Lopez-Orozco, J., Limonta, D., Airo, A. M. et al. (2018). Human sertoli cells support high levels of zika virus replication and persistence. *Scientific Reports*, 8, 1–11.
- Kumar, A., Singh, H. N., Pareek, V., Raza, K., Dantham, S. et al. (2017). Microcephaly: Imperative Role of Retinoic Acid Response Element (RARE) consensus sequence repeats in the viral genome. *Frontiers in Human Neuroscience*, 10, 1–11.
- Landry ML, St. George K. (2017). Laboratory Diagnosis of Zika Virus Infection. *Arch Pathol Lab Med*, 141, 60–67.
- Liu, S., Zhang, B. (2016). Zika virus: a flavivirus caused pandemics in Latin América. *Virología sónica*, 1, 1-2.
- Liuzzi G, Nicastri E, Puro V, Zumla A, Ippolito G. (2016). Zika virus in saliva— New challenges for prevention of human to human transmission. *Europe Journal Intern Medical*, 4, 345-356.
- Main, B. J., Nicholson, J., Winokur, O. C., Steiner, C., Riemersma, K. et al. (2018). Vector competence of *Aedes aegypti*, *Culex tarsalis*, and *Culex quinquefasciatus* from California for Zika virus. *PLoS neglected tropical diseases*, 12, 6-11.
- Mlakar J., Korva M., Tul N., Popović M., Poljšak-Prijatelj M. et al. (2016). Zika virus associated with microcephaly. *NEJM*, 374, 951–958.
- Marano, G., Pupella, S., Vaglio, S., Liumbruno, G. M., & Grazzini, G. (2016). Zika virus and the never-ending story of emerging pathogens and transfusion medicine. *Blood Transfusion*, 14, 95–100.
- Meertens, L., Labeau, A., Dejarnac, O., Cipriani, S., Sinigaglia, L., (2017). Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. *Cell Reports*. 18, 324–333.
- Miner, J. J., & Diamond M. S. (2017). Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism, *Cell Host & Microbe*. *PLoS Medicine*, 21, 134-142,
- Monaghan, A., Morin, C., Steinhoff, D., Wilhelmi, O., Hayden, M., et al. (2016). On the seasonal occurrence and abundance of the zika virus vector mosquito

- Aedes aegypti* in the contiguous United States. *PLOS Currents outbreaks*, 8,23-26.
- Musso, D., Rocheb, C., Nhana, T., Robina, E., Teissierb, A., Lormeaub, V. (2015). Detection of Zika virus in saliva. *Journal Clinical Virology*, 68, 53-5.
 - Nikolay A., Leda R., Udo R, Genzel Y. (2018). Propagation of Brazilian Zika virus strains in static and suspension cultures using Vero and BHK cells. *Vaccine*, 36, 3140-3145.
 - Noor, R. & Ahmed, T. (2018). Zika virus: Epidemiological study and its association with public health risk. *Journal of Infection and Public Health*, 11, 611–616.
 - Nunes, L., Carlini C., Marinowic D., Neto, F., Holmer H. et al. (2016). Microcephaly and Zika virus: a clinical and epidemiological analysis of the current outbreak in Brazil. *J Pediatrics Rio Janeiro*, 9, 230-240.
 - Olagnier, D., Muscolini, M., Coyne, C. B., Diamond, M. S., & Hiscott, J. (2016), Mechanisms of Zika Virus Infection and Neuropathogenesis. *DNA and Cell Biology*, 35, 367–372.
 - Pagani, I., Ghezzi, S., Ulisse, A., Rubio, A., Turrini, F., Garavaglia, E., Vicenzi, E. (2017). Human endometrial stromal cells are highly permissive to productive infection by zika virus. *Scientific Reports*. 7,1–9.
 - Parra B., Lizarazo, J., Jiménez-Arango, J., Zea-Vera, J. González-Manrique, G. et al. (2016). Guillain–Barré Syndrome Associated with Zika Virus Infection in Colombia. *NEJM*. 375, 1513-1523.
 - Petersen, L., Jamieson, D., Powers, A., Honein, M. (2016). Zika Virus. *NEJM*. 374, 1552–1563.
 - Puga T., Mario S., Padrón S., Armando, P., Rigoberto A. (2003). Síndrome de Guillain Barré. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 32, 324-356.
 - Pyzocha, N., Chinchén, S., & Maurer, D. M. (2017). Zany over Zika virus: an overview of diagnosis and treatment modalities. *Current Sports Medicine Reports*. 16: 109–113.
 - Rajah, M., Pardy, R., Condotta, S., Richer, M., Sagan, S. (2016). Zika Virus: Emergence, Phylogenetics, Challenges, and Opportunities. *Infectious Diseases*, 2, 763–772.
 - Rasmussen, S., Jamieson, D., Honein, M., Petersen, L. (2016). Zika Virus and birth defects - reviewing the evidence for causality. *NEJM*, 374:1981-1987.
 - Rodríguez-Morales, A. J. (2016). Zika and microcephaly in Latin America: An emerging threat for pregnant travelers. *Travel Med Infect Dis*, 14, 5–6.
 - Salinas S, Foulongne V, Loustalot F, Fournier Wirth C, Molès JP, et al. (2016). Le virus Zika. L'émergence d'une menace. *Medicine/ Science*. 32, 378-86.
 - Savino, W., Messias, C., Mendes-Da-Cruz, D., Passos, P., Ferreira, F. et al. (2016). Zika Virus Infection in the Elderly: Possible Relationship with Guillain-Barré Syndrome. *Gerontology*, 63, 210–215.
 - Schatzmayr H., Simonetti B., Abreu C., Simonetti J., Simonetti S. et al. (2009). Infecciones animales por virus de tipo vaccinia en el estado de Río de Janeiro:

una enfermedad en expansión. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 29, 509-14.

- Singh, R. k. Dhama, K., Karthik, K., Tiwari, R., Khandia, R., et al. (2018). Advances in Diagnosis, Surveillance, and Monitoring of Zika Virus: An Update. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2677.
- Scully, C., Robinson, A. (2016). Check before you travel: Zika virus – another emerging global health threat. *British Dental Journal*, 220, 265-267.
- Siemann, D., Strange, D., Maharaj, P., Shi, P. Y., & Verma, S. (2017). Zika Virus Infects Human Sertoli Cells. *Journal of Virology*, 91(22): e00623-17.
- Singh R, Dhama K., Malik YS, Ramakrishnan MA, Karthik K., Tiwari R., et al. (2016). Zika virus – emergence, evolution, pathology, diagnosis, and control: current global scenario and future perspectives – a comprehensive review. *Vet quart.* 36(3):150–175.
- Shastry, S., Koenig, K. L., & Hirshon, J. M. (2016). Zika Virus: Critical Information for Emergency Providers. *Emergency Medicine Clinics of North America* 34:e25–37.
- Sirohi, D., Chen, Z., Sun, L., Klose, T., Pierson, T. et al. (2016). The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. *Science*, 352, 467-470.
- Suwanmanee S., Surasombatpattana P., Soonthornworasiri N., Hamel R., Maneekan P. et al. (2018). Monitoring arbovirus in Thailand: Surveillance of dengue, chikungunya and zika virus, with a focus on coinfections. *Acta Trop.* 188, 244-250.
- Sumita L., Rodrigues, J., Ferreira, N., Felix, A., Souza, N. et al. (2016). Detection of human anti-zika virus IgG by Elisa using an antigen from in vitro infected vero cells: preliminary results. *Rev Inst Med Trop Sao Paul*, 58: 89.
- Takata CS, Kubrusly FS, Miyaki C, Mendes IF, de Rizzo E. (1994). Suscetibilidade da linhagem de células Vero a cepas vacinais do vírus do sarampo. *Rev Saude Pública* 28, 209-12.
- Tognarelli, J., Ulloas, S., Villagra, E., Lagos, J., Aguayo, C. et al. (2016). A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. *Arch Virology.* 161:665–668.
- Weaver, S. C., Costa, F., Garcia-Blanco M. A., Ko, A. I., Ribeiro, G.S. et al. (2016). Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. *Res. Antiviral*, 130, 69–80.
- Weger-Lucarelli, J., Rückert, C., Chotiwan, N., Nguyen, C., Garcia-Luna, S. et al. (2016). Vector Competence of American Mosquitoes for Three Strains of Zika Virus. *PLoS neglected tropical diseases.* 10(10):e0005101
- Yun, S. I., & Lee, Y. M. (2017). Zika virus: An emerging Flavivirus. *Journal of Microbiology*, 55(3):204–219.

URL

- Centro para el control y la prevención de enfermedades. (2018). Microcefalia y otros defectos congénitos. Consultado el 29 de noviembre del 2018, Disponible en: <https://bit.ly/2WUMgsd>

- Organización Mundial de la Salud. (2017). Informe sobre la situación Virus de Zika. Consultado el 04 de noviembre del 2018. Disponible en <https://bit.ly/2D2VyuW>
- OPS/OMS (2018). Alerta epidemiológica: aumento de la microcefalia en el noreste de Brasil. Consultado del 08 de diciembre del 2018, Disponible en <https://bit.ly/2uUlvXY>
- OMS. (2016). Microcefalia y su posible asociación con el virus zika. Consultado el 29 de noviembre del 2018. Disponible en: <https://bit.ly/2Uq5VUf>
- OPS. (2015). Alerta epidemiológica: Infección por virus Zika. Consultado el 13 de noviembre del 2018. Disponible en <https://bit.ly/2uTtw0o>
- PBD. (2016). Zika virus. Consultado el 27 de noviembre del 2018 Disponible en: <https://bit.ly/2WS4meg>
- Secretaria de Salud. (2017). Primer caso de microcefalia asociado con Zika. Consultado el día 04 de febrero del 2019. Disponible en <https://bit.ly/2UGfcqy>
- Secretaria de Salud. (2019). Zika información relevante. Consultado el día 04 de febrero del 2019. Disponible en <https://bit.ly/2Vwenxt>
- Secretaria de Salud. (2019). Casos confirmados de infección por ZIKV 2019. Consultado el día 03 de abril del 2019. Tomado de <https://bit.ly/2UI326U>
- WHO. (2016). WHO statement on the first meeting of the International Health Regulations (2005) (IHR 2005) Emergency Committee on Zika virus and observed increase in neurological disorders and neonatal malformations Consultado el 22 de diciembre del 2018. <https://bit.ly/2t7Imzr>