



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

"Identificación de virus Zika en el binomio madre- hijo (a)
durante la alimentación al seno materno de una zona no-
endémica pero vulnerable en la Sierra de Guerrero"

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN:

NEONATOLOGÍA

P R E S E N T A

DRA. NADIA GARCÍA LEMUS

TUTOR:

DRA. DINA VILLANUEVA GARCÍA



Ciudad de México, febrero 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

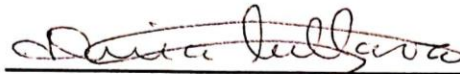
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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.

DR. SARBELIO MORENO ESPINOSA
DIRECTOR DE ENSEÑANZA Y DESARROLLO ACADÉMICO

DIRECTORA DE TESIS



DRA. DINA VILLANUEVA GARCÍA
JEFE DE DEPARTAMENTO DE NEONATOLOGÍA

ASESOR DE TESIS



DR. JOSÉ ARELLANO GALINDO
INVESTIGADOR EN CIENCIA MÉDICAS D DEL LABORATORIO DE
VIROLOGÍA, DEPARTAMENTO DE INFECTOLOGÍA

Proyecto aprobado por la dirección de Investigación del Hospital Infantil de México
"Federico Gómez" HIM 2018 037 FF Y HIM 2017 015

ÍNDICE

RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	5
MARCO TEÓRICO	5
VIRUS ZIKA	5
Estructura	5
Mecanismos de transmisión.....	6
Otros mecanismos de transmisión.....	7
Cuadro clínico.....	8
Diagnóstico	9
Tratamiento.....	10
ANTECEDENTES	10
Estado de Guerrero y el virus Zika	10
Zika y leche materna	11
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	12
JUSTIFICACIÓN	13
OBJETIVOS	13
MÉTODOS	13
CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	15
PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO	15
DESCRIPCIÓN DE VARIABLES.....	18
RESULTADOS	19
DISCUSIÓN	28
CONCLUSIÓN.....	30
LIMITACIONES DEL ESTUDIO	31
CRONOGRAMA.....	31
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
ANEXOS.....	34

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: El virus Zika puede está asociado con múltiples anomalías congénitas como microcefalia y otras anomalías del sistema nervioso central.

OBJETIVO: Analizar la presencia de virus Zika en el binomio madre – hijo (a) alimentados con leche materna, de una población de la Sierra Alta del Estado de Guerrero.

MATERIAL Y MÉTODOS: Se realizó un estudio de tipo observacional, prospectivo y transversal. Se revisaron 58 muestras de los binomios madre-hijo de mujeres de la etnia mé'phaa del estado de Guerrero. Se analizaron muestras de sangre y leche materna en busca de virus Zika. Se realizó serología en todos los casos.

RESULTADOS: Se analizaron 58 muestras de sangre del binomio madre – hijo (a), se obtuvieron 11 muestras de serologías maternas que salieron positivas (37%) a las cuales se le aplicó RT-PCR, que dieron negativo en todos los casos, se analizaron las muestras de recién nacidos y todas (29, 100%) fueron negativas, se realizó RT PCR únicamente a los pacientes cuya madre tuvo serología positiva, la cual también resultó negativa en todos los casos. En el 41% de los pacientes el perímetro cefálico se encontró por debajo de la percentila 3, sin embargo, no podemos asociar estos resultados a infección por Zika, ya que las serologías y RT-PCR fueron negativos. No se encontraron partículas de virus en leche materna.

CONCLUSIONES: La infección por virus Zika se ha asociado con múltiples alteraciones a nivel del sistema nervioso central, principalmente microcefalia.

La ausencia de virus Zika en los binomios obtenidos pone en evidencia la posible poca o nula prevalencia en la zona estudiada, sin embargo, la presencia de 11 casos de reacción cruzada hace sugerir la posible presencia de otro flavivirus que no se ha estudiado. Debido a que las ventajas para la salud de la lactancia materna se consideran mayores que el riesgo potencial de transmisión, la OMS recomienda que las madres continúen amamantando. Esta revisión no identificó ningún dato que pudiera alterar esta recomendación.

INTRODUCCIÓN

El virus Zika (ZIKV) es un flavivirus ARN que contiene 10,794 nucleótidos que codifican 3,419 aminoácidos, relacionado con la fiebre amarilla, dengue, virus del Nilo Occidental y la encefalitis japonesa. Es inactivado por el permanganato de potasio, el éter y temperaturas > 60°C, pero no es neutralizado con eficacia en etanol de 10%. Aun cuando hoy se ha demostrado que es transmitido por el vector de tipo Aedes, ha sido aislado de los moscos *Ae. africanus*, *Ae. apicoargenteus*, *Ae. luteocephalus*, *Ae. aegypti*, *Ae. vittatus* y *Ae. furcifer*. Se identificó por primera vez en Uganda de un mono Rhesus cuando se realizaba un estudio acerca de la transmisión de la fiebre amarilla en la selva de Zika en 1947 y es endémico en África y el sudeste asiático. Análisis genéticos han demostrado que existen dos cepas principales del virus: la africana y la asiática.

El virus Zika puede estar asociado con múltiples anomalías congénitas como microcefalia y otras anomalías raras del SNC, incluido el cuerpo calloso o la agenesia septal, la espina bífida y la disfunción del tronco encefálico. ^{1, 2}

MARCO TEÓRICO

VIRUS ZIKA

El virus Zika es un flavivirus monocatenario de ARN estrechamente relacionado con el dengue, la fiebre amarilla y los virus del Nilo occidental, y se transmite con mayor frecuencia a través de la picadura de mosquitos *Aedes (Stegomyia)* infectados. ^{1,3}

Estructura

El virus Zika ha sido clasificado como miembro de la familia *Flaviviridae*, género flavivirus. La partícula del virus Zika tiene la misma estructura general como otras especies de flavivirus. Es esférico de 42-52nm de diámetro. Su envoltura está formada por una bicapa lipídica incrustada en 180 unidades de glicoproteínas E y M para unirse a una variedad de receptores celulares. La glicoproteína E tiene una

estructura típica de tres dominios, pero difiere de la del virus Dengue porque tiene un solo sitio de glicosilación (Asn154) que aparece como una pequeña protrusión en la superficie viral, este sitio de glicosilación se ha relacionado con el neurotropismo.

La nucleocápside del virus Zika está formada por la proteína C asociada con una molécula de ARN viral monocatenaria que tiene una organización genómica característica de la familia *Flaviviridae*, que codifica tres proteínas estructurales y siete no estructurales. La bicapa lipídica involucrada en la unión de los receptores celulares forma la envoltura. La proteína E es la proteína principal de la superficie que funciona en diversos aspectos de la unión, la fusión de la membrana y el ciclo de replicación. ^{4,5}(Figura 1)

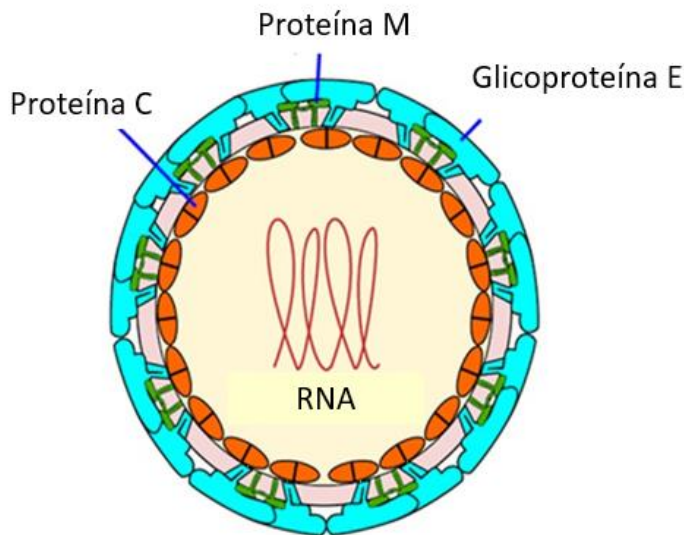


Figura 1. Estructura del virus Zika. Fuente: Mittal R, Nguyen D, Debs LH, et al. Zika Virus: An Emerging Global Health Threat. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:486.

Mecanismos de transmisión

La combinación de la envoltura viral con la membrana del endosoma de la célula huésped crea el mecanismo de penetración del genoma del flavivirus en el citoplasma mediante un método desencadenado por un pH ácido dentro de los endosomas celulares. Se sabe que la membrana de la célula hospedadora produce un entorno adecuado para la replicación viral en el retículo endoplasmático y la mayoría de los arbovirus se replican dentro de las dendritas de la piel en el sitio de inoculación

primario, más tarde, se propagan a los ganglios linfáticos regionales por el torrente sanguíneo. El ciclo de replicación se completa en cuatro etapas, es decir, la traducción del ARN en proteínas virales, la replicación del ARN viral, el ensamblaje de la partícula viral en el retículo endoplásmico y la liberación de viriones. Las réplicas de virus Zika se encuentran en la glándula salival y en el intestino medio de mosquitos *Aedes*. La infectividad viral y la replicación se ven aumentadas por los productos de las glándulas salivales del mosquito. Pueden existir diversas relaciones con los organelos celulares para ayudar a la replicación, evasión y propagación viral en el citoplasma celular, aunque el proceso exacto se desconoce. Se ha sugerido en ratones infectados que el virus se replica principalmente en las células del cerebro, nervioso y las células astrogliales, mientras que puede replicarse *in vitro* en células de mono cultivadas. ⁵

La transmisión de los arbovirus involucra por un vector artrópodo (principalmente especies de mosquitos y garrapatas) y un huésped vertebrado. Estos artrópodos son endémicos de la región tropical y subtropical del mundo que promueve el ciclo del trípode. En la mayoría de los casos, el virus no causa ninguna enfermedad en su huésped natural, por lo tanto, el virus tiene que estar en cantidad suficiente en la sangre o tejidos del huésped vertebrado para ser arrastrado por el artrópodo cuando muerde al huésped natural. El virus luego tiene que sobrevivir en el artrópodo y, en algunos casos, replicarse en un tejido específico del artrópodo y, una vez más, estar en cantidades infecciosas suficientes para ser entregado por el artrópodo a otro huésped natural para continuar el ciclo. Los mosquitos generalmente se alimentan de néctares de plantas y es principalmente el mosquito hembra que se alimenta de sangre de vertebrados que es lo que se necesita para la maduración de los huevos que transporta.⁶

Otros mecanismos de transmisión

En el pasado, se asumió que el virus Zika se transmitía únicamente por picaduras de mosquitos del género *Aedes* (subgénero *Stegomyia*). Esta noción fue cuestionada cuando se identificaron otros modos de transmisión. Muchas especies

del género *Aedes* pueden propagar el virus en diferentes regiones geográficas en entornos naturales y urbanos, sin embargo, su potencial como vectores es variable y solo el 20-50% de las hembras infectadas portan partículas de virus en la saliva en algunas especies. La saliva y la orina ahora se aceptan como vehículos para la transmisión del virus del Zika, ya que las partículas viables del virus del Zika se aislaron de la saliva y la orina de dos pacientes en fase aguda en Brasil. El virus se cultivó en células Vero, lo que indujo efectos citopáticos típicos y aumentó la posibilidad de transmisión de un paciente infectado a un huésped humano no inmune. La presencia de partículas viables del virus Zika en las bolsas de sangre puede tener graves consecuencias, especialmente para las mujeres embarazadas. La circulación simultánea de dos o más arbovirus en muchos países destaca la necesidad de un análisis adecuado de las muestras de sangre para estos virus. Se detectó material genético de tres virus diferentes en muestras de un solo paciente en América Latina y se detectaron ARN del virus Zika y partículas viables en muestras de sangre de donantes asintomáticos en la Polinesia Francesa. En Brasil, se detectó ARN viral en un paciente que recibió una transfusión de sangre de un donante asintomático que desarrolló la enfermedad unos días después. ⁴

Cuadro clínico

Las infecciones por ZIKV son en su mayoría asintomáticas. En cuanto a las manifestaciones del Zika congénito, a principios de 2016, en Brasil se empezó a estudiar a un grupo de mujeres con infección por virus Zika confirmada por PCR durante su embarazo. El examen ultrasonográfico, demostró anomalías congénitas en el 42% de los fetos, con una amplia gama de fenotipos clínicos incluyendo retraso del crecimiento intrauterino, disminución del flujo de la arteria cerebral, anhidramnios, calcificaciones cerebrales, microcefalia y muerte fetal. Con estudios posteriores de resonancia magnética y tomografía computada, se encontraron otras anomalías en el desarrollo del cerebro humano, incluyendo: hipoplasia del cerebelo y tronco cerebral, defectos en el cuerpo calloso y malformaciones corticales. Así, aunque la microcefalia ha sido la malformación congénita relacionada con virus Zika más reconocida, las consecuencias clínicas de

la infección congénita son bastante variadas. Cultivos celulares han demostrado que el virus Zika infecta y causa la apoptosis de las células progenitoras neurales de manera preferencial.

La infección por virus Zika en pacientes mayores puede causar: conjuntivitis no purulenta, uveítis y también puede causar atrofia corioretinal, neuritis óptica, retina. Las consecuencias a largo plazo de la infección congénita por virus Zika, no se conocen, especialmente en neonatos con apariencia normal. ⁷

Diagnóstico

La limitada capacidad para el diagnóstico y la poca disponibilidad de pruebas, creó la necesidad de dar prioridad a las mujeres embarazadas.

Además, el diagnóstico de virus Zika presenta una serie de otros desafíos, ya que el virus reacciona de forma cruzada serológicamente con otros flavivirus, como el virus del dengue (DENV), el virus del Nilo Occidental y el virus de la fiebre amarilla. Por lo tanto, la infección actual o pasada, o incluso la vacunación con otro flavivirus, a menudo causará resultados de anticuerpos falsos positivos o no interpretables.

Durante la infección aguda, el ARN del virus Zika puede ser detectable en el suero días antes y varios días después del inicio de los síntomas. En contraste, el anticuerpo IgM comienza a aparecer de 4 a 7 días después del inicio de la enfermedad y persiste durante aproximadamente 12 semanas.

En el feto el principal medio de detección es la prueba de la madre. Si las pruebas indican que una mujer ha sido infectada durante el embarazo, se debe utilizar ultrasonido fetal para monitorear el desarrollo de anomalías, incluyendo microcefalia, desarrollo cerebral interrumpido, calcificaciones intracraneales, anomalías oculares, restricción de crecimiento intrauterino, y anomalías de las extremidades. Se ha reportado líquido amniótico positivo para virus Zika mediante técnica de RT-PCR en algunos embarazos con fetos afectados. Las pruebas para diagnosticar la infección en el feto no han sido bien definidas debido a la falta de datos sobre la sensibilidad, tiempo óptimo de prueba y valor predictivo positivo.

Si la madre de un recién nacido tiene sospecha de infección, se debe evaluar el suero del paciente, tejido placentario, cordón umbilical y líquido cefalorraquídeo enviando serología, RT-PCR e histopatología, según corresponda. Es importante destacar que se deben tomar varias muestras de tejido, tanto materno como del feto.⁸

Tratamiento

No existe un tratamiento específico o medicamento antiviral para la infección por virus Zika. Las recomendaciones se basan en tratamiento sintomático con analgésicos (paracetamol), antihistamínicos y aumentar el consumo de líquidos, en el caso de infección aguda. Se desaconseja el tratamiento con AINES y esteroides. Se recomienda además el aislamiento del paciente para prevenir la infección de otras personas.⁹

ANTECEDENTES

Estado de Guerrero y el virus Zika

El estado de Guerrero se sitúa en la parte meridional de la República Mexicana entre los paralelos 16°17' y 18°59' de latitud norte y en los 98°04' y 102°10' de longitud oeste respecto al meridiano de Greenwich. Con una superficie de 63,596 km², abarca 3.24% del territorio de México y ocupa el 14° lugar en relación con las demás entidades federativas.

La región me'phaa se localiza entre la vertiente de la Sierra Madre del Sur y la costa del estado de Guerrero, localizada en el sureste del estado de Guerrero en altitudes que varían de 800 a 3050 metros sobre el nivel del mar. La población me'phaa se ubica, en su mayoría, en los distritos de Morelos y Montaña, principalmente en los municipios de Acatepec, Atlixac, Malinaltepec, Tlacoapa, San Luis Acatlán y Zapotitlán Tablas y, en menor concentración, en Atlamajalcingo del Monte,

Metlatonoc, Tlapa, Quechultenango, Ayutla, Azoyú y Acapulco. La región me'phaa se encuentra sumamente incomunicada debido a lo accidentado de su topografía.¹⁰

Las variables climáticas, como la lluvia, la temperatura y la humedad relativa, permiten predecir la presencia del *Aedes aegypti*. Se cree que la altura también desempeña un papel importante y que los lugares más altos tienen menos riesgo (es muy poco frecuente hallar el mosquito en zonas situadas a más de 1.700 m), por lo que la región me'phaa no se considera una zona endémica. El riesgo de la enfermedad disminuye con la altura y esta es la razón por la que históricamente la gente se ha asentado en estas regiones montañosas. ¹¹

Zika y leche materna

El virus Zika es una causa de microcefalia y otros defectos cerebrales fetales graves. Una mujer embarazada que ya esté infectada con el virus Zika puede transmitir el virus a su feto durante el embarazo o alrededor del momento del nacimiento. Se ha encontrado el virus en la leche materna y se han identificado posibles infecciones en recién nacidos que están siendo amamantados, sin embargo, no se ha confirmado la transmisión por leche materna. Además, aún no sabemos los efectos a largo plazo del virus Zika en bebés pequeños infectados después del nacimiento. Debido a que la evidencia actual sugiere que los beneficios de la lactancia materna superan el riesgo de propagación del virus del Zika a través de la leche materna, los Centros para Control de Enfermedades y Prevención (CDC) continúa alentando a las madres a amamantar, incluso si estaban infectadas o vivían o viajaban a un área con riesgo de Zika.¹²

Una revisión sistemática de estudios observacionales y estudios de casos analizó 3 casos de madres lactantes de la Polinesia francesa con infección por virus Zika, los resultados de detección de leche materna fueron positivos en todos los casos al igual que el estudio por PCR, sin embargo, los resultados de los recién nacidos fueron: uno no concluyente, otro negativo y el otro positivo, por lo que los datos no son suficientes para concluir transmisión a través de la lactancia materna. Se

necesita más evidencia para distinguir la transmisión de la lactancia materna de otras vías de transmisión perinatal. ¹³

En un reporte de casos de Río de Janeiro, Brasil, se analizaron cuatro casos de infección por virus Zika, se encontró excreción del virus en diferentes fluidos (suero, orina y leche materna), sin embargo, los niños amamantados no tuvieron signos o síntomas de enfermedad. ¹⁴

Se realizó una revisión sistemática de infecciones por flavivirus (Dengue, Virus del Nilo occidental, y virus Zika) detectando ácido ribonucleico en leche materna, sin embargo, la transmisión únicamente fue confirmada para fiebre amarilla. ¹⁵

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Guerrero es el segundo estado con más casos de virus Zika y el cuarto estado con el mayor número de casos en mujeres embarazadas. La mayor parte de los casos es transferida mediante la picadura de mosquito, pero no se descartan otros mecanismos de transferencia poco estudiados como la vía perinatal. Se han encontrado partículas de virus en leche materna, sin embargo, no se ha logrado identificar un mecanismo de transmisión a través de esta. Por lo que el estudio de mujeres que lactan a sus recién nacidos podría ayudar a esclarecer este mecanismo. Como se mencionó la población estudiada no es una zona endémica, ya que la altitud a la que se encuentra no es favorable para la reproducción del mosquito, por lo que el mecanismo de transmisión directo hacia los recién nacidos es poco probable.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la prevalencia de virus Zika en el binomio madre – hijo (a) durante la lactancia en una zona de la Sierra de Guerrero?

JUSTIFICACIÓN

Existe evidencia que demuestra la capacidad del virus Zika para ser transmitido mediante otros mecanismos no asociados a vectores, pues se han reportado casos de transferencia perinatal, se han encontrado en bolsas de sangre y se ha detectado el virus en cultivo de leche materna. Sin embargo, no se ha realizado un estudio que determine la prevalencia de virus Zika en una zona endémica como la Sierra de Guerrero.

OBJETIVOS

▶ GENERAL

- ▶ Analizar la presencia de Virus Zika en el binomio madre – hijo (a) alimentados con leche materna, de una población de la Sierra Alta del Estado de Guerrero.

▶ ESPECÍFICOS

- ▶ Identificar la presencia de virus Zika mediante serología en muestras de sangre de mujeres durante la etapa de lactancia.
- ▶ Analizar la presencia de virus Zika en muestras de leche materna.
- ▶ Establecer la presencia de infección por virus Zika en sangre de los hijos (as) durante la etapa de lactancia.

MÉTODOS

❖ Diseño

Se realizó un estudio de tipo observacional, prospectivo y transversal.

❖ Población a estudiar

Se estudió una población nativa de la sierra alta de Guerrero en el municipio de Ayutla de los libres de la etnia mé'phaa. La población mé'phaa, es un grupo nativo establecido en la vertiente del río papagayo de la sierra madre del sur y la costa del estado de Guerrero, es una población marginada y cuyos servicios de salud son precarios. No utilizan sistemas de drenaje, existe una pobre sanitización y por ello el encharcamiento del agua es común durante el período de lluvias, teniendo como consecuencia, la fácil diseminación al ambiente de vectores transmisores de enfermedades, de acuerdo a los reportes este es uno de los municipios en los que más casos se han reportado.

Universo:

❖ Selección de la muestra

- Método de muestreo: por conveniencia.
- Previa aceptación con cartas de consentimiento informado, firmadas por la máxima autoridad del pueblo y posteriormente la participante.
- Se realizó una revisión general, (antecedentes, somatometría, exploración física y padecimiento actual) a las madres que aceptaron participar en el estudio.
- Se revisaron 58 muestras de los binomios madre – hijo (a).
- Se realizó hoja de captura de datos (anexo 1).

❖ Criterios de Selección

- Criterios de inclusión
 - Mujeres que estuvieran lactando a sus hijos (as).
 - Mujeres que cumplan con el criterio anterior y que hayan aceptado firmar la carta de consentimiento.

- *Criterios de exclusión*

- Mujeres que estuvieran lactando a sus hijos (as) y que no hayan aceptado firmar la carta de consentimiento.

- *Criterios de eliminación*

- Mujeres que estuvieran lactando a sus hijos (as) y que por alguna condición se dificulte la toma de las muestras.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Las muestras se tomaron previo consentimiento informado, firmado por la máxima autoridad del pueblo y por parte de la madre. Se respetó la decisión de la madre o familiar que no acepto participar en este estudio.

En el presente trabajo se tomaron muestras de sangre mediante una técnica mínimamente invasiva.

Dichas muestras se manejaron en el laboratorio bajo un nivel de bioseguridad tipo II y bajo los lineamientos de manejo de la norma oficial mexicana NOM-007-SSA3-2011, por lo mismo se consideró un proyecto con riesgo mínimo.

PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

1. SEROLOGIA.

La presencia de anticuerpos anti ZIKV IgG e IgM se determinó en campo con el objetivo de transportar sólo muestras positivas. Se consideraron como positivas, todas aquellas muestras IgG+/IgM-, IgG-/IgM+ e IgG+/IgM+, se descartaron

aquellos casos IgG-/IgM-. Se usó un sistema inmunocromatográfico ARTRON Zika rapid test kit. Este sistema consiste de un casete que permite la detección de anticuerpos IgG e IgM en la sangre de la madre y del neonato. Para su uso se siguieron las indicaciones del fabricante.

2. CULTIVOS CELULARES

La leche materna se diluyó 1:2 en medio D-MEM 2% (Gibco) de SFB (Gibco) con un filtro Millipore de 0.22 μ m. La mezcla D-MEM y muestra se adicionó a una monocapa confluyente de células Vero, crecida en una microplaca de seis pozos. Se centrifugó en un rotor de placas a 500 RPM durante 30 minutos y el medio se sustituyó por D-MEM 2% de SFB.

3. CONFIRMACIÓN MEDIANTE RT-PCR

Las muestras de sangre y leche se sometieron a un método confirmatorio mediante RT-PCR de punto final con oligonucleótidos previamente diseñados.

A) Extracción de RNA

La extracción de RNA se realizó mediante la técnica de TRIzol (Gibco-BRL), siguiendo las instrucciones del proveedor, para líneas celulares. Se homogenizó el paquete celular con 1 ml de TRIZOL (Gibco-BRL), posteriormente se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente, pasado este tiempo se adicionaron 200 μ l de cloroformo, se homogenizó suavemente por 15 segundos y se incubó 3 min a temperatura ambiente, pasado este tiempo se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, obteniéndose 3 fases, la fase acuosa que es la que se queda en la parte superior, se transfirió a un microtubo nuevo y limpio, posteriormente se adicionaron 500 μ l de isopropanol y se volvió a homogenizar suavemente, se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente, se centrifugará a 12000 rpm durante 10 min a 4°C, se decantó el sobrenadante y el pellet de RNA se lavó con 1 ml de etanol al 75%, este se resuspendió en vórtex, se centrifugó nuevamente a 7000 rpm por 5

minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y se dejó secar el pellet de RNA durante 5 minutos a temperatura ambiente, este se resuspendió con 40 µL de Agua libre de RNAsas (Agua –DEPC) y se incubará en un baño de agua a 55 – 60 °C por 10 minutos.

B) RT-PCR de punto final.

Esta se realizó con los RNAs previamente extraídos, se realizó un sistema en dos pasos, usando el sistema ACCESS RT-PCR kit de promega. Un primer paso para la síntesis de cDNA AMV-RT, Tfl DNA Polimerasa, amortiguador de reacción AMV/Tfl, mezcla de DNTPs, Sulfato de Magnesio, el RNA previamente extraído y oligo dT. Para la segunda reacción se utilizaron los mismos reactivos y los oligonucleótidos previamente reportados, para obtener un producto de 327 pb el cual se visualizó en un gel de agarosa al 2%.

4. CUANTIFICACIÓN MEDIANTE CARGA VIRAL

Se realizó en un termociclador de tiempo real ABI prism 7000 de Applied biosystems, para ellos se utilizó una taq man master mix con el cDNA previamente extraído, los oligonucleótidos y la sonda. En todos los casos se utilizó como control positivo la cepa Zika ATCC-VR84.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizaron mediana y porcentajes para variables cuantitativas y cualitativas respectivamente. Los datos se muestran en tablas y gráficas sectoriales y barras, se utilizaron medidas de tendencia central para establecer máximos, mínimos y medianas de cada uno de los valores demográficos.

DESCRIPCIÓN DE VARIABLES

❖ Variables de estudio:

DEFINICION DE VARIABLES			
	DEFINICION OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE	UNIDAD DE MEDICION
Edad materna	Tiempo transcurrido a partir del nacimiento de una persona.	Cualitativa Discreta	Nominal
Número de embarazos	Número de gestaciones que tiene una mujer	Cualitativa Discreta	Nominal
Vía del nacimiento	Vía de nacimiento del paciente	Cualitativa Discreta	Nominal
Edad del paciente	Tiempo transcurrido a partir del nacimiento de una persona.	Cualitativa Discreta	Nominal
Peso al nacimiento	Cantidad de masa de un cuerpo.	Cualitativa Discreta	Nominal
Género	Conjunto de características diferentes que cada sociedad asigna a hombres y mujeres.	Cualitativa Nominal Dicotómica	F/M
Perímetro cefálico al nacimiento	Medición de la circunferencia cefálica	Cualitativa Nominal	Nominal
Lactancia materna	Alimentación con leche de la madre	Cualitativa Discreta Nominal Dicotómica	Si/No Nominal
Virus Zika	Presencia de flavivirus, ARN en sangre o leche	Cualitativa Discreta Dicotómica	Si/No Nominal

RESULTADOS

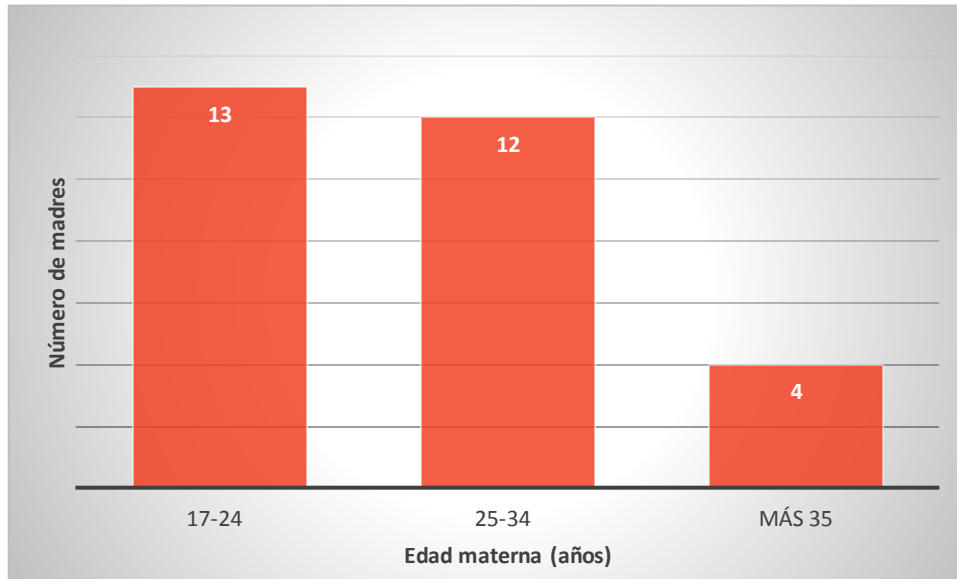
Se realizó un estudio de tipo prospectivo, transversal. Se analizaron las muestras de sangre y leche materna del binomio madre- hijo (a), de mujeres que se encontraban en etapa de lactancia, de la zona de la Sierra Alta de Guerrero.

Durante el periodo de lluvias (agosto – diciembre de 2016), se analizaron 58 muestras de sangre de binomio madre-hijo (a), y 29 muestras de leche materna. La tabla 1 muestra las características demográficas de los pacientes y sus madres.

Tabla 1. Características de los pacientes en un estudio de identificación de virus Zika en el binomio madre -hijo (a), Guerrero, México, n= 29.

Características	n=29 (%)	MEDIANA (Max-Min)
<i>Edad materna (años)</i>		
17-24	13 (45)	25 (48/17)
25-34	12 (41)	
Más de 35	4 (14)	
<i>Número de embarazos</i>		
Primiparidad	8 (28)	3(10/1)
Multiparidad (Más de 2)	21 (72)	
<i>Género del recién nacido</i>		
Femenino	14 (48)	
Masculino	15 (52)	
<i>Vía de nacimiento</i>		
Parto	22 (76)	
Cesárea	7 (24)	
<i>Peso al nacimiento (gramos)</i>		
Menos 1500	0	3000 (4400/1700)
1500-2500	6 (21)	
Más de 2500	15 (52)	
Desconocido	8 (28)	
<i>Edad del paciente (meses)</i>		
Menor de 1 mes	1 (3)	8 (24/1)
1 - 6 meses	10 (34)	
6 - 12 meses	13 (45)	
12-24 meses	5 (17)	
<i>Lugar de nacimiento</i>		
Casa	15 (52)	
Hospital	11 (38)	
Centro de salud	3 (10)	

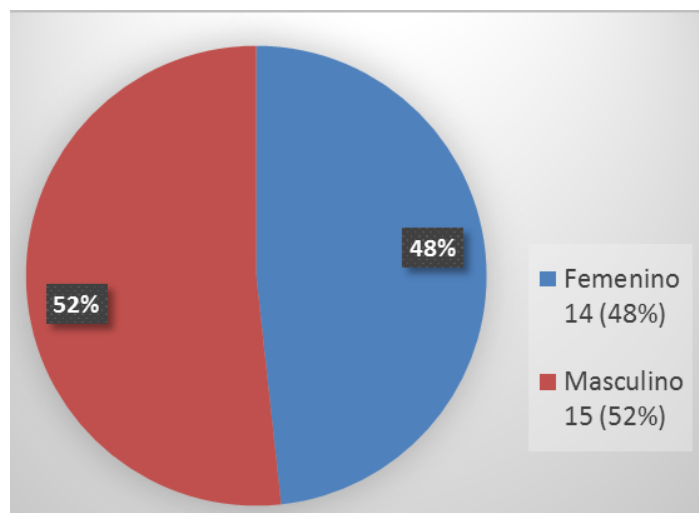
La mediana de la edad materna fue de 25 años, mientras que la madre de mayor edad fue de 48 años y la más joven (primigesta) de 17 años. Predominando las madres jóvenes que se encuentran en edad reproductiva. (Gráfica 1)



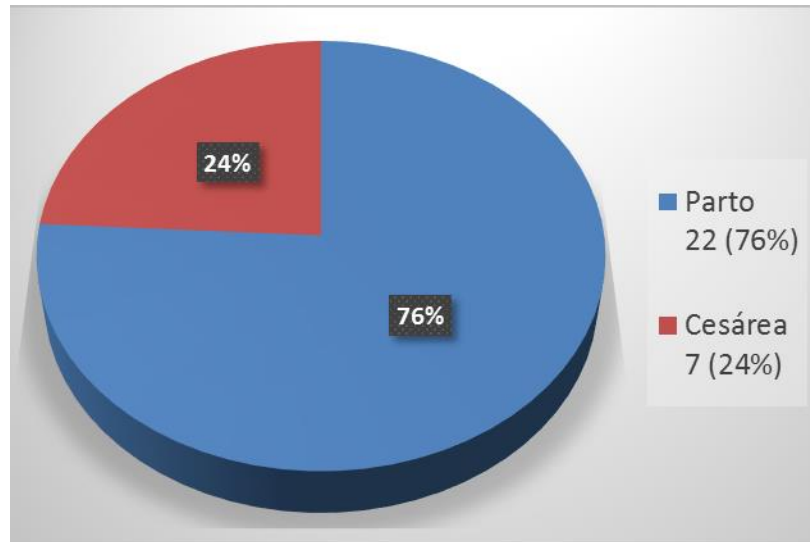
Gráfica 1. Edad materna, n= 29.

La multiparidad, definida como un número de embarazos mayor de 2, se encontró en el 72% de las mujeres, mientras que el mayor número de hijos fue de 10.

El género de los hijos (as) fue muy similar, 50 vs 48%, como se muestra en la gráfica 2.

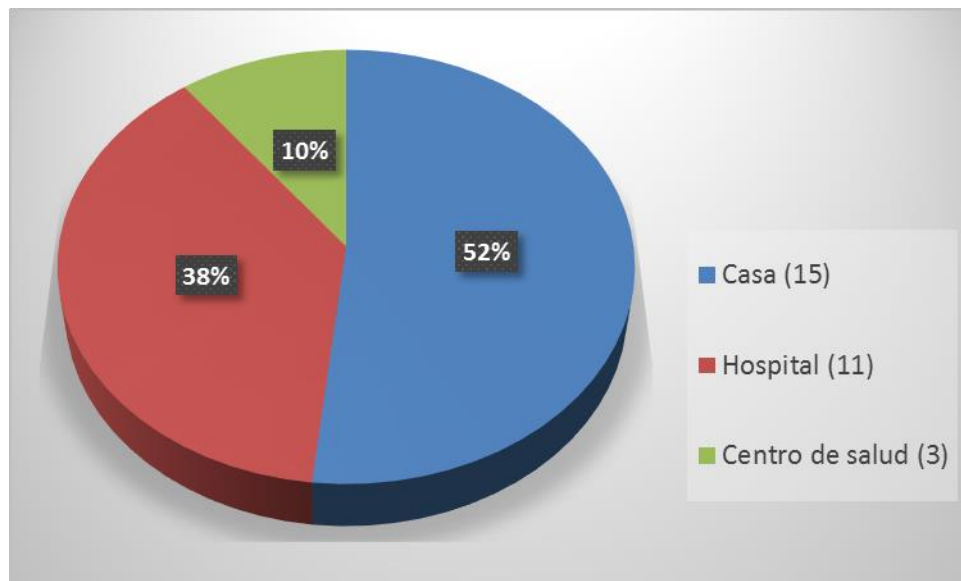


Gráfica 2. Género de hijos (as), n=29.



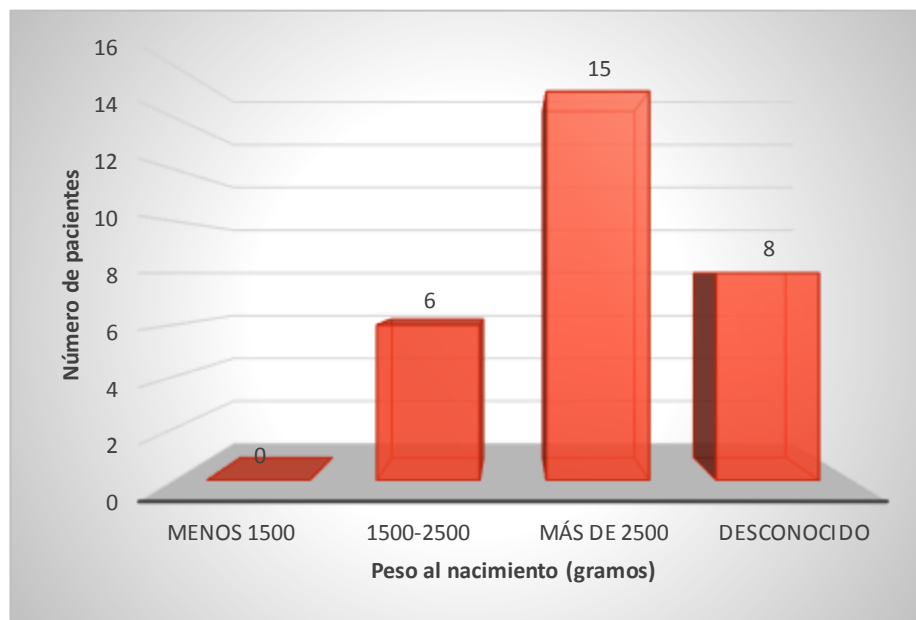
Gráfica 3. Vía de nacimiento, n= 29.

La vía de nacimiento más frecuente fue el parto en un 72% de los casos, cabe mencionar que está población tiene poco acceso a servicios de salud por la distancia que tienen que recorrer para llegar a algún hospital o centro de salud, por lo que la gran mayoría de los partos son atendidos en casa por partera o por el mismo padre. (Gráfica 3 y 4)



Gráfica 4. Lugar de nacimiento del paciente, n= 29.

Dado el sitio de atención al nacimiento, fue muy difícil recolectar información acerca de la edad de gestación de los pacientes, al igual que información del nacimiento (peso, talla, perímetro cefálico), pero, de acuerdo a los datos recolectados podemos inferir que la mayoría de los pacientes fueron de término, sin embargo, existe un paciente con peso bajo (1700 g) que fue atendido en su casa y que probablemente cursó con restricción del crecimiento intrauterino, sin embargo, no podemos descartar alguna otra patología. La mayoría de los pacientes tuvieron un peso adecuado al nacimiento (15 (52%)), 6 tuvieron peso bajo (21%) y ningún paciente tuvo peso muy bajo o extremadamente bajo al nacimiento. (Gráfica 5)

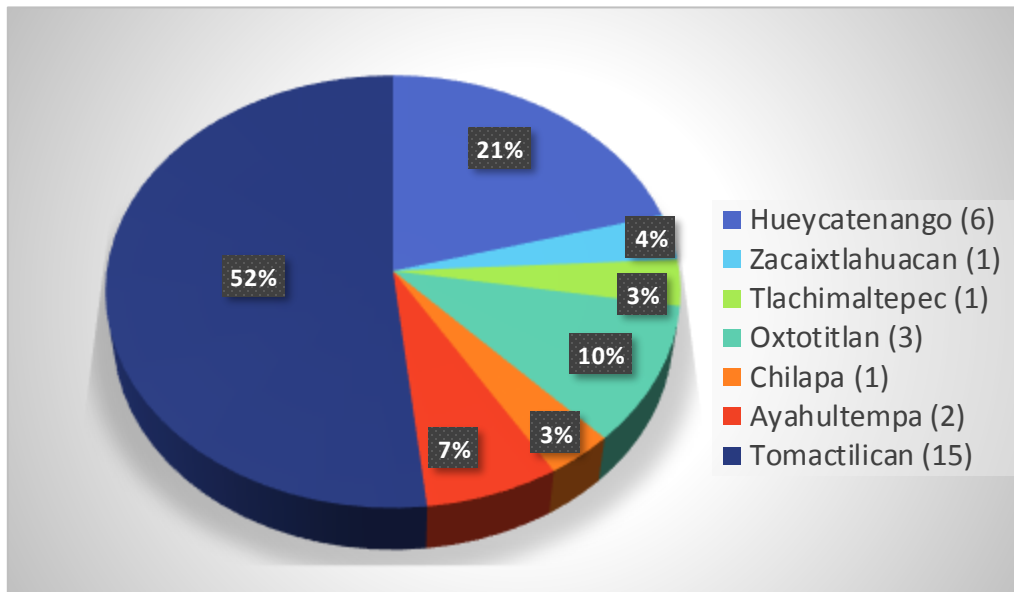


Gráfica 5. Peso de los pacientes al nacimiento, n= 29.

Todos los pacientes estudiados fueron lactantes (1 m - 24 meses) con lactancia materna exclusiva. La edad media de los pacientes fue de 8 meses, el paciente más pequeño tenía un mes de edad y el más grande 24 meses. (Tabla 2)

Tabla 2. Edad de los pacientes estudiados en meses, n=29.	
Menor de 1 mes	1
1 - 6 meses	10
6 - 12 meses	13
12-24 meses	5

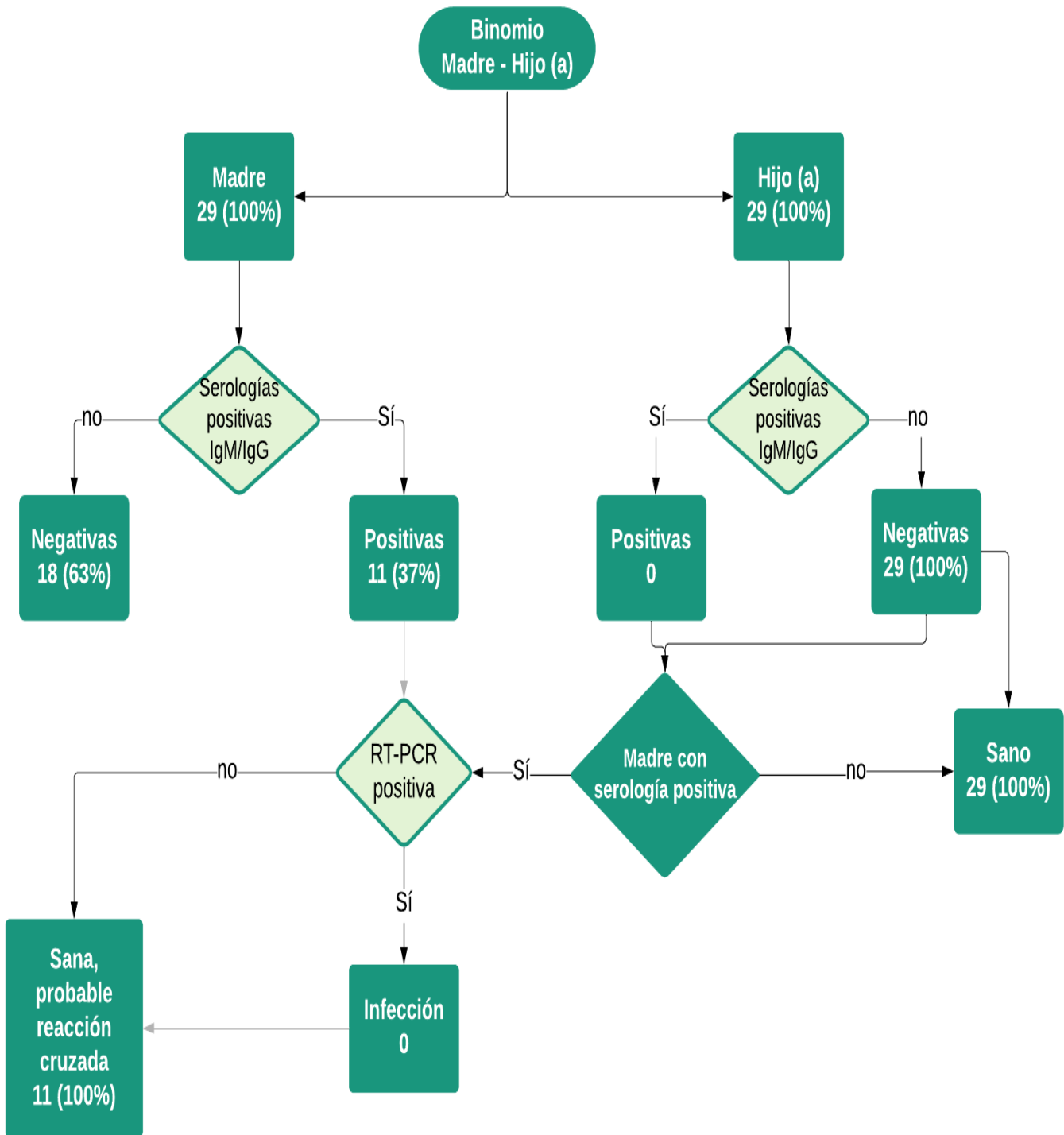
Todas las madres pertenecían a la región de la Sierra Alta de la Sierra de Guerrero, en la gráfica 6, se muestran los distritos de origen. Siendo el más frecuente, el distrito de Hueycatenango. (Gráfica 6)



Gráfica 6. Distrito de origen de las madres, n=29.

Se analizaron las muestras de sangre de 29 binomios madre – hijo (a), se realizó serología en todos los casos, se consideró positivos aquellos resultados con IgM +/ IgG +, IgM +/IgG -, a los resultados que salieron positivos se realizó prueba confirmatoria de RT – PCR, en el caso de los lactantes se realizó serología en todos los casos, y prueba confirmatoria de RT-PCR en aquellos pacientes cuya madre tuvo serología positiva. Se analizaron 29 muestras de leche materna. Para el proceso de análisis se siguió el diagrama de flujo 1.

Los resultados de serología del binomio madre – hijo (a), leche materna y RT-PCR, se muestran en la tabla 2.



*IgM - Inmunoglobulina M

*IgG- inmunoglobulina G

* RT-PCR - Reacción en cadena de la polimerasa

Diagrama de flujo 1. Análisis de serologías, en el binomio madre - hijo (a), n=29.

Tabla 2. Detección de virus Zika en el binomio madre –hijo (a) durante la etapa de lactancia, n=29.

CASO	MADRE	MADRE			PACIENTE	
	CLINICA MATERNA	SEROLOGÍA (+) *	RT - PCR **	LECHE PCR	SEROLOGÍA (+) *	RT - PCR **
1	No	+	-	-	-	-
2	No	-	No se realizó	-	-	No se realizó
3	No	+	-	-	-	-
4	No	-	No se realizó	-	-	No se realizó
5	No	+	-	-	-	-
6	No	-	No se realizó	-	-	No se realizó
7	No	-	No se realizó	-	-	No se realizó
8	No	+	-	-	-	-
9	No	-	No se realizó	-	-	No se realizó
10	No	-	No se realizó	-	-	No se realizó
11	No	-	No se realizó	-	-	No se realizó
12	No	+	-	-	-	-
13	No	-	No se realizó	-	-	No se realizó
14	No	+	-	-	-	-
15	Cefalea	-	No se realizó	-	-	No se realizó
16	No	-	No se realizó	-	-	No se realizó
17	Cefalea Diaforesis palidez	+	-	-	-	-
18	No	-	No se realizó	-	-	No se realizó
19	No	-	No se realizó	-	-	No se realizó
20	Cefalea	+	-	-	-	-
21	No	+	-	-	-	-
22	Cefalea	-	No se realizó	-	-	No se realizó
23	Cefalea	-	No se realizó	-	-	No se realizó
24	No	+	-	-	-	-
25	No	-	No se realizó	-	-	No se realizó
26	No	-	No se realizó	-	-	No se realizó
27	No	+	-	-	-	-
28	Cefalea	-	No se realizó	-	-	No se realizó
29	No	-	-	-	-	No se realizó

* SEROLOGÍA POSITIVA- IgM+/IgG+, IgM+/ IgG-

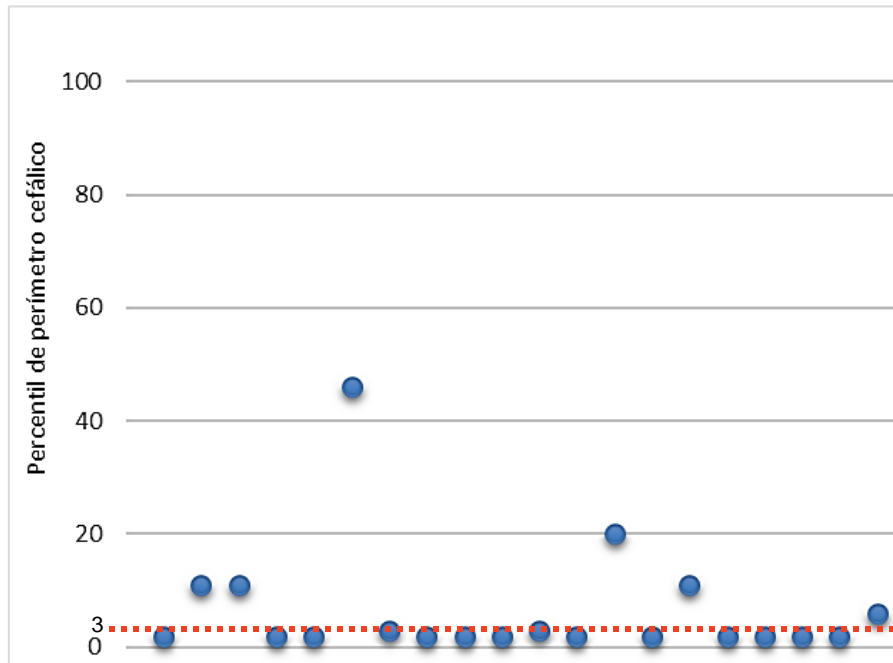
** RT - PCR- reacción en cadena de la polimerasa por transcriptasa reversa

De las 29 muestras del binomio, 11 muestras maternas resultaron con serología positiva (IgM+), por lo que se realizó RT – PCR para prueba confirmatoria, la cual resultó negativa, todas las muestras de leche materna tuvieron RT-PCR negativa, en el caso de los niños todas las serologías resultaron negativas y se realizó PCR únicamente a los pacientes cuya madre tuvo serología positiva, la cual también resultó negativa en todos los casos. Llama la atención que una de las pacientes con serología positiva tenía cefalea, diaforesis y palidez, que podría estar relacionada con algún otro tipo de infección viral.

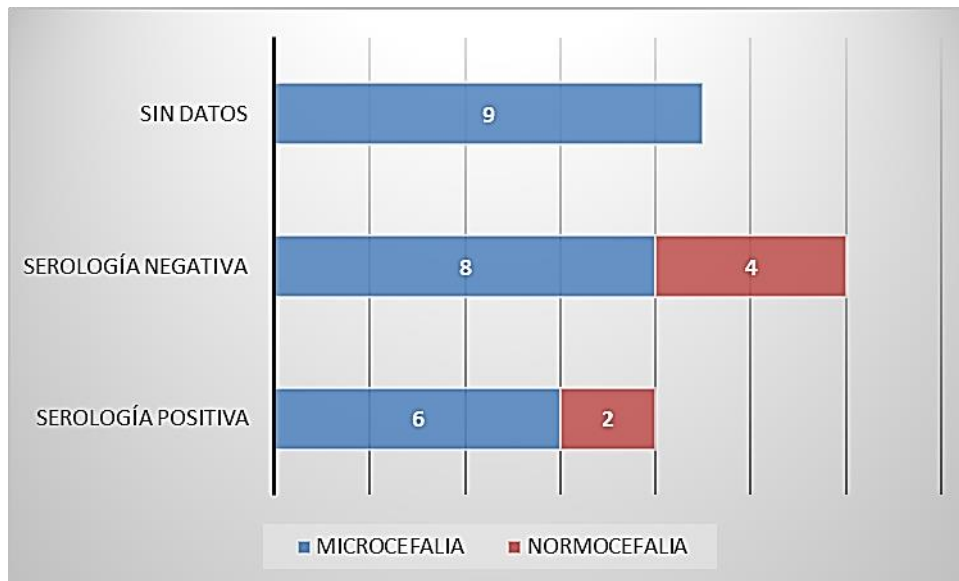
Se midió perímetro cefálico en los pacientes, se clasificaron de acuerdo a tablas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para perímetro cefálico para la edad, en niños y niñas. Se clasificó de acuerdo al percentil en microcefalia $\leq p2$, perímetro cefálico normal $p \geq 3 - 98$ y macrocefalia ≥ 98 . (Gráfica 7 y 8)

Podemos observar que la mayoría de los pacientes 12 (41%), se localizaron por debajo de la percentila 3 (Gráfica7), presentando microcefalia ($p \leq 2$), lo cual es un dato muy importante, ya que nos podría alarmar acerca de algún tipo de infección congénita, por lo que es necesario realizar TORCH como una perspectiva en el presente trabajo, sin embargo, no podemos descartar otras causas de microcefalia como el perfil nutrición Y retraso del neurodesarrollo. Se relacionó el resultado de microcefalia con el resultado de serología de las madres, encontrando que en únicamente 6 de los pacientes con microcefalia, las madres tuvieron serología positiva, sin embargo, está se consideró como reacción, ya que las PCR fueron negativas; además 8 pacientes tuvieron microcefalia con serología negativa por lo que no podemos descartar otras causas, como las ya mencionadas. (Gráfica 8)

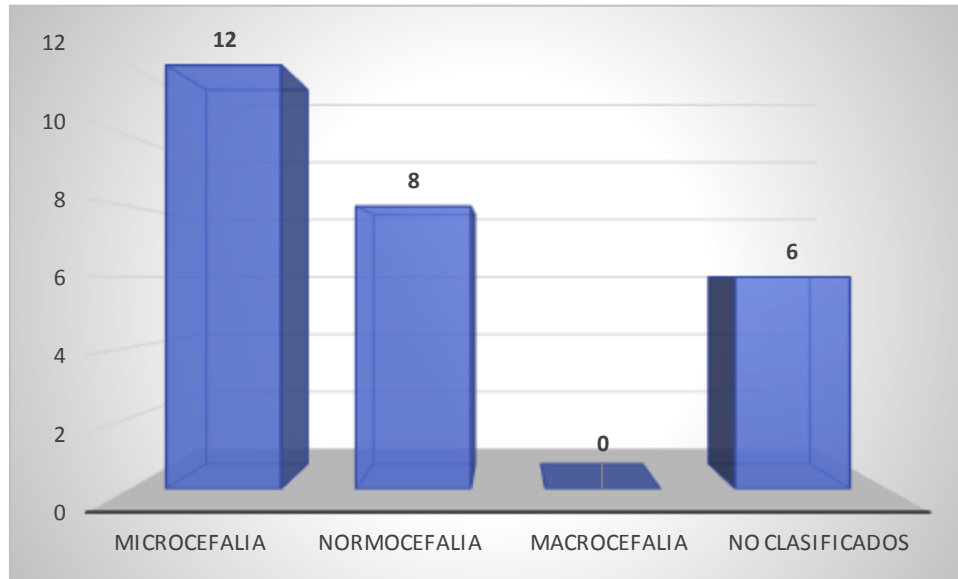
8 pacientes tuvieron perímetro cefálico normal ($p \geq 2 - 98$), ningún paciente presentó macrocefalia, y no se pudieron obtener medidas en 9 pacientes ya que las madres no permitieron continuar con la medición. (Gráfica 9)



Gráfica 7. Percentil de los pacientes con perímetro cefálico, n=20



Gráfica 8. Clasificación de perímetro cefálico de los pacientes y su relación con serología materna, n=29.



Gráfica 9. Clasificación de perímetro cefálico de los pacientes, de acuerdo a tablas de la OMS. N=29.

DISCUSIÓN

Ya que la población se encuentra ubicada a gran altitud sobre el nivel del mar, las condiciones climáticas no son favorables para la reproducción de vectores por lo que los mecanismos de transmisión de los pacientes serían la infección congénita, transmisión sexual y por leche materna. En cuanto a los resultados obtenidos existieron serologías positivas con RT-PCR negativa, por lo que no existieron casos confirmados, dichos resultados pueden ser explicarse debido a que la infección actual o pasada, o incluso la infección por otros flavivirus como el virus del Nilo occidental transmitido por otras especies como el mosquito *Culex daumastocampa* que se reproduce en zonas altas (más de 2500m sobre el nivel del mar) el cual no ha sido estudiado en esas regiones, a menudo causarían resultados de anticuerpos falsos positivos o no interpretables.^{8, 13}

La identificación del tiempo de infección y la duración de un período de incubación se complica aún más por la naturaleza asintomática de la infección aguda por virus Zika, existe evidencia (aunque limitada) que describe la transmisión de la lactancia

materna para otras infecciones por flavivirus como el virus del Nilo Occidental (WNV), el virus del dengue y el virus de la fiebre amarilla. De estas infecciones, el WNV se ha asociado con la transmisión de la lactancia materna en un pequeño número de casos. Al igual que ZIKV, la transmisión de la lactancia materna para otras infecciones por flavivirus probablemente no se reporta debido a una enfermedad asintomática y al acceso limitado al diagnóstico.

A medida que surgen nuevos datos de brotes actuales, se necesita más investigación para explorar la dinámica de transmisión a través de la lactancia. Esto incluye entender la mecánica de transmisión con respecto a tiempo de infección de la madre y el lactante, la carga viral de la leche materna y duración de la exposición. Además de determinar el riesgo de transmisión viral, la investigación también debe explorar las propiedades protectoras de la inmunoglobulina específica de virus Zika en la leche materna. En este momento, los datos no son suficientes para concluir, por lo que las recomendaciones de la OMS son apoyar la lactancia.¹⁴

En mujeres en periodo de lactancia durante la infección aguda con virus Zika, existe la presencia de ARN viral que se desprende y se replica, sin embargo, los datos indican que esto podría no ser suficiente para infectar efectivamente a los hijos amamantados. Una posibilidad es que la ausencia de infección probada en laboratorio sea resultado de niveles de carga viral insuficientes. Por lo que se deben realizar más estudios para determinar los niveles de carga viral que producirían infección en niños amamantados.¹⁵

Aunque la evidencia muestra que los flavivirus pueden estar presentes en la leche materna, existe evidencia muy limitada del riesgo de transmisión a través de la leche materna a los bebés. Específicamente para el virus Zika, la OMS recomienda que las madres con infección posible o confirmada o exposición continúen amamantando, ya que las ventajas de salud de la lactancia materna se consideran mayores que el riesgo potencial de transmisión. En cuanto a los efectos de la infección en la infancia relacionados con resultados adversos para la salud o el

desarrollo, se necesitan estudios más rigurosos para determinar el nivel de riesgo y desarrollar recomendaciones actualizadas.¹⁶

CONCLUSIÓN

La infección por virus Zika se ha asociado con múltiples alteraciones a nivel del sistema nervioso central, principalmente microcefalia, sin embargo, se requieren grandes estudios epidemiológicos que incluyan pruebas neurológicas y neurocognitivas en cohortes de humanos infectados congénitamente para evaluar el neurodesarrollo, así como los efectos de la infección congénita por virus Zika, incluido el potencial sobre el comportamiento, el aprendizaje y la memoria. Se han realizado diversos estudios, con recién nacidos, que dieron positivo para virus Zika, pero no mostraron defectos congénitos notables al nacimiento, sin embargo, posteriormente experimentaron un crecimiento lento posnatal del perímetro cefálico que llevó a microcefalia en algunos casos. Así, la ausencia de microcefalia y otras anomalías congénitas al nacer no excluye la posibilidad de que puedan surgir algunos efectos teratogénicos inducidos por virus Zika. La ausencia de virus Zika en los binomios obtenidos pone en evidencia la posible poca o nula prevalencia en la zona estudiada, sin embargo, la presencia de 11 casos de reacción cruzada hace sugerir la posible presencia de otro flavivirus que no se ha estudiado.

Debido a que las ventajas para la salud de la lactancia materna se consideran mayores que el riesgo potencial de transmisión, la OMS recomienda que las madres con una posible o confirmada infección o exposición al virus del Zika continúen amamantando. Esta revisión no identificó ningún dato que pudiera alterar esta recomendación

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Existieron varias limitaciones del estudio, la principal es la falta de rutas de acceso a la comunidad, el rechazo de las pacientes para participar en el estudio, por la toma de muestras de sangre, la autorización del máximo representante del pueblo, y el sesgo en la información, muchos datos de la historia clínica prenatal no eran recordados por las madres, ya que la mayoría de los nacimientos son atendidos por los padres, por lo que es difícil obtener información acerca del peso al nacimiento, perímetro cefálico y edad de gestación, cabe mencionar que la mayoría de los pacientes son de un nivel socioeconómico bajo, con poco grado de estudio y con dialecto Tlapaneco por lo que todos estos factores dificultan la recopilación de información.

CRONOGRAMA

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	
Recolección de muestras	jun-ago-16
Metodología experimental	Enero 2017-enero 2018
Registro de tema de tesis	31-ago-18
Revisión de la literatura	oct-18
Presentación de anteproyecto	26-nov-18
Realización de marco teórico	mar-19
Análisis de resultados	abr-may-19
Entrega de resultados	24-may-19


REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sánchez GJ, César Ramos RC, Jácome SB, García OR, Flores RJ, Santoscoy HF. Virus Zika en México. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab* 2016; 63 (1): 4-12.
2. Subissi L, Dub T, Besnard M, Mariteragi-Helle T, Nhan T, Lutringer-Magnin D et al. Zika Virus Infection during Pregnancy and Effects on Early Childhood Development, French Polynesia, 2013-2016. *Emerg Infect Dis* 2018; 24 (10): 1850-1858.
3. Igbino II, Rabe IB, Oduyebo T, Rasmussen SA. Zika Virus: Common Questions and Answers. *Am Fam Physician* 2017; 95 (8): 507-513.
4. Silva LR, Souza AM. Zika virus: what do we know about the viral structure, mechanisms of transmission, and neurological outcomes? *Rev Soc Bras Med Trop* 2016; 49 (3): 267-73.
5. Shankar A, Patil AA, Skariyachan S. Recent Perspectives on Genome, Transmission, Clinical Manifestation, Diagnosis, Therapeutic Strategies, Vaccine Developments, and Challenges of Zika Virus Research. *Front Microbiol* 2017; 8 (1761): 1-14.
6. Chang C, Ortiz K, Ansari A, Gershwin ME. The Zika outbreak of the 21st century. *J Autoimmun* 2016; 68: 1-13.
7. Platt DJ, Miner JJ. Consequences of congenital Zika virus infection. *Curr Opin Virol.* 2017; 27: 1-7.
8. Landry ML, St George K1. Laboratory Diagnosis of Zika Virus Infection. *Arch Pathol Lab Med* 2017; 141 (1): 60-67.
9. Musso D, Gubler DJ. Zika Virus. *Clin Microbiol Rev* 2016;29 (3): 487-524.
10. Tlapanecos. (Consultado el 10.05.19) Disponible en: http://www.cdi.gob.mx/pueblos_mexico/tlapaneco.
11. Control del vector *Aedes aegypti* y medidas preventivas en el contexto del Zika Nota técnica para UNICEF. (Consultado el 10.05.19) Disponible en: https://www.unicef.org/lac/sites/unicef.org.lac/files/2018-04/20161220_UNICEF_Control_Vector_Preencion_Zika_Esp_UNICEF.pdf

12. Centers for Disease Control and Prevention. Zika Virus. (Consultado el 10.05.19). Disponible en: <http://www.cdc.gov/zika>.
13. Navarro J, Del Ventura F, Zorrilla A, Liria J. Registros de mayor altitud para mosquitos (Diptera: Culicidae) en Venezuela. *Rev Biol Trop* 2008; 58 (1): 245-254.
14. Colt S, Garcia MN, Peña JP, Finkelstein JL, Rayco P, Weise ZC, et al. Transmission of Zika virus through breast milk and other breastfeeding-related bodily-fluids: A systematic review. *PLoS Neg Trop Dis* 2017; 10 (11): 4.
15. Cavalcanti MG, Cabral-Castro MJ, Gonçalves JLS, Santana LS, Pimenta ES, Peralta JM. Zika virus shedding in human milk during lactation: an unlikely source of infection? *Int J Infect Dis*. 2017; 57: 70-72.
16. Mann TZ, Haddad LB, Williams TR, Hills SL, Read JS, Dee DL et al. Breast milk transmission of flaviviruses in the context of Zika virus: A systematic review. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2018 Jul;32 (4): 358-368.

ANEXOS

1. Hoja de recolección de datos.

	HISTORIA CLÍNICA PEDIÁTRICA
<u>Ficha de identificación:</u>	
Nombre: _____ Sexo: _____ Edad: _____	
Fecha de nacimiento: _____ Lugar de nacimiento: _____	
Lugar de residencia: _____	
<u>Antecedentes familiares:</u> Padre: Vivo Si ___ No ___ Enfermedades: _____	
Madre: Viva Si ___ No ___ Edad: ___ Enfermedades: _____	
Hermanos: ¿Cuántos? ___ Vivos ___ Enfermedades: _____	
<u>Antecedentes perinatales:</u> G : ___ P: ___ C: ___ A: ___ Edad embarazo: _____	
Edad gestacional: _____ Vía del nacimiento: _____	
Sitio de atención del nacimiento: _____ Peso: ___ g Talla: ___ cm	
RPM: ___ horas ___ Complicaciones: _____ APGAR: _____	
<u>Antecedentes no patológicos:</u>	
Alimentación: Lactancia materna: _____ Duración: _____	
Inmunizaciones: _____	
<u>Antecedentes personales no patológicos:</u>	
Vivienda: Propia o rentada: _____ No de habitaciones: _____	
No de habitantes: _____ Materiales de construcción: _____	
Zoonosis: _____ Toxicomanías: _____	
<u>Desarrollo psicomotor:</u> _____	
<u>Antecedentes personales patológicos:</u>	
Quirúrgicos: _____ Alérgicos: _____ Transfusiones: _____	
Enfermedades previas: _____	
<u>Padecimiento actual:</u> _____	
Exploración física: TA: ___ FC: ___ FR: ___ Temp. °C: ___ Peso: ___ g Talla: ___ cm	
IMC: ___	
Cabeza: _____ Tórax: _____	
Abdomen: _____ Extremidades: _____	
Neurológico: _____	