



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

ESTUDIO MORFOLÓGICO Y MOLECULAR EN UN MODELO DE  
INFECCION POR ZIKA DURANTE LA NEUROGÉNESIS EMBRIONARIA

ALICIA ALEJANDRA ROSALES MUNAR

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
Facultad de Medicina, Maestría en Neurociencias  
Bogotá, Colombia  
2022

ESTUDIO MORFOLÓGICO Y MOLECULAR EN UN MODELO DE  
INFECCION POR ZIKA DURANTE LA NEUROGÉNESIS EMBRIONARIA

TRABAJO FINAL TESIS DE MAESTRIA

Presentado por:

ALICIA ALEJANDRA ROSALES MUNAR

Estudiante de Maestría en Neurociencias

Facultad de Medicina

Universidad Nacional de Colombia

Directora

AURA CATERINE RENGIFO CASTILLO, Lic. MSc en Neurociencias

Grupo de Morfología Celular

Instituto Nacional de Salud

Codirectores

ORLANDO TORRES FERNANDEZ MSc, PhD

Grupo de Morfología Celular

Instituto Nacional de Salud

ZULMA JANETH DUEÑAS GÓMEZ MSc, PhD

Departamento de Ciencias Fisiológicas

Facultad de Medicina

Universidad Nacional de Colombia

Bogotá, Colombia

2022

## **DEDICATORIA**

Esta tesis está dedicada a mi familia por darme todo su amor, apoyo y fuerza para continuar en esta nueva etapa académica.

A mis compañeros del grupo de Morfología Celular del Instituto Nacional de Salud al ser un gran equipo de trabajo que comparten cada día sus conocimientos y experiencias.

## **AGRADECIMIENTOS**

A través de este trabajo expreso mis agradecimientos a las siguientes personas y entidades:

A AURA CATERINE RENGIFO CASTILLO, investigadora científica y directora de este trabajo de grado, por el apoyo contante, grandes aportes de conocimiento y experiencia, además de grandes consejos que me impulsaron a continuar con el desarrollo de este trabajo.

Al Doctor ORLANDO TORRES FERNÁNDEZ, investigador científico, director del grupo de Morfología Celular del Instituto Nacional de Salud y codirector de este trabajo, por compartir su gran conocimiento y apoyo en la elaboración de este trabajo.

A la Doctora ZULMA DUENAS GÓMEZ, codirectora de este trabajo, investigadora científica y profesora asociada de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, por su apoyo y consejos del club de revistas.

A GERARDO SANTAMARÍA ROMERO, por su gran apoyo y experiencia en la obtención de los embriones y encéfalos de ratón cruciales para la elaboración de este trabajo.

A ALEJANDRA MUÑOZ. Investigadora científica, coordinadora del grupo Animales de Laboratorio del Instituto Nacional de Salud, por su gran apoyo y experiencia en la obtención de los embriones y encéfalos de ratón cruciales para la elaboración de este trabajo.

A JORGE ALONSO RIVERA, por su gran apoyo y enseñanza en la obtención de las imágenes implementadas en este trabajo.

A JULIAN RICARDO NAIZAQUE, por su apoyo en la interpretación de los resultados obtenidos en este trabajo.

Al Doctor EDGAR PARRA coordinador del laboratorio de patología del Instituto Nacional de Salud por la orientación en la lectura de las coloraciones de Hematoxilina & Eosina (H&E).

A SHERYLL CORCHUELO y CLAUDIA GOMEZ por su gran apoyo incondicional en el montaje de los ensayos de IHQ e ISH, además de su apoyo por continuar con el desarrollo de este proyecto.

Al INSTITUTO NACIONAL DE SALUD por toda la colaboración brindada a través de sus instalaciones para el desarrollo de este trabajo de investigación.

A la UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA por contribuir con mi formación académica y personal a través del programa de la Maestría.

A MINCIENCIAS, por la financiación del proyecto contrato 672 del 2017 210474455818.

# ESTUDIO MORFOLÓGICO Y MOLECULAR EN UN MODELO DE INFECCION POR ZIKA DURANTE LA NEUROGÉNESIS EMBRIONARIA

## RESUMEN

La enfermedad del virus Zika (ZIKV) ha generado graves problemas en la salud pública desde su aparición en los brotes de las Américas del 2015-2016. Esta enfermedad puede causar trastornos en el neurodesarrollo como microcefalia; una condición que genera, entre otras, disfunciones motoras, visuales, auditivas y cognitivas. A pesar de un gran número de publicaciones sobre la patogénesis del ZIKV aún se desconocen los mecanismos asociados a la infección de las células del sistema nervioso, por ello, el objetivo de este trabajo consistió en evaluar los cambios morfológicos y la participación de marcadores del neurodesarrollo en la infección por virus del Zika durante la neurogénesis embrionaria en un modelo murino. Para cumplir este objetivo se inocularon cinco ratones hembra BALB/c en el estadio temprano de gestación E6,5 por la vía intraperitoneal, con una dosis de interferón y al siguiente día (E7,5) con una dosis de  $9,4 \times 10^5$  PFU del ZIKV. Se llevó a cabo la eutanasia de las hembras en el estadio embrionario E14,5; momento en donde se da la convergencia para la corticogénesis y cerebelogénesis en el ratón. A continuación, se realizó la extracción de los encéfalos de los embriones para evaluar la expresión de los marcadores del neurodesarrollo (DCX, MCPH1, NES, TBR2, GFAP, CEP-152 y RELN) y para ensayos histológicos e inmunohistoquímicos únicamente en el tejido cerebral. En la evaluación de expresión de los marcadores de neurodesarrollo evaluados se encontró que la infección por ZIKV altera significativamente la expresión de DCX, CEP-152, TBR2 y RELN proteínas cruciales para el desarrollo cortical y cerebelar. Además, en los resultados obtenidos de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* observamos que las regiones con más antígeno y ARN de replicación del ZIKV fueron el mesencéfalo, rombencéfalo y médula espinal, regiones donde también encontramos un mayor número de alteraciones asociadas a procesos morfológicos relacionados a procesos de degeneración celular y marcación positiva para caspasa. Por otro lado, se realizaron ensayos de acoplamiento molecular entre las proteínas seleccionadas para el proyecto (DCX, MCPH1, CEP152, RELN, TBR2, GFAP y NES) con las proteínas de replicación NS4A y NS5 del ZIKV y se encontraron energías de interacción favorables para MCPH1, RELN, DCX y TBR2 con NS4A del ZIKV. Con este trabajo se concluye que el virus zika genera alteraciones morfológicas como la aparición de núcleos picnóticos altamente asociadas a la presencia y replicación viral del mismo. Se reporta por primera vez cambios en la expresión de marcadores del neurodesarrollo cortical y cerebelar asociados a la infección por el ZIKV como MCPH1, CEP-152, RELN, TBR2, además, este estudio es el primer reporte en donde se evidencia interacción molecular entre las proteínas del neurodesarrollo MCPH1, DCX, RELN y TBR2 con la proteína de replicación viral NS4A. Estos resultados postulan a los genes evaluados como posibles blancos de unión al ZIKV y permiten plantear futuros mecanismos de infección por el ZIKV.

Palabras clave: Virus zika, neurodesarrollo, microcefalia, docking, inmunohistoquímica.

# MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR STUDY IN A MODEL OF ZIKA INFECTION DURING EMBRYONIC NEUROGENESIS

## ABSTRACT

Zika virus disease (ZIKV) has generated serious public health problems since its appearance between 2015–2016 years of outbreaks in the Americas. This disease can cause neurodevelopmental disorders such as microcephaly; a condition that generates, among others, motor, visual, auditory and cognitive dysfunctions. Despite numerous publications on the pathogenesis of ZIKV, the mechanisms associated with the infection of nervous system cells are still unknown. Therefore, this study evaluated the morphological changes and the participation of neurodevelopmental markers in ZIKV infection during embryonic neurogenesis in a murine model. To accomplish this objective, five female BALB/c mice at early gestational stage E6.5 were inoculated intraperitoneally with a dose of interferon and the following day (E7.5) with a  $9.4 \times 10^5$  PFU dose of ZIKV. The females were euthanized at the E14.5 embryonic stage, when the convergence for corticogenesis and cerebellogenesis occurs in the mouse. Then, the embryos' brains were extracted to evaluate the expression of neurodevelopmental markers (DCX, MCPH1, NES, TBR2, GFAP, CEP-152 and RELN) and for histological and immunohistochemical assays only in brain tissue. In the evaluation of expression of the neurodevelopmental markers evaluated, it was found that ZIKV infection significantly alters the expression of DCX, CEP-152, TBR2 and RELN proteins crucial for cortical and cerebellar development. Additionally, in the results obtained from immunohistochemistry and in situ hybridization, we observed that the regions with more antigen and replication RNA of ZIKV were the midbrain, hindbrain and spinal cord, regions where we also found a greater number of alterations associated with morphological processes related to processes of cell degeneration and positive labeling for caspase. By the other hand, molecular docking assays were performed between the proteins selected for the project (DCX, MCPH1, CEP152, RELN, TBR2, GFAP and NES) with the replication proteins NS4A and NS5 of ZIKV and favorable interaction energies were found for MCPH1, RELN, DCX, and TBR2 with NS4A of ZIKV. This work concludes that the Zika virus generates morphological alterations such as the appearance of pyknotic nuclei, highly associated with the presence and viral replication of the virus. We report for the first time changes in the expression of cortical and cerebellar neurodevelopmental markers associated with ZIKV infection such as MCPH1, CEP-152, RELN, TBR2, in addition, this study is the first report where the molecular interaction between the neurodevelopmental proteins MCPH1, DCX, RELN, and TBR2 with the viral replication protein NS4A is evidenced. These results postulate the genes evaluated as possible binding targets for ZIKV and allow us to consider future mechanisms of ZIKV infection.

Keywords: Zika virus, neurodevelopment, microcephaly, docking, immunohistochemistry.

## CONTENIDO

	Pág.	
1	Introducción	9
2	Marco teórico y estado del arte	11
2.1	Epidemiología de la infección por virus Zika	11
2.2	Biología del virus del Zika	12
2.3	Microcefalia y Zika	13
2.4	Neurogénesis	14
2.5	Desarrollo de la corteza cerebral	15
2.6	Desarrollo del cerebelo	17
3	Estado del arte	18
3.1	Alteraciones neurológicas asociadas a la infección con ZIKV	18
3.2	Modelos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	20
4	Objetivos	24
4.1	Objetivo General	24
4.2	Objetivos específicos	24
5	Materiales y métodos	25
5.1	Consideraciones éticas para el uso de animales de laboratorio	25
5.2	Establecimiento del modelo de infección prenatal	25
5.3	Eutanasia y manejo de muestras	26
5.4	Metodología por objetivo	26
5.4.1.	Coloraciones de Hematoxilina-Eosina (H&E) (Objetivo 1)	26
5.4.2.	Ensayos de relación entre porcentaje de células infectadas y alteraciones morfológicas	26
5.4.3.	Ensayos histológicos e inmunohistoquímicos (IHQ) (Objetivo 1)	27
5.4.4.	Ensayos de hibridación <i>in situ</i> (ISH) (Objetivo 1)	27
5.5	Evaluación de la expresión diferencial de marcadores de neurodesarrollo (Objetivo 2)	28
5.5.1.1	Extracción de ARN viral total a partir de lisados de tejidos animales	28
5.5.1.2	Diseño de primers para la evaluación de la expresión diferencial de marcadores	28
5.5.1.3	RT-qPCR en tiempo real para la cuantificación de marcadores de neurodesarrollo	28
5.6.1.	Estudio de interacción proteína – proteína (Acoplamiento molecular). (Objetivo 3)	29

5.6.1.1	Preparación de moléculas para el estudio de interacción proteína-proteína	29
5.6.1.2	Análisis con el servidor Protein Interaction Calculator (PIC)	30
5.6.1.3	Relación entre acoplamiento molecular y grado de expresión de marcadores de neurodesarrollo (objetivo 3)	30
6	Resultados y discusión por objetivo	30
6.1	Hallazgos morfológicos encontrados y localización del virus en un modelo de infección por ZIKV durante la neurogénesis embrionaria (Objetivo 1).	30
6.2	Expresión diferencial de genes implicados en la formación de la corteza cerebral y el cerebelo en un modelo de infección por ZIKV (objetivo 2)	42
6.3	Interacción de proteínas virales y marcadores de neurodesarrollo (objetivo 3)	49
7	Conclusiones	56
8	Perspectivas futuras	57
9	Referencias	58

# 1 Introducción

Las infecciones por virus neurotrópicos son un problema de salud pública a causa de la morbilidad y mortalidad que se presenta en todo el mundo (1). Estas infecciones generan una importante variedad de afecciones y malformaciones morfológicas en el sistema nervioso central (SNC) debido a su organización compleja y capacidad de regeneración reducida (2, 3). Algunos virus y la respuesta inmune pueden modificar de manera directa o indirecta las células neuronales inmaduras que no están diferenciadas y como consecuencia pueden alterar etapas cruciales para el neurodesarrollo, tales como la neurogénesis, corticogénesis y la migración neuronal (4, 5).

La organización mundial de la salud (OMS) en el 2016 declaró que las infecciones por el virus del Zika (ZIKV) son un problema de salud pública de interés internacional por el gran aumento de reportes de casos de microcefalia junto con otras afecciones neurológicas tales como el síndrome autoinmune de Guillain-Barré en adultos; signos reportados inicialmente durante el brote de ZIKV en la Polinesia francesa y Brasil (6).

Actualmente se ha demostrado que las infecciones por ZIKV están asociadas con microcefalia en recién nacidos de madres infectadas durante el embarazo (7). El ZIKV se ha detectado en el líquido amniótico y la placenta de mujeres infectadas durante la gestación (8), al igual que en la sangre y encéfalos de fetos infectados congénitamente (9, 10). Por otro lado, se ha evidenciado que el ZIKV infecta preferencialmente a las células progenitoras neurales e inhibe el crecimiento, proliferación y migración de las mismas afectando las etapas del neurodesarrollo que son cruciales para la correcta formación de la corteza cerebral y el cerebelo (11). Durante la infección por ZIKV frecuentemente se han reportado alteraciones a nivel morfológico de la corteza cerebral y el cerebelo, entre ellos disminución en el grosor de las capas corticales e hipoplasia cerebelar. Además, mediante observación macroscópica, histoquímica y ultraestructural se han evidenciado calcificaciones y algunos resultados indican muerte celular por apoptosis y depósitos de partículas infecciosas en el retículo endoplasmático (12-14). Por otro lado, distintos reportes indican que el ZIKV puede infectar embriones murinos presentando alteraciones morfológicas similares a las que se observan en el ser humano (15).

A nivel molecular los estudios indican que el genoma viral de las regiones codificantes y no codificantes del ZIKV podrían interactuar con algunos genes y proteínas involucrados en el neurodesarrollo al ser posibles blancos de entrada del virus (16). Complementario a esto, otros investigadores han demostrado que la transducción con lentivirus en células progenitoras neurales con las proteínas involucradas en la replicación viral como NS4 y NS5 subregulan la expresión del gen doblecortina (DCX) involucrado en el neurodesarrollo (17, 18), lo que podría ser una evidencia de la interacción entre proteínas virales y este tipo de marcadores neuronales. Es posible que dicha interacción promueva la subregulación o la sobreexpresión de genes como mecanismo de replicación viral (19).

Desde el aislamiento del ZIKV se estableció que el virus posee un alto tropismo por el encéfalo del ratón, es por esto, que dichos modelos permiten simular el espectro de signos que se presentan durante la infección. Además, diferentes estudios del neurodesarrollo de la corteza cerebral y el cerebelo se han realizado en modelos murinos debido al alto grado de similitud en los procesos de migración y diferenciación neuronal entre el humano, rata y ratón y a la organización de las capas corticales y cerebelares (20-23), situación que ha permitido establecer tiempos de equivalencias del neurodesarrollo entre estas especies.

Estudios de neurodesarrollo entre el humano y el ratón han reportado genes comunes en las dos especies, implicados en los procesos de migración de la corteza cerebral y cerebelar. En el ratón los procesos de migración neuronal de estas dos estructuras convergen en eventos importantes hacia el día 14,5. En este punto baja notablemente la neurogénesis para dar origen a la astrogénesis y en este tiempo también se forman la gran mayoría de las capas corticales y folias cerebelares (24). En el humano este proceso inicia en la semana 8 y finaliza hacia las semanas 15 y 16 del embarazo para la corteza cerebral (22) y semanas 5 y 6 para el cerebelo embrionario (20, 21), excepto la capa granular externa del cerebelo que migra hasta los 20 meses postnatales en el humano y 20 días postnatales en el ratón (25, 26).

Debido a la convergencia en la corticogénesis y cerebelogénesis, el estadio 14,5 del ratón resulta ser una fase de interés para el estudio del neurodesarrollo en modelos de microcefalia y modelos de malformaciones asociadas a la infección por ZIKV (5, 27-31). En escasos estudios se ha evaluado la expresión diferencial de marcadores de neurodesarrollo en modelos infectados con ZIKV como es el caso de los marcadores doblecortina (DCX) y nestina (NES) (19), en este trabajo se evaluaron estos y otros marcadores que juegan un papel importante en el desarrollo cortical y cerebelar dado que la mutación o el cambio de expresión en sus genes o la interacción con proteínas virales puede desencadenar las malformaciones observadas en modelos animales o humanos infectados con ZIKV. Además, se realizó el estudio neurohistológico en los tejidos analizados para evaluar si el modelo de infección por ZIKV obtenido durante este trabajo presenta el fenotipo asociado a las malformaciones en modelos de infección prenatal previamente reportados y si los mismos están asociados a la presencia viral. Esto era necesario debido a que en algunos estudios con ZIKV se han evidenciado cambios morfológicos o moleculares en tejidos cerebrales embrionarios que no presentan algún tipo de infección viral (5). El desarrollo de esta propuesta y de los ensayos mencionados se enfocó en resolver las siguientes preguntas de investigación:

¿Puede el ZIKV afectar la expresión de genes involucrados en el desarrollo de la corteza cerebral y cerebelar en modelos de rata o ratón infectados durante la etapa prenatal?

¿Las proteínas codificadas por los genes evaluados podrían tener algún tipo de interacción con proteínas asociadas a la replicación viral y dicha interacción podría influir en el patrón de expresión de estos genes?

¿Las alteraciones morfológicas observadas en un modelo de infección por Zika se encuentran asociadas a la cantidad de antígeno o RNA viral o son el resultado de un efecto indirecto del virus sobre el encéfalo de los embriones infectados?

El resolver estas preguntas de investigación permitirá entre otros ampliar la comprensión de los mecanismos neuropatogénicos del ZIKV e identificar parte del papel de los marcadores del neurodesarrollo cortical y cerebelar durante la neuroinfección.

## 2 Marco teórico y estado del arte

### 2.1 Epidemiología de la infección por virus Zika

Existen un gran número de virus transmitidos por artrópodos (arbovirus) que presentan ciclos enzoóticos entre insectos o garrapatas vectores y sus hospedadores. Algunos de ellos causan infecciones al sistema nervioso por células específicas o regiones en general del cerebro y el cerebelo generando como consecuencia diversos trastornos neurológicos. Uno de los más importantes es el virus de la encefalitis japonesa cuya infección sintomática puede causar gran variedad de manifestaciones clínicas desde la enfermedad febril indiferenciada y meningitis aséptica hasta encefalitis aguda, afectando tanto a niños como a adultos (32).

Otros virus que no pertenecen a la familia de los Flavivirus también pueden alterar el SNC en etapas muy tempranas del desarrollo, como es el caso del citomegalovirus (CMV) humano considerado una de las causas principales de defectos en neonatos. La infección por este virus da origen a una enfermedad neurológica grave que ocasiona retraso mental, parálisis cerebral y pérdida auditiva neurosensorial, además se ha demostrado que las células progenitoras neurales (NPC) del cerebro fetal son totalmente permisivas a la infección (1, 33). También se ha comprobado que el CMV disminuye la expresión de proteínas esenciales para procesos como la migración, diferenciación y mantenimiento de las NPC. Entre las proteínas más afectadas se encuentran la doblecortina (DCX), nestina (NES), homeobox determinante del sexo 2 (SOX2) y la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP), comprometiendo y limitando la capacidad multipotencial y de diferenciación de las NPC (33).

A principios del 2016 la OMS declaró que el Zika era una emergencia en salud pública de interés internacional (PHEIC) por la posible asociación con microcefalia y el síndrome de Guillain-Barre en adultos (6). El ZIKV fue descubierto en el bosque Zika en Uganda y se aisló por primera vez en un mono *Reshus* (en 1947) y en el mosquito *Aedes africanus* en 1948 (34). Los primeros brotes significativos de infección por ZIKV en el que se involucraron unas pocas personas fueron en las islas Micronesias de Yap, Libreville, Gabón y otras ciudades al norte en el 2007 (35, 36). En el 2013 el ZIKV causó una gran epidemia en la Polinesia Francesa con más de 32.000 pacientes evaluados por sospecha de infección y los primeros casos en Nueva Caledonia se reportaron en el 2014. Hasta este punto se creía que el virus del Zika causaba solo una enfermedad febril leve y autolimitada, sin embargo, la transmisión del ZIKV en la Polinesia

francesa se asoció con el desarrollo de la enfermedad neurológica autoinmune conocida como síndrome de Guillain-Barré (37).

En el transcurso del periodo 2014-2015 en el noreste de Brasil se detectaron los primeros casos de ZIKV; se estima que a finales del 2015, entre 440,000 y 1.3 millones de personas se habían infectado en Brasil (38). Durante este brote se observó el aumento de casos de microcefalia, así como de otras malformaciones en el cerebro y muerte fetal, dando a entender que existía una relación entre la microcefalia y otros trastornos neurológicos así como con el síndrome de Guillain-Barre en adultos y la infección por el ZIKV, (8). En Colombia en el año 2016 se reportaron 106.559 casos de Zika a partir de diagnósticos clínicos, siendo las personas entre 25 a 44 años la población más afectada (39), además, se reportaron 258 casos de Síndrome de Guillain Barré asociados a la infección por el ZIKV, 432 bebés nacidos con microcefalia y 44 fetos con microcefalia que no sobrevivieron a la gestación. El aumento de la información de estudios epidemiológicos, patológicos, medicina clínica y estudios experimentales, han aportado evidencias que apoyan la asociación de la infección por ZIKV con microcefalia congénita y daño del tejido cerebral fetal (40).

## 2.2 Biología del virus del Zika

El ZIKV es un flavivirus al igual que el virus del dengue, el virus del Nilo Occidental y el virus de la encefalitis japonesa. Este virus tiene un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo de aproximadamente 11Kb (41, 42), el cual codifica para tres proteínas estructurales, cápside (C), premembrana/membrana (prM) y envoltura (E) y siete proteínas no estructurales (NSI, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, Y NS5). Este virus es transmitido principalmente por mosquitos hembra pertenecientes al género *Aedes* ahora distribuidos en África, Asia, Oceanía y las Américas (36, 43, 44). La transmisión del ZIKV a través de mosquitos aumenta la posibilidad que este pueda dispersarse a otras regiones donde estén presentes los vectores. Originalmente se conocían dos linajes principales del ZIKV que eran el africano y el asiático. La secuenciación de los genomas completos de las cepas pertenecientes al linaje africano se obtuvo a partir de vectores enzoóticos, mientras que las cepas pertenecientes al linaje asiático se obtuvieron a partir de epidemias humanas y por ende estas cepas se han asociado más con las principales epidemias (34). Actualmente se conocen nuevas cepas que se han aislado en América central y América del sur. En estas cepas se ha demostrado una divergencia genética más amplia lo cual se atribuye a su introducción en una población inmunológicamente susceptible (34).

La transmisión del ZIKV ocurre principalmente mediante la picadura de un mosquito infectado, pero se ha evidenciado que el virus puede pasar de la madre al feto (transmisión vertical) a través de la placenta en el periodo perinatal (45), transmitirse por actividades sexuales (46) o adquirirse mediante transfusiones de sangre (47). El virus también se ha detectado en la saliva, leche materna, semen y orina (48-50). La transmisión vertical puede ocurrir de múltiples formas, entre ellas mediante difusión hematogena por la entrada directa al saco gestacional, vía por la

pared trofoblástica, mediante el transporte de células inmunitarias por efecto caballo de troya, colonización uterina previa al embarazo e introducción durante procedimientos invasivos (51). En cuanto a la transmisión sexual se ha encontrado que el ZIKV persiste en el semen hasta 6 meses después del inicio de signos de la enfermedad, en fluido vaginal hasta tres días post-infección y en el cuello uterino hasta 11 días post-infección (52, 53). Los síntomas de la infección por ZIKV son variables, aunque algunos de ellos son notorios como, por ejemplo, la fiebre, dolor articular, erupciones, conjuntivitis, mialgia y dolor de cabeza, pero aproximadamente el 80% de los casos son asintomáticos (38, 54). Una de las complicaciones más graves es la asociación con la microcefalia y otras complicaciones neurológicas en el feto, al igual que otros trastornos neurológicos y malformaciones neonatales (9, 41).

### 2.3 Microcefalia y Zika

La microcefalia es una malformación cerebral caracterizada por la disminución de la circunferencia de la cabeza. Los pacientes presentan una variedad de trastornos neurológicos comprometiendo las funciones motoras, visuales, auditivas y cognitivas (55). La mayoría de las causas genéticas de microcefalia están relacionadas con anomalías centrosómicas. Las proteínas centrosómicas entre muchas funciones, están encargadas de controlar el huso mitótico, el cual es esencial para la proliferación celular durante la mitosis; por otro lado, el desarrollo del cerebro puede ser afectado cuando los genes que están asociados con la microcefalia mutan lo que implicaría funciones en el centrosoma que son esenciales en la producción neuronal (55). Se han postulado principalmente siete loci genéticos relacionados con la microcefalia de los cuales todos se han conectado a genes únicos: ASPM, MCPCH-1, CEP152, CDK5RAP2, CENPJ, STIL y WDR62 (56-60). Se debe resaltar que todos estos genes codifican proteínas asociadas al centrosoma o actividades relacionadas con el centrosoma. Ahora se han incluido algunos loci como el CEP63 que también tiene funciones en el centrosoma (61).

Las malformaciones fetales también se han descrito en otras infecciones virales tales como la varicela, rubéola, el virus del herpes simple genital (VHS), CMV y recientemente el ZIKV. Se ha demostrado que existen virus que no atraviesan la membrana placentaria y por tanto no llegan a producir daño al embrión o al feto (62); aunque la placenta pueda infectarse tiene la capacidad de prevenir la expansión del virus y la transmisión al feto (63, 64). Durante años el embarazo se ha percibido como una condición de inmunosupresión parcial, en la cual la disminución de la respuesta inmunitaria sería un requisito para el éxito de dicho evento. Aquí, es importante resaltar que las mujeres embarazadas representan una población inmunológicamente única porque todo su sistema inmunológico está influenciado por señales que se originan en la placenta (65).

El sistema inmunitario materno tiene la capacidad para controlar las infecciones virales y garantizar la supervivencia del feto, aunque la respuesta inmune materna activada ya sea por infecciones virales, factores tóxicos o ambientales, pueden llegar a afectar la gestación y en algunos casos aumentar el riesgo de desarrollar problemas fetales (62).

El ZIKV brasileño se ha detectado en la placenta y el líquido amniótico de mujeres con fetos microcefálicos (8, 66) y en la sangre de recién nacidos con microcefalia (9, 13). Esto sugiere que el virus puede atravesar la membrana placentaria. Los casos más graves de microcefalia asociada al ZIKV se correlacionan con la infección materna durante el primer trimestre de la gestación (67-69). En esta etapa las células del trofoblasto son más vulnerables a las infecciones virales o bacterianas posiblemente por la respuesta variable del interferón durante este período (51, 70).

## 2.4 Neurogénesis

La neurogénesis es el proceso clave en el cual las neuronas se diferencian a partir de las células madre neuronales (NSC) por sus siglas en inglés *Neural Stem Cell* o las células progenitoras neurales por sus siglas en inglés *Neural Progenitor Cell* (NPC). Este proceso es más activo durante el desarrollo prenatal y es responsable de aumentar el número de neuronas en el cerebro en crecimiento (71). En rata y ratón la ventana de tiempo de la neurogénesis en la corteza cerebral en desarrollo ocurre desde E10,5 a E18,5 y precede al período de gliogénesis terminando después del nacimiento (24). La neurogénesis se reduce notablemente en el estadio E14,5 para dar origen a la astrogénesis gracias al bloqueo inducido por las proteínas BMP por sus siglas del inglés *bone morphogenetic protein* (24, 72). Los defectos genéticos asociados con la neurogénesis y la migración a menudo resultan en trastornos neurológicos del desarrollo humano, incluida la microcefalia (73). La vía de señalización Akt-mTOR (Proteína quinasa B-PKB - mammalian Target of Rapamycin) no solo es crucial para controlar la autofagia, sino también cumple un papel importante para el desarrollo cortical. Las mutaciones en esta vía que causen una activación consecutiva de Akt conducen a trastornos como la megalencefalia, mientras que mutaciones en esta vía que inactiven la vía Akt conllevan a la microcefalia (74).

Una de las vías clave para la señalización celular es la PI3K-Akt-mTOR; esta vía es crucial tanto para la neurogénesis de las NSC, así como para la posterior migración y maduración (75). Estudios han demostrado que las mutaciones en proteínas activadoras en la vía PI3K-Akt-mTOR pueden provocar síndromes de sobredesarrollo cerebral (74). Por ejemplo, mTOR es importante en la regulación del crecimiento celular y al ser inhibida en el cerebro en desarrollo causa microcefalia (76). Por otra parte, Akt es la molécula de señalización central en la vía PI3K y desempeña papeles críticos en el desarrollo del cerebro y la plasticidad sináptica (77).

Se ha demostrado que los flavivirus, como el virus del dengue (DENV), el virus de la hepatitis C (VHC) y el ZIKV, modulan la autofagia celular para beneficiar su replicación en las células huésped (78-80). La autofagia es un proceso que implica la formación de vesículas de doble membrana, llamadas autofagosomas, que secuestran orgánulos citoplasmáticos dañados, agregados de proteínas o patógenos intracelulares invasores para la degradación (81). La vía de señalización mTOR quinasa sirve como control de la inducción de autofagia: la activación de mTOR a través de la señalización de Akt y MAPK suprime la autofagia, por otro lado, la inactivación de mTOR por la señalización de AMPK y p53 promueve la autofagia (82). La autofagia también es un mecanismo activo de protección celular contra la infección viral. Por lo tanto, los virus intentan modular la autofagia para beneficiar sus ciclos de vida. Se ha demostrado que flavivirus como ZIKV y DENV secuestran la vía de autofagia para apoyar de manera similar la replicación viral (78, 79). La infección por ZIKV induce autofagia a través

de un mecanismo similar al DENV mediante las proteínas de replicación viral NS4A y NS5. Estas proteínas pueden inhibir la función de mTOR y la expresión de proteínas como DCX y NES, que resultan importantes durante el neurodesarrollo afectando con ello la biomasa celular (82).

## 2.5 Desarrollo de la corteza cerebral

Las seis capas corticales se generan en los estadios embrionarios del ratón E10-E15,5 o E17 aproximadamente pero se ha indicado que la corteza cerebral alcanza su grado de maduración al día embrionario postnatal 8 (p8) (83, 84). Las capas infragranulares se forman en los estadios E11-E14,5 y las supragranulares desde E13,5- hasta E 16,5 con excepción de la capa 1 la cual se da al inicio de la formación cortical(24, 55, 85)

La corteza cerebral es una estructura que recubre los hemisferios cerebrales y está formada por células neuronales, células gliales (astrocitos, oligodendrocitos y microglía), epéndima y vasos sanguíneos (86). La región más grande de la corteza es el neocórtex, el cual está formado por seis capas corticales (I, II, III, IV, V y VI) y cada capa tiene conexiones distintas y estructuras subcorticales con funciones determinadas. Las neuronas piramidales en cada capa cortical presentan diferencias en la morfología dendrítica, la longitud del axón y sus conexiones, así como en sus funciones moleculares. La expresión de los factores de transcripción *Fezf2/Zfp312* en la capa V regula la formación de las dendritas (87). Por otro lado, en las capas corticales II y III las neuronas desarrollan uniones dendríticas y espinas dendríticas abundantes, que permiten integrar a las neuronas de diferentes capas corticales.

Las capas corticales superiores en el ratón son identificadas mediante los factores de transcripción Cux1 y Cux2, siendo estos los homólogos vertebrados del factor de transcripción de *Drosophila* (*homeobox cut*) encargado de controlar la morfología dendrítica de las poblaciones posmitóticas del sistema nervioso periférico (88). Se ha demostrado que Cux2 participa en la proliferación de precursores neuronales en la zona subventricular y tanto Cux1 como Cux2 están involucrados en la regulación de la diferenciación tardía, la formación de la columna vertebral y la función sináptica en las capas II y III de la corteza (89, 90).

El desarrollo de la corteza comienza con una capa plexiforme fundamental en el telencéfalo y da origen a la formación de la capa I y la subplaca de la placa cortical, siendo ésta la organización cortical primitiva que es compartida con anfibios y reptiles. Por otro lado, la capa plexiforme es de gran importancia para la formación de la placa cortical y las demás capas corticales (II, III, IV, V y VI); esta organización se observa únicamente en los mamíferos (22). En el transcurso del desarrollo de la placa cortical es necesaria la formación de un citoesqueleto que ayude a las neuronas a mantener su forma y organización. La progresiva acumulación de neuronas migratorias dentro de la capa plexiforme primordial separa progresivamente la capa I de la subplaca. Mientras que la capa I retiene su estructura plexiforme y sus células de Cajal-Retzius, la subplaca sufre transformaciones estructurales

durante la maduración de la placa cortical, y sus neuronas se transforman en las células intersticiales profundas. En el ratón la formación de la capa I ocurre durante los días embrionarios E10 y E11,5 (91).

Existen proteínas que juegan un papel importante en la formación o estabilización de estos componentes del citoesqueleto, entre ellos se encuentran las proteínas GFAP, internexina y periferina involucradas en la formación de los neurofilamentos (92). Por otro lado, varias proteínas estabilizadoras de microtúbulos se expresan en neuronas en desarrollo, como es el caso de las proteínas asociadas a microtúbulos MAP, encargadas en regular la polimerización y estabilización de los mismos. Estas proteínas sirven como apoyo para las modificaciones morfológicas, transporte de orgánulos y participan directamente en los cambios morfológicos durante la diferenciación neuronal (93). Las MAP se dividen en tres familias Map1, Map2 y Tau, las cuales se expresan, subdividen y cumplen funciones específicas durante etapas tempranas del desarrollo e incluso en el adulto (93, 94). Para Map2 se ha demostrado que la proteína puede estar relacionada con diferentes alteraciones morfológicas cerebrales (95).

La formación de las capas corticales comienza con la migración de las células progenitoras neurales usando como apoyo las células de la glía radial. El cierre del tubo neural, la formación de la cresta neural y el desarrollo de la placa cortical son claves para dar inicio a la migración, maduración neuronal y funcional (22, 94). La migración neuronal es el proceso en el que las capas de la neocorteza se ubican de adentro hacia afuera, es decir que la capa III se comienza a situar antes que la capa II. Las células NPC migran hasta su destino ya sea el sistema nervioso central o el sistema nervioso periférico. Este proceso es de gran importancia para la formación, diferenciación y función óptima de las neuronas de la corteza, además, se debe resaltar que una migración anormal conlleva a un mal posicionamiento de las neuronas, afectando eventualmente la formación de las capas corticales y generando como consecuencia déficit cognitivo y retraso mental (96).

La migración neuronal se puede dar de dos formas, la radial y la tangencial que se diferencian entre sí por la dirección a la que migran las neuronas. La migración radial comienza desde la zona ventricular hasta la zona marginal, las primeras NPC en migrar lo hacen de manera radial usando como soporte las células gliales radiales que se forman durante la neurogénesis. La migración radial es crucial para la formación de la corteza cerebral, médula espinal, el cuerpo estriado y el tálamo entre otras estructuras cerebrales (97). En la migración tangencial las neuronas migran en paralelo a la zona ventricular y se han encontrado dos rutas principales: a partir de la eminencia ganglionar medial hasta la neocorteza y el hipocampo y de la eminencia ganglionar lateral hasta el bulbo olfatorio (98). En el feto humano este proceso se lleva a cabo en su mayoría entre las semanas gestacionales 7 hasta la 16, aunque se ha evidenciado la presencia de las células de glía radial después de las 16 semanas, demostrando que la migración puede continuar y no es un proceso que se detiene abruptamente (99).

Durante la migración neuronal ocurre también la proliferación neuronal. Las NPC se dividen inicialmente de manera simétrica y dan lugar a dos células hijas iguales al progenitor. Posteriormente presentan una división asimétrica, en la que en cada división se genera una célula glial y otra célula se transformará en neurona y continua de esta manera hasta que la división vuelve a ser simétrica pero esta vez las dos células hijas se diferencian en neuronas y de esta manera llega el final de las células progenitoras neurales (97, 98). Este proceso de proliferación neuronal está involucrado en la generación de nuevas neuronas. En el humano, ocurre durante los días 37 y 40 del periodo de gestación y las semanas 15 y 16 del periodo postnatal (22, 72, 100). En el adulto es posible encontrar células progenitoras neurales en el hipocampo y la zona subventricular; estas divisiones ocurren también en la zona ventricular para formar la primera capa cortical (101).

La migración neuronal es un proceso complejo que está mediado por un gran número de proteínas que se expresan en diferentes tiempos del desarrollo y cada una de ellas juega un papel importante en la formación y en la regulación de la formación de las capas corticales. La nestina (NES) es una proteína de filamento intermedio (IF) identificada por primera vez en las células madre neuroepiteliales del tubo neural embrionario de rata. El descubrimiento de esta proteína permitió identificar el papel crucial que juegan los filamentos intermedios en la diferenciación neuronal. Esta proteína se expresa desde el cierre temprano del tubo neural hasta el desarrollo posnatal del cerebelo (102, 103), por ende, se ha utilizado como marcador para células neuroepiteliales y progenitoras en proliferación (104). La nestina también juega un papel importante en la distribución de factores celulares durante la división de las células progenitoras y la distribución de la proteína vimentina, la cual es esencial para mantener la integridad física de las células en especial células embrionarias.

Existen proteínas que regulan directamente la migración neuronal como es el caso de la proteína reelina (Reelin) (91). Se ha demostrado que esta proteína se encarga de controlar la migración neuronal, la formación de las capas en el cerebro de los mamíferos en desarrollo, al igual que el crecimiento, maduración y actividad sináptica en el cerebro adulto (105).

## 2.6 Desarrollo del cerebelo

La proliferación de células en el cerebelo del ratón se inicia entre los días embrionarios E10 y E14 (91). Las células desde la zona ventricular, específicamente las del cuarto ventrículo, alcanzan los núcleos profundos y la capa de células de Purkinje (25). Otra población celular migra desde el labio rómbico para formar la capa granular externa (EGL) del inglés *external granule layer*; una capa temporal que permanece mientras migra la totalidad de las neuronas de Purkinje hasta alcanzar su destino final (91). En el labio rómbico se expresa el marcador Math1, un factor de transcripción necesario para la generación de los núcleos del rombencéfalo antes del día E12 en el ratón e importante para la formación de las células granulares entre los días E12 y E17 (25).

La EGL migra a través de las células de Purkinje para formar la capa granular interna. Esta capa permanece en el humano durante 20 meses después del nacimiento (106) y en el ratón hasta los 20 días (25, 107). La EGL es un sitio de proliferación celular en el cerebelo de distintos animales. Después del nacimiento las interneuronas tales como las células en cesta, células estrelladas y las células granulo toman su lugar en esta capa. Esta capa es sensible a la radiación con rayos X y a las infecciones virales. Las afecciones en esta capa producen distribución heterotípica de células granulo en la capa molecular, desarreglo de las células de Purkinje y escasez celular en la capa granular interna (25). Las células de la EGL expresan marcadores de las células astrocíticas y de células madre tales como GFAP, nestina, Blbp, Sox2 y Musashi1(25). Estas propiedades neurogénicas también se observan en el giro dentado y en la zona subventricular durante toda la vida, pero en la EGL solo permanecen hasta las dos semanas postnatales en el ratón y probablemente hasta los 20 meses postnacimiento del humano; periodo en el que está presente la capa granular externa.

Otras proteínas pueden jugar un rol importante en la morfogénesis del cerebelo, tal es el caso de la proteína Reelin, anteriormente mencionada por su importancia durante el desarrollo del neocortex (108). Las mutaciones autosómicas recesivas para la proteína producen en ratones disminución del tamaño cerebelar y pérdida de foliaciones. Los análisis histológicos en el día E14 de los ratones afectados para la mutación indicaron disminución de las células de la capa granular externa, ausencia de las células de Purkinje y reducción en el número de células granulo internas (91).

### 3 Estado del arte

#### 3.1 Alteraciones neurológicas asociadas a la infección con ZIKV

Aunque el Zika se identificó como enfermedad infecciosa desde la década de los años 50, solo fue hasta el brote en el 2015 en Brasil donde se descubrió su capacidad para causar infecciones congénitas y malformaciones fetales (109). Se cree que la evolución genética o la aparición de una mutación en el genoma del ZIKV pueden haber contribuido a las manifestaciones clínicas obtenidas en los brotes recientes (110, 111). Por otro lado, se ha encontrado que la infección con el ZIKV altera los niveles de proliferación, diferenciación y migración de las células progenitoras neurales afectando la expresión de un gran número de proteínas como DCX, NES, la ciclina B1 (CCNB1), la subunidad alfa 4 de laminina (LAMA4) y el factor de transcripción JUND. Además, se demostró que las proteínas no estructurales NS4A y NS5 del ZIKV reducen la expresión de DCX que se requiere para la migración neuronal durante el neurodesarrollo (19).

Las proteínas no estructurales NS4A junto con la proteína NS4B del virus Zika suprimen la señalización de AKT-mTOR e inducen la autofagia, esta vía de señalización regula la proliferación, regulación, supervivencia celular, metabolismo y apoptosis (19, 72, 82). Por otro lado, la proteína no estructural NS5 del ZIKV bloquea la inducción y la señalización de interferón tipo I (112). La infección con ZIKV afecta directamente el crecimiento de

neuroesferas de cultivos primarios de células progenitoras neurales y mediante la transducción con lentivirus que contenían cada gen del ZIKV se demostró que las proteínas NS4A y NS5 del ZIKV están involucradas con la baja regulación del gen DCX en células progenitoras neurales humanas (hNPC) y la reducción a la baja de nestina en células madre neuronales fetales humanas (fNSCs) (19, 82). Por esa razón, en el presente trabajo se realizaron ensayos de acoplamiento molecular entre DCX y otras proteínas involucradas en el neurodesarrollo seleccionadas para este proyecto (MCPH1, CEP152, Reelin, TBR2, GFAP, NES) con las proteínas no estructurales NS4A y NS5 del ZIKV dado que el hallazgo de una posible interacción entre estas proteínas no solo permite postular posibles blancos de acción viral sino que además podría dar explicación a los cambios en el nivel de expresión de los marcadores del neurodesarrollo evaluados tal y como se ha podido inferir con las diferentes evidencias aquí presentadas.

En los trabajos realizados con el ZIKV se ha encontrado que existe una interacción directa entre el gen Musashi-1 y las regiones no codificantes del virus; este gen promueve la replicación viral (16). También se ha encontrado en modelos experimentales y en humanos, una disminución en el grosor de las capas corticales asociado con microcefalia y se ha demostrado que la infección por el ZIKV influye en la regulación de genes estrechamente relacionados con la autofagia y la apoptosis así como en la regulación positiva de algunos genes como la caspasa 6 y supresión de otros como el *atg 12* (15).

El ZIKV ha llamado la atención por su asociación con malformaciones congénitas graves como la microcefalia, adelgazamiento de las capas corticales y anomalías oculares observados en pacientes humanos y en modelos animales como el ratón (15). Los mecanismos por los cuales el ZIKV causa malformaciones fetales son aún desconocidos, sin embargo, teniendo en cuenta el papel de la placenta durante la infección existen dos hipótesis. La primera apunta a que la placenta transmite directamente el ZIKV al feto y la otra hace referencia a que la placenta en sí, podría ser la causa de las malformaciones fetales debido a la respuesta generada con la exposición al virus (113). Esta respuesta proinflamatoria podría estar favoreciendo o causando la microcefalia como se ha visto en casos de exposición a la radiación, consumo de alcohol o cocaína o inclusive con infecciones de otros virus como el citomegalovirus (CMV) (114-117).

Algunos estudios podrían indicar que el ZIKV puede alterar moléculas o vías de señalización específicas durante etapas de desarrollo tempranas, afectando la diferenciación celular y la formación de estructuras cerebrales modificando las funciones llevadas a cabo por marcadores de desarrollo asociados a la microcefalia como lo son DCX, MCPH1, CEP63, CEP152, TBR2, NES, Map-2 entre otros (19, 113, 118-121). La expresión de estos genes se lleva a cabo en su mayoría durante la neurogénesis y su subexpresión o sobreexpresión se han asociado con microcefalia. Es posible considerar que la alteración en estos marcadores neurales podría contribuir a los defectos fetales observados durante la infección por ZIKV (19, 56, 113, 118-

121). En la tabla 1 se visualizan los genes evaluados junto con una breve descripción de su función.

### 3.2 Modelos *in vivo* e *in vitro*

En la actualidad se ha demostrado la transmisión vertical del ZIKV en el modelo de ratón. En estos biomodelos se ha logrado el fenotipo de microcefalia o malformaciones congénitas luego de inocular ratones hembra en distintos estadios embrionarios o del desarrollo postnatal temprano y diferentes vías de infección (122, 123). El modelo murino permite evaluar parte de los mecanismos involucrados en la neuropatogénesis de la infección prenatal por Zika como es la expresión diferencial de proteínas tanto en adultos como en etapas tempranas del desarrollo. Actualmente se han realizado varios estudios utilizando diferentes modelos murinos como es el caso de los modelos: SJL, C57BL/6, ICR, CD-1, entre otros. Estos ratones se han inoculado por diferentes vías; entre las más utilizadas se encuentran la intravenosa, intracerebral, intraperitoneal e inyección retro orbital (5, 15, 124-126).

En el modelo SJL se ha encontrado que la infección con el virus Zika influye en la regulación de genes estrechamente relacionados con la autofagia y la apoptosis. En estos ratones se ha encontrado sobreexpresión de *Casp6*, *Bmf*, *Irgm1* y supresión de los genes *Atg12*, *Gadd45a*, *Fasl*. Por otro lado, en este estudio y en otros modelos murinos ha sido posible simular ciertos cambios morfológicos que se observan en pacientes humanos como cambios morfológicos en el tamaño general del cuerpo y una disminución del grosor de las capas corticales, además, se han encontrado alteraciones a nivel celular que evidencian muerte celular como consecuencia de la infección con ZIKV (15, 47, 62).

En los distintos estudios de modelos murinos se ha logrado observar una correlación entre los hallazgos morfológicos y el cambio en la expresión de genes asociados al neurodesarrollo, procesos de apoptosis y otros tipos de muerte celular, es por esto, que los distintos estudios en donde se evalúe el efecto del ZIKV sobre marcadores del desarrollo cortical y cerebelar deberían incluir los hallazgos histológicos o morfológicos con el fin de establecer correlaciones entre el fenotipo observado y los cambios a nivel molecular (5, 30, 63, 127-129).

Paralelamente se han estudiado los efectos de la infección por ZIKV durante la neurogénesis en cultivos tridimensionales tales como organoides y neuroesferas de células madre pluripotentes inducidas experimentalmente. En estos modelos se ha comprobado que el ZIKV induce muerte celular en células madre neurales humanas, afectando la formación de neuroesferas y reduciendo la formación de organoides. De igual manera, se ha demostrado que las células precursoras corticales son un objetivo del ZIKV a través de la desregulación del ciclo y el aumento de la muerte celular (11, 130). Además, se ha comprobado que el ZIKV puede afectar la expresión de la vía Notch en células progenitoras neuronales humanas (hNPC) y del ratón. Esta vía participa en la proliferación neuronal, la diferenciación y la apoptosis durante la neurogénesis (131).

Los modelos *in vitro* e *in vivo* permiten simular el primer trimestre del desarrollo cerebral donde se ha visto que el ZIKV puede causar graves daños (132, 133). Estas aproximaciones se pueden extender hasta los dos primeros años postnatales y para rata y ratón existen equivalencias entre estas especies (134). Sin embargo, en los cultivos de organoides la falta de un sistema vascular y la ausencia de células inmunitarias puede llegar a ser una gran limitante (135). A pesar del número de investigaciones que se han realizado aún hace falta esclarecer el impacto de la infección por ZIKV en las hNPC y en los genes y proteínas implicadas en el proceso de migración y diferenciación celular.

**Tabla 1.** Marcadores del neurodesarrollo prenatal evaluados.

Etapa del neurodesarrollo	Sigla	Nombre	Descripción
Neurogénesis	DCX	Doblecortina	Proteína asociada al citoesqueleto expresada en neuronas migratorias en todo el sistema en desarrollo y adulto, además, la expresión de ARNm y proteína es homogénea en la zona intermedia, subplaca y placa cortical durante el estadio E14,5 en el ratón (19, 136). La mutación de esta proteína conlleva a la interrupción o alteración de la migración neural y se ha asociado a varios trastornos de la migración neuronal en el humano, como lo es la lisencefalia de Miller-Dieker y la lisencefalia ligada al cromosoma X (136).
	MCPH1	Microcefalina 1	Este gen es expresado en las mitocondrias y cumple un papel crucial en la proliferación y supervivencia de las células gliales radiales apicales durante las etapas de desarrollo cortical (137). Las mutaciones en este gen se han asociado con la microcefalia.
	CEP152	Centrosomal protein 152	Esta proteína estaría involucrada con la duplicación de los centrosomas. La expresión de CEP152 facilita la interacción de PLK4 Y CENPJ, moléculas involucradas en la formación del centriolo (138). Los cambios en la estructura o función del centriolo están asociados con enfermedades graves en humanos tales como ciliopatías, cáncer o problemas en el desarrollo embrionario (139, 140).
	TBR2	Eomesodermin	Tbr2 se expresa en células progenitoras neuronales corticales en la zona subventricular entre los días embrionarios E12 y E16. Desempeña un papel en el desarrollo del cerebro que se requiere para la especificación y la proliferación de las células progenitoras intermedias y su progenie en la corteza cerebral (119). La inhibición de Tbr2 conlleva a una disminución del grosor de las capas corticales (141).
	GFAP	Proteína ácida fibrilar glial	Proteína esencial para procesos como la migración, diferenciación y mantenimiento de las células progenitoras neuronales, al igual que otros miembros de la familia de filamentos intermedios como la vimentina, desimina y periferina están involucrados en la estructura y función del citoesqueleto (142).
	RELN	Reelin	Proteína encargada de controlar la migración neuronal, la formación de las capas en el cerebro de los mamíferos en desarrollo, al igual que el crecimiento, maduración y actividad sináptica en el cerebro adulto (97, 108, 143).

<b>Corticogénesis</b>	NES	Nestina	Proteína de neurofilamento intermedio, requerida para el desarrollo cerebral. Este marcador juega un papel importante en la distribución de factores celulares durante la división de las células progenitoras (144).
-----------------------	-----	---------	---

## 4 Objetivos

### 4.1 Objetivo General

Evaluar los cambios morfológicos y la participación de marcadores del neurodesarrollo en la infección por virus del Zika durante la neurogénesis embrionaria.

### 4.2 Objetivos específicos

1. Identificar los hallazgos o cambios morfológicos en un modelo de infección por ZIKV durante la neurogénesis embrionaria.
2. Analizar el patrón de expresión de genes implicados en la formación de la corteza cerebral y el cerebelo en un modelo de infección por ZIKV durante la neurogénesis embrionaria.
3. Establecer asociaciones entre el grado de interacción de proteínas virales y marcadores del neurodesarrollo con el patrón de expresión encontrado durante la infección viral.

## 5 Materiales y métodos

### 5.1 Consideraciones éticas para el uso de animales de laboratorio

Para el adecuado uso de animales y el manejo de muestras de tejido animal se siguieron las normas técnicas y éticas vigentes de Colombia y las guías internacionales en cuidado y uso de animales de laboratorio que se acogen en el país (145) y de la directiva Europea (146), así como en Bioseguridad el BMBL del CDC-NIH, (147) y el Manual OMS 3ª edición (148).

Se tuvieron en cuenta las disposiciones y recomendaciones consignadas en la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud y en su Título V la investigación biomédica en animales; normatividad jurídica que regula la experimentación animal en Colombia incluida en la ley 84 de 1989 por la cual se adopta el “Estatuto Nacional de Protección de los Animales y las disposiciones sobre métodos de manejo y cuidado de animales de laboratorio usados en Latinoamérica que a la vez consideran los lineamientos internacionales (149). Adicional a lo anterior este trabajo acogió a todas las recomendaciones dictadas por el Instituto Nacional de Salud (INS) (lugar en donde se desarrolló el trabajo de investigación). Este trabajo forma parte de los compromisos adquiridos en el marco del proyecto “Estudio del efecto de la infección por virus ZIKA sobre la citomorfología, la neurobioquímica, y el neurodesarrollo en modelos *in vivo* e *in vitro*” Financiado por Colciencias (Minciencias) y el INS para lo cual los procedimientos aquí descritos fueron avalados por el Comité de Ética en Investigación (CEIN) del INS (Acta No. 13 de 2016). Adicionalmente, este proyecto de tesis fue avalado por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional.

### 5.2 Establecimiento del modelo de infección prenatal

Se inocularon cinco ratones hembra BALB/c en el estadio temprano de gestación E6,5 por la vía intraperitoneal, con una dosis de interferón de 125 mg ref: I-401 (Leinco technologies, Inc) y al siguiente día (E7,5) con una dosis de  $9,4 \times 10^5$  PFU de ZIKV de una cepa circulante en las Américas capaz de infectar el tejido cerebral y generar signos neurológicos; cepa aislada y caracterizada por nuestro grupo de trabajo en el INS (123). También se inoculó el mismo número de hembras con solución vehículo desprovista del virus, para tener un grupo control. Todas las inoculaciones se realizaron previo al proceso de neurulación (E8-E9,5) y los sacrificios de las hembras se realizaron en el estadio embrionario E14,5 debido a los importantes eventos de convergencia del neurodesarrollo cortical y cerebelar que se presentan en dicha etapa (24). Para determinar los estadios de inoculación, se realizó el apareamiento de las ratonas BALB/c en el ciclo estral de diestro (establecido citología vaginal), a partir de este momento se contaron días y horas de preñez. Además, se realizaron mediciones diarias del peso de las hembras y las ratonas que presentaban un aumento del peso eran seleccionadas para los ensayos de inoculación. En total se inocularon 10 hembras gestantes, cinco con virus y cinco controles, este número de ensayos se llevó a cabo teniendo en cuenta la cantidad mínima de ensayos requeridos para obtener una preñez efectiva de

acuerdo con la experiencia previa del grupo de trabajo en este tipo de ensayos, basados en el principio de las tres R de Russel: reducción, refinamiento y reemplazo (150). Con estas inoculaciones se logró obtener un grupo mínimo de tres hembras preñadas infectadas con sus respectivos controles.

### 5.3 Eutanasia y manejo de muestras

La eutanasia de las hembras gestantes se llevó a cabo en cámara de CO<sub>2</sub>, se y para los embriones se realizó mediante la exposición a un caudal mayor de CO<sub>2</sub>. La mayor exposición a los gases se realizó debido a que en etapas tempranas del desarrollo embrionario o posnatal temprano la rata y el ratón resisten altamente las condiciones de hipoxia (151). Cada embrión fue extraído dentro de su saco embrionario en donde contenían la placenta de cada embrión. Los procedimientos que involucraron intervenciones madre-cría fueron coordinados por un médico/a veterinario (en el Bioterio del INS) entrenado en este tipo de procedimientos que aseguró el manejo adecuado de los animales.

A continuación, se realizó la extracción de los encéfalos de los embriones para evaluar la expresión de los marcadores y los daños histopatológicos únicamente en el tejido cerebral. Los embriones control e infectados fueron separados en dos grupos como se explica más adelante, la mitad de los embriones obtenidos de cada madre inoculada se ubicó en un vial de 1,5 ml con 500 uL de RNAlater® (Qiagen Inc, USA) y las muestras se almacenaron a -80°C, hasta su posterior procesamiento. La otra mitad de los embriones se fijó en una solución de paraformaldehído al 4%, para ensayos histológicos e inmunohistoquímicos.

### 5.4 Metodología por objetivo

#### 5.4.1. Coloraciones de Hematoxilina-Eosina (H&E) (Objetivo 1)

Se realizaron coloraciones de H&E en los tejidos cerebrales para evaluar cambios neurohistológicos o citopáticos convencionales previamente mencionados en ensayos de infección por ZIKV tales como calcificaciones, necrosis, cuerpos picnóticos y otras formas de muerte celular. Las interpretaciones de los ensayos histológicos se realizaron mediante la asesoría del grupo de patología del Instituto Nacional de Salud, aquí, se construyó una matriz de las diferentes áreas cerebrales evaluadas para establecer asociaciones entre el tipo de daño celular y la cantidad de antígeno viral expresado en unidades de densidad óptica (tabla 5).

#### 5.4.2. Ensayos de relación entre porcentaje de células infectadas y alteraciones morfológicas

En los estudios histológicos se llevaron a cabo ensayos de hibridación *in situ* en cortes seriados con el fin de evaluar las diferencias entre el porcentaje de células infectadas por cada técnica y establecer relaciones con el grado de daño o alteraciones morfológicas observadas en los encéfalos de embriones analizados.

#### 5.4.3. Ensayos histológicos e inmunohistoquímicos (IHQ) (Objetivo 1)

Para el análisis de los cambios histológicos de ratones BalB/c infectados con Zika, los encéfalos de los embriones fijados en paraformaldehído 4% -DEPC (diethylpirocarbonato), se incluyeron en parafina y se realizaron cortes de 4 micras en sentido sagital. Estos cortes fueron recogidos sobre láminas cargadas y se llevaron a cabo tinciones H&E así como ensayos inmunohistoquímicos para detectar antígeno viral de Zika mediante el kit MACH4 AP polymer marca Biocare Medical y un anticuerpo policlonal contra Zika donado por el CDC. El protocolo de inmunohistoquímica en lámina se realizó de acuerdo con ensayos previamente estandarizados en el grupo de Morfología Celular del INS (152-154) o por el protocolo del kit MACH4 (Rochem Biocare).

#### 5.4.4. Ensayos de hibridación *in situ* (ISH) (Objetivo 1)

Las muestras fueron fijadas en paraformaldehído (PFA) 4% -DEPC para evitar la presencia de RNasas que pueden alterar la integridad de las sondas, por esta razón, todos los procesos de deshidratación se realizaron con etanol grado molecular y diluidos con H<sub>2</sub>O-DEPC. Cada ensayo contó con tejidos control tanto positivos como negativos.

Para los ensayos de ISH se utilizaron sondas previamente diseñadas por nuestro equipo de trabajo (155) y sintetizadas con los primers forward y reverse respectivamente; las sondas fueron detectadas con el conjugado de digoxigenina (DIG). Los tejidos pasaron por un proceso de desparafinación y rehidratación usando un coplin de vidrio de 60ml estéril. Los cortes de los tejidos se ubicaron sobre láminas cargadas de manera electrostática, se incubaron con aproximadamente 400  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O-DEPC y se procedió a realizar la digestión enzimática con 1 $\mu$ L de proteinasa K por 15 minutos a 37°C en cámara húmeda.

Los tejidos pasaron por una post-fijación con PFA 4%-DEPC por 20 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda. Después de unos lavados con PBS 1X-DEPC se realizó la pre-hibridación en la cual los tejidos se incubaron a 70°C por 5 minutos en la solución de hibridación compuesta de (10ml total): Formamida 100% (5ml), SSC 20X (2.5 ml), Tween 100% (0.01ml), Heparina 100mg/ml (0.01ml), SDS 100% (1ml), Denhart's solution 50X (0.2ml), tRNA 10mg/ml (2.5ml) y H<sub>2</sub>O-DEPC (1.03ml). Las muestras y las sondas pasaron por un proceso de desnaturalización con la solución de hibridación a 70°C por 5 minutos y se incubaron con 400  $\mu$ L de sonda a 65°C por toda la noche en cámara húmeda. Se utilizaron sondas conjugadas con digoxigenina (DIG). Las sondas sintetizadas con el primer *forward* acoplado al promotor SP6 para hibridación con el ARN de replicación del ZIKV (hebra antisentido) y las sondas sintetizadas con el primer *reverse* acoplado con el promotor T7 para hibridación con el ARN genómico del virus Zika (hebra sentido). Pasado el tiempo de incubación, se procedió a realizar lavados con la solución de hibridación sin sondas a 75, 50 y 25 %, a una temperatura de 65°C por 10 minutos cada una. El revelado se llevó a cabo con NBT/BCIP (SIGMA) en cámara húmeda cubierta de la luz; el tiempo de exposición fue definido dependiendo de la coloración deseada con revisiones periódicas cada 30 minutos.

## 5.5 Evaluación de la expresión diferencial de marcadores de neurodesarrollo (Objetivo 2)

### 5.5.1.1 *Extracción de ARN viral total a partir de lisados de tejidos animales*

Para la cuantificación de la expresión de los marcadores en tejidos se realizó la extracción del ARN total mediante la utilización del estuche comercial *RNeasy* mini kit® (Qiagen Inc, USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se adicionaron 600 uL de buffer RLT y se realizó la homogenización del tejido mediante la utilización de una jeringa estéril. Posteriormente se centrifugó el lisado a 13.000 rpm y el sobrenadante fue transferido a un nuevo vial, al cual se le adicionó un volumen de etanol al 70%. La mezcla fue transferida a una columna *RNeasy* spin y se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 segundos. A continuación, se realizó un lavado con 700 uL de buffer RW1 y dos lavados con buffer RPE. Finalmente, para la elusión, la columna se ubicó en un nuevo vial de 1.5 mL y sobre la membrana se adicionaron 50 uL de agua libre de RNasas; luego se procedió a centrifugar a 13.000 rpm. Los extractos de ARN fueron almacenados a -80°C hasta su posterior manejo.

### 5.5.1.2 *Diseño de primers para la evaluación de la expresión diferencial de marcadores*

Los primers utilizados en este estudio fueron previamente diseñados con el grupo de trabajo (Anexo 1B). El diseño de los primers se llevó a cabo utilizando los parámetros descritos en el anexo 1, a través del módulo PrimerSelect de la suite LaserGene® versión 8.1 (DNASTAR Inc., Madison, WI, EE. UU.) y el software de bioinformática Unipro UGENE v. 34. Se seleccionaron los primers de tal manera que el producto amplificado fuera entre 80 a 150pb. Las secuencias de referencia utilizadas para el diseño de los primers se obtuvieron de la base de datos de NCBI. A continuación, se realizó un alineamiento entre las secuencias de los marcadores de neurodesarrollo a evaluar expresados en ratón y los primers seleccionados, con el fin de identificar si estos primers reconocían los genes a evaluar mencionados en la tabla 1.

Una vez diseñados los primers se analizaron con el software Beacon Designer de PREMIER Biosoft para seleccionar aquellos que presentaron mejor estabilidad energética y menor probabilidad de generar “harpings” y regiones homólogas, es decir que se seleccionaron los primers que tuvieron energías de estabilidad bajas con el fin de minimizar efectos secundarios sobre la eficiencia de la PCR (anexo 2).

### 5.5.1.3 *RT-qPCR en tiempo real para la cuantificación de marcadores de neurodesarrollo*

A partir de las extracciones de ARN en fase prenatal se evaluaron los siguientes genes DCX, MCPH1, CEP152, Reelin, TBR2, GFAP y NES, estos genes fueron seleccionados por su importancia en el neurodesarrollo y posibles implicaciones en la patogénesis de la microcefalia y porque además se encuentran presentes en humano y ratón. Como gen de referencia para la cuantificación relativa de la expresión de los transcritos antes

mencionados se utilizó GAPDH. Los datos se recolectaron del análisis de 7 embriones de madres control o Mock y 6 embriones de madres infectadas con tres réplicas técnicas para cada grupo, todos los embriones seleccionados como infectados presentaron prueba de RT-PCR positiva para ZIKV.

## 5.6 Estudio de interacción proteína – proteína (Acoplamiento molecular). (Objetivo 3)

### 1.

#### 5.6.1.1 Preparación de moléculas para el estudio de interacción proteína-proteína

Las estructuras en 3D de los marcadores de neurodesarrollo se obtuvieron principalmente de la base de datos Protein Data Bank (PDB) (156) y aquellas que no se encontraron en la base de datos se procedió a realizar la estructura en 3D a partir del software Swiss-model (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>). Todas las estructuras se visualizaron en PyMOL stereo 3D Zalman. Se realizó una limpieza de moléculas de agua y de estructuras no deseadas como ligandos u otros componentes. Una vez realizada la limpieza se procedió a guardar la estructura en formato PDB. La interacción proteína-proteína se realizó con el software Haddock 2.2 en el cual se indicaron los sitios activos y pasivos de cada molécula obtenidos a partir del programa de predicción de estructura de proteína CPORT (tabla 2).

**Tabla 2.** Moléculas seleccionadas a partir de las bases de datos de Uniprot y PDB para el análisis de interacciones proteína-proteína.

Proteína	Código de identificación	Cadena
CEP-152	A2AUM9	H
DCX	1mjd*	A
GFAP	P03995	A / B
MCPH1	Q7TT79	A
TBR2	O54839	C / D
NES	Q6P5H2	A / B
RELN	2ddu*	A
NS4A ZIKV	Q32ZE1	F
NS5 ZIKV	Q32ZE1	A

\*Moléculas obtenidas de PDB.

Con todos los genes evaluados para expresión diferencial se llevaron a cabo estudios de interacción *in silico* con las proteínas no estructurales NS4A y NS5 del ZIKV. Estas proteínas son cruciales para la replicación viral y consideradas como fichas clave para la inhibición de la respuesta del interferón contra el flavivirus.

### **5.6.1.2 *Análisis con el servidor Protein Interaction Calculator (PIC)***

El análisis con el servidor PIC (<http://pic.mbu.iisc.ernet.in/job.html>) se realizó únicamente con las proteínas que presentaron interacción favorable proteína-proteína con el ZIKV. Por medio de este servidor, fue posible observar en detalle los sitios de interacción y tipos de enlaces que pueden existir entre nuestros marcadores moleculares y las proteínas de replicación del ZIKV NS4A y NS5.

### **5.6.1.3 *Relación entre acoplamiento molecular y grado de expresión de marcadores de neurodesarrollo (objetivo 3)***

A partir de los estudios de acoplamiento molecular y expresión diferencial se realizaron análisis de asociación entre aquellos marcadores del neurodesarrollo que presentaron energías de interacción más altas con las proteínas virales y que además hayan presentado cambios significativos en el nivel de expresión evaluados por qRT-PCR hacia la alta o hacia la baja.

A continuación, se llevó a cabo un análisis de correlación de Kendall con las proteínas que presentaron interacción molecular con las proteínas NS4A y NS5 del ZIKV para determinar si existía algún tipo de asociación entre la interacción molecular de las proteínas evaluadas y la tendencia en la expresión de los marcadores analizados. El análisis de interacción se llevó a cabo con el software estadístico Statgraphics.

## **6 Resultados y discusión por objetivo**

### **6.1 Hallazgos morfológicos encontrados y localización del virus en un modelo de infección por ZIKV durante la neurogénesis embrionaria (Objetivo 1).**

Todas las inoculaciones se realizaron previo al proceso de neurulación (E8-E9,5), fase en la que se da inicio al cierre del tubo neural con la posterior formación del sistema nervioso central. Las inoculaciones con ZIKV en ratones en estadios cercanos a la neurulación han mostrado mayores alteraciones morfológicas y alto éxito en la transmisión vertical (63, 128).

De acuerdo con nuestros resultados, tanto en el grupo control como en los infectados se obtuvieron embriones poco desarrollados y algunos con apariencia de haber sido reabsorbidos (tabla 3). Esto sugiere que la infección con el ZIKV no alteró el número de embriones que se desarrollaron en una camada en el modelo de infección obtenido. La evaluación histopatológica en los cerebros de los embriones Balb/c E14,5 infectados con ZIKV se realizó principalmente en aquellos que presentaron una marcación positiva para el antígeno viral, debido a que no todos los embriones se infectaron con el virus. Estos resultados se deben, entre otros, a la sensibilidad de la técnica siendo más alta la obtenida a través de ensayos por PCR, también a que las proteínas se pueden degradar fácilmente en

tejidos fijados en parafina y a la propia naturaleza de la infección en donde una de cada 1000 mujeres embarazadas puede tener un niño con alteraciones neurológicas (157).

**Tabla 3.** Hallazgos histopatológicos en embriones control e infectados con ZIKV.

Grupo muestral	Número de embriones	Malformados	Reabsorciones
MOCK	10	1	3
MOCK	12	0	0
MOCK	9	0	1
ZIKV	10	0	4
ZIKV	10	1	1
ZIKV	8	0	0

En promedio se obtuvo una inmunorreactividad positiva en dos o tres embriones de una camada de 10 y solo tres embriones resultaron con inmunorreactividad positiva intensa (tabla 4). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el trabajo de Khaiboullina y colaboradores, donde se detectó la presencia del ZIKV en la mayoría de las placentas de los embriones infectados pero no en todos los cerebros de los embriones (158). Se ha demostrado que la infección por el ZIKV en estadios embrionarios en el ratón induce daño en la estructura y funcionalidad de la placenta (159), pero aun así la placenta continua siendo una barrera eficaz para prevenir la infección por distintos patógenos de los embriones en desarrollo.

**Tabla 4.** Casos positivos para antígeno viral en embriones E14,5 infectados con ZIKV.

Grupo muestral	Número de embriones	Número total de embriones	Casos positivos para antígeno viral	% de casos con antígeno viral
ZIKV	10	28	3	10,7%
ZIKV	10			
ZIKV	8			

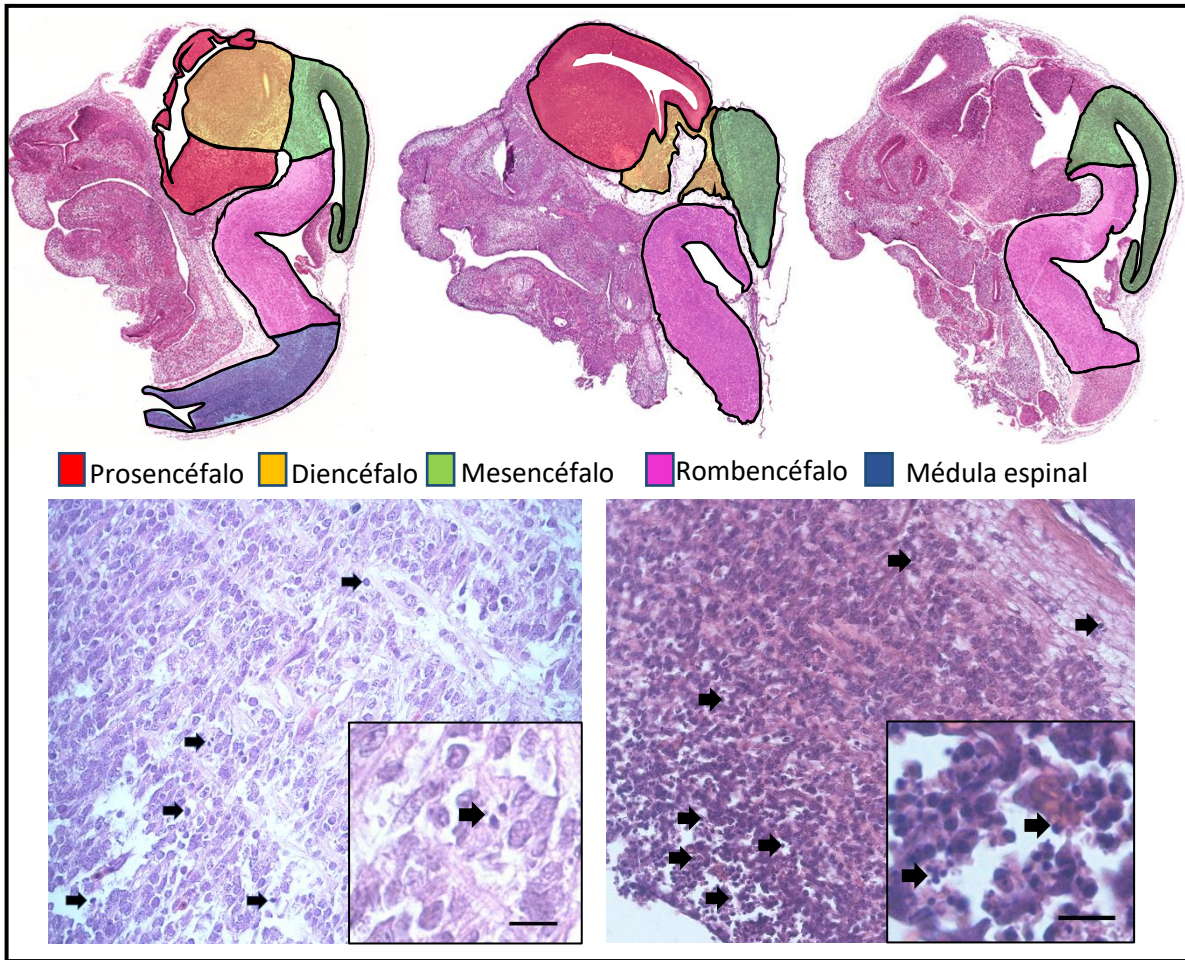
Según los resultados obtenidos con los ensayos de H&E e inmunohistoquímica, se observa una correlación entre la presencia de daño celular (células posiblemente apoptóticas) y la ubicación de la inmunomarcación positiva del ZIKV en las regiones de los encéfalos de los embriones infectados (figura 1 y 2). El antígeno viral se encontró en prosencéfalo, mesencéfalo y en mayor medida en el rombencéfalo y la médula espinal (figura 2). En estas áreas se observaron cuerpos picnóticos indicando posibles procesos de apoptosis (figura 1). En la mayoría de los casos analizados se notó que la marcación con el antígeno de ZIKV fue escasa, sin embargo, el rombencéfalo y médula espinal siempre presentaron marcación positiva para el antígeno viral.

**Tabla 5.** Hallazgos histopatológicos asociados a la presencia del ZIKV en encéfalos de ratones Balb/c E14,5.

Marcación positiva del antígeno viral del Zika					
Embrión 1	Estructura		IHQ y densidad óptica	ISH y densidad óptica	Hallazgo histopatológico
	Embrión 1	Prosencéfalo	Palio	Marcación fuerte focalizada 184,32 pixeles	
Hipotálamo peduncular Caudal					
Hipotálamo peduncular basal					
Diencefalo		Tálamo	Marcación fuerte / tálamo		
		Prosómero 1			
		Tegmento talámico			
		Complejo reticular			
Mesencéfalo		Formación gris tectal	Marcación leve focalizada 180,72 pixeles	Sin marcación	
		Colículo superior			
		M1 tegmentum del mesencéfalo			
		Mesómero 2 /mesencéfalo caudal			
Rombencéfalo		Rombencéfalo prepontino	Marcación fuerte general 196,886 pixeles	Marcación fuerte / Rombencéfalo prepontino / Rombencéfalo medular	
	Rombencéfalo pontino				
	Rombencéfalo pontomedular				
	Rombencéfalo medular / médula				

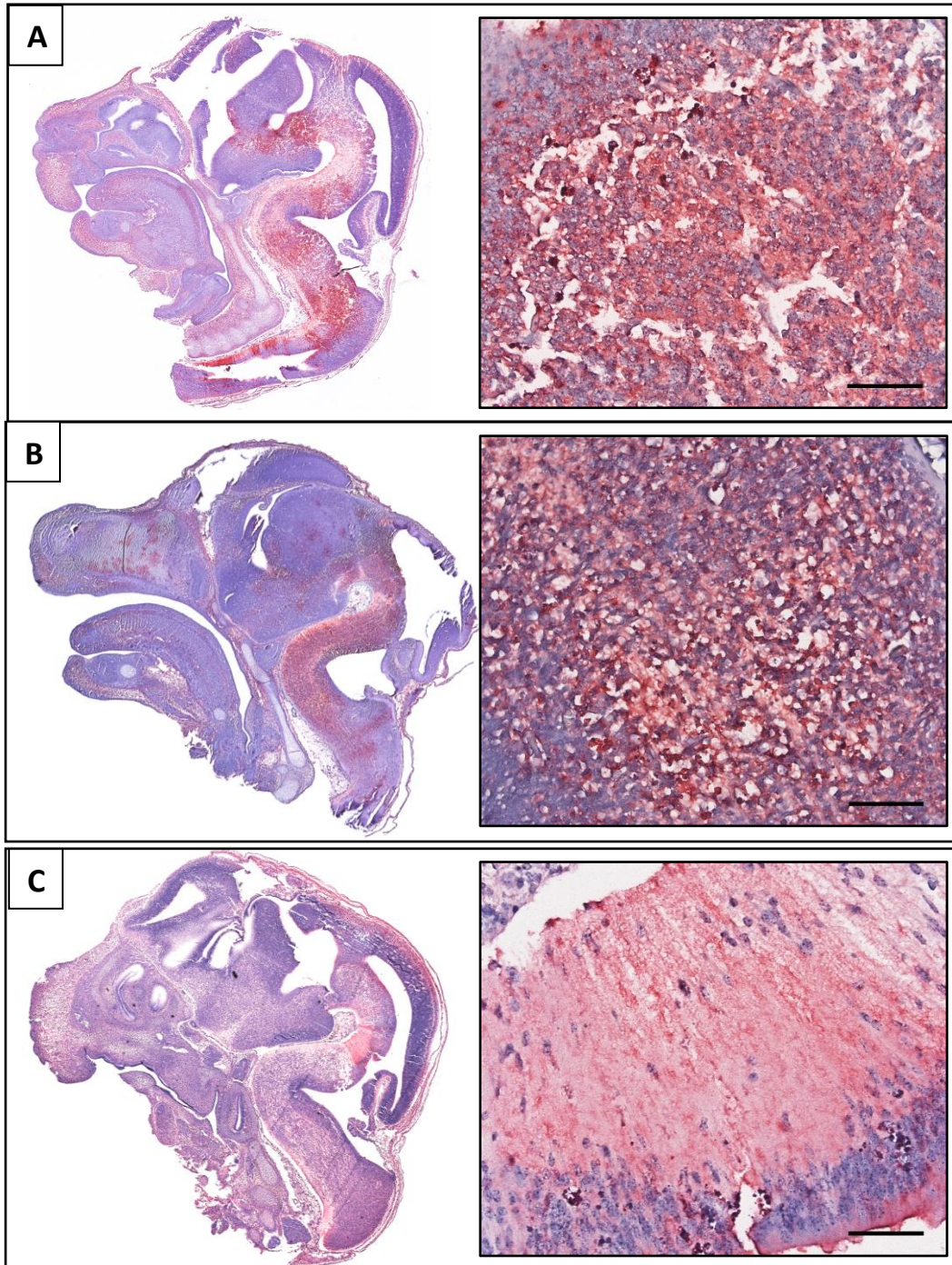
	Médula espinal	Marcación fuerte general 178,646 pixeles	No aplica		
<b>Embrión 2</b>	<b>Estructura</b>		<b>IHQ</b>	<b>ISH</b>	<b>Hallazgo histopatológico</b> Inmunoreactividad positiva principalmente en tallo, acompañado con cuerpos picnóticos.
	Prosencéfalo		Sin marcación	Marcación no especifica	
	Diencefalo		154,123 pixeles		
	Mesencéfalo	Tectum del mesencéfalo colicular	Marcación leve focalizada 145,422 pixeles		
		M1 tegmentum del mesencéfalo			
	Rombencéfalo	Rombencéfalo prepontino	Marcación leve focalizada 183,996 pixeles		
Rombencéfalo pontomedular					
Rombencéfalo medular / médula					
Médula espinal		Sin marcación 165,254 pixeles			
<b>Embrión 3</b>	<b>Estructura</b>		<b>IHQ</b>	<b>ISH</b>	<b>Hallazgo histopatológico</b> Inmunoreactividad positiva en tallo, médula espinal y en menor proporción en encéfalo, acompañado con cuerpos picnóticos.
	Prosencéfalo	Vesícula telencefálica	Marcación fuerte general 152,754 pixeles	Marcación fuerte / Subpallio / hipotálamo terminal	
		Hipotálamo terminal			
	Diencefalo	Tegmento pretalámico		Marcación fuerte / Prosómero 1 y 2	
		Tálamo			
		Prosómero 1			
Mesencéfalo	Tectum del mesencéfalo colicular	Marcación fuerte focalizada 151,738 pixeles		Marcación fuerte	
	M1 tegmentum del mesencéfalo				

	Rombencéfalo	Rombencéfalo prepontino	Marcación fuerte general 159,126 pixeles	Marcación intensa general	
		Rombencéfalo pontomedular			
		Rombencéfalo medular / médula			
	Médula espinal		Marcación fuerte general 173,576 pixeles	Marcación fuerte general	



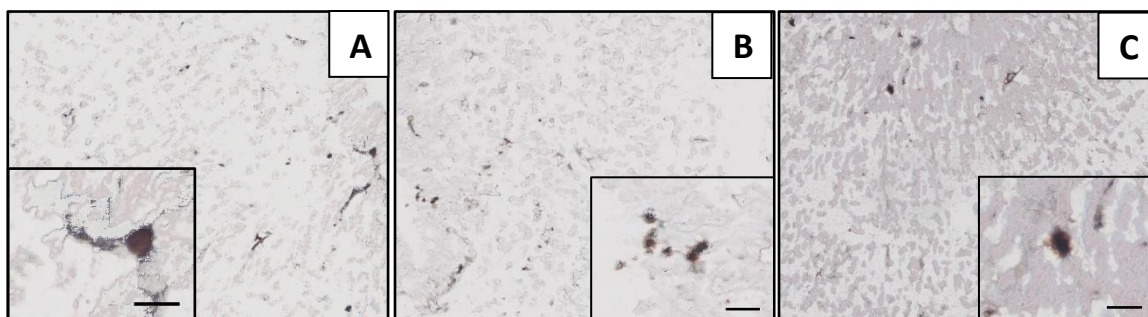
**Figura 1.** Regiones principalmente afectadas durante la infección con ZIKV en embriones de ratón E14,5. El recuadro en mayor detalle corresponde a una imagen del rombencéfalo en donde se observan cuerpos picnóticos 40X.

Cabe resaltar que durante los análisis histopatológicos no se observaron células inflamatorias ni calcificaciones; hallazgos frecuentemente reportados en casos de humanos con microcefalia causada por la infección de ZIKV. La ausencia de las calcificaciones en los ensayos de coloración con H&E en los embriones infectados es similar a lo reportado por Cui y colaboradores, quienes no encontraron estos hallazgos morfológicos en estadios prenatales pero si en postnatales (P40); alteraciones que además estuvieron acompañadas de otras afectaciones como déficit visual y motor (160).



**Figura 2.** Inmunoreactividad positiva del ZIKV en embriones Balb/c E14,5 infectados. En rojo se observa la marcación positiva para el antígeno viral. El recuadro en mayor detalle corresponde a la marcación positiva del antígeno viral obtenida en cada uno de los embriones, principalmente en rombencéfalo ( A y C) y Mesencéfalo (B) 40X.

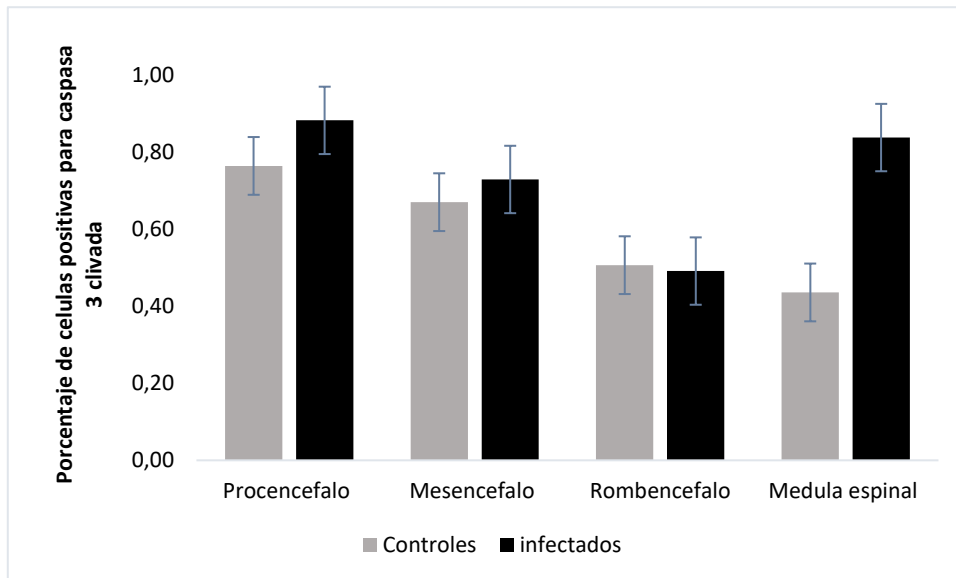
La cepa viral utilizada en nuestro estudio corresponde a linajes circulantes en las Américas provenientes del linaje asiático del ZIKV y la distribución de antígeno viral encontrada en el presente estudio es similar a la reportada en estudios de tropismo viral obtenidos en el murino y otros modelos de infección por el flavivirus, en donde se ha encontrado que el ZIKV infecta de manera eficiente las células progenitoras del prosencéfalo, el rombencéfalo y médula espinal (161, 162). Por otro lado, en embriones de pollo se ha comprobado que la infección con el ZIKV aumenta la muerte celular y por lo tanto, reduce la proliferación de los progenitores neurales en las áreas mencionadas. (163). En los embriones Balb/c E14,5 infectados de este estudio, encontramos un aumento de cuerpos picnóticos, indicando un posible daño celular por la infección con el ZIKV, por lo tanto, realizamos un ensayo con caspasa 3 clivada para determinar si el daño celular es debido a muerte celular por apoptosis, inducida por la infección con el virus (figura 3).



**Figura 3.** Inmunorreactividad positiva de caspasa 3 clivada en embriones Balb/c E14,5 infectados. Marcación positiva de caspasa 3 clivada en rombencéfalo (A y B) y médula (C) de embriones infectados. El recuadro en mayor detalle corresponde a una ampliación del rombencéfalo en donde se observa inmunorreactividad con caspasa 3 clivada 40X. En café se observa la marcación positiva.

De acuerdo con nuestros resultados, encontramos un aumento de la inmunorreacción por caspasa 3 clivada en el rombencéfalo y médula espinal en los embriones infectados en comparación con los controles (figura 4); estos resultados concuerdan con los obtenidos de la inmunorreactividad positiva del antígeno viral. Por otro lado, aunque se observa un

aumento de la inmunorreacción en los encéfalos de los embriones infectados, este aumento no es estadísticamente significativo (Anexo 3).

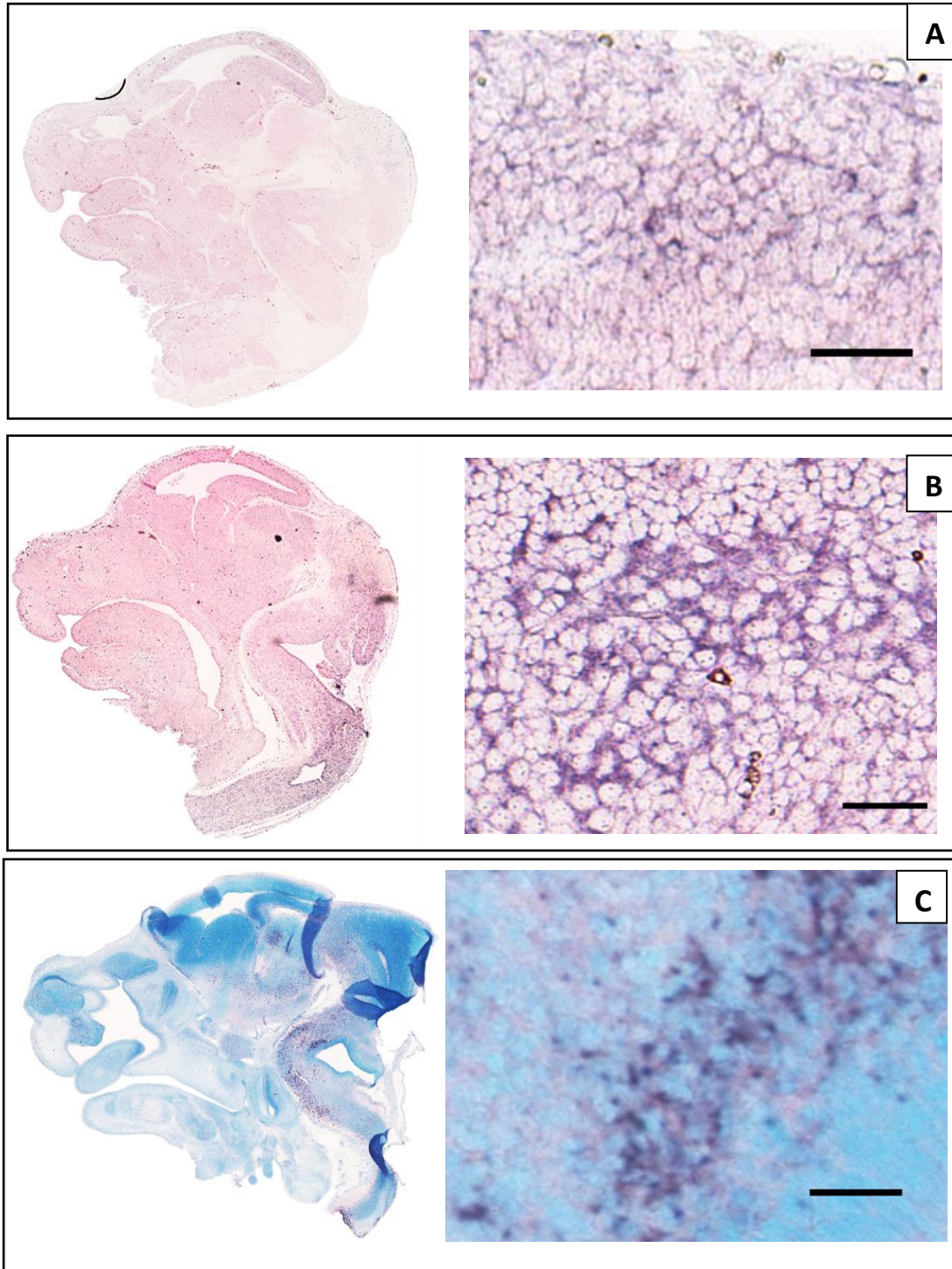


**Figura 4.** Porcentaje de inmunoreactividad positiva para caspasa 3 clivada entre embriones Balb/c E14,5 infectados y controles. Valores de inmunorreacción para el prosencéfalo, mesencéfalo, rombencéfalo y médula espinal. Los valores se calcularon teniendo en cuenta análisis de densidad óptica mediante el programa *Photoshop* versión 4.0.

Con el fin de saber si existía alguna relación entre la infección con el ZIKV, la replicación viral y las malformaciones morfológicas, se realizaron ensayos de ISH en los embriones que obtuvieron una inmunoreactividad positiva más intensa. A través de la sonda SP6 se detectó ARN viral de la hebra antisentido en el prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo (Figura 5A y B) reafirmando que el ZIKV no solo tiene la capacidad de infectar células neurales sino también de replicarse en el tejido cerebral fetal del modelo evaluado.

Los hallazgos histopatológicos e inmunohistoquímicos en los encéfalos de los embriones infectados permitieron evidenciar la presencia de células apoptóticas pero no de células inflamatorias, a diferencia de lo reportado en otros modelos de infección por ZIKV prenatal, en donde se ha observado aumento en la expresión de factores inflamatorios, especialmente de las quimiocinas CCL2, CXCL1 y CXCL10. La presencia de estas quimiocinas podrían facilitar la eliminación de la infección viral pero a la vez contribuir al incremento de la neuroinflamación (158). Se han encontrado niveles elevados de CCL2 en mujeres embarazadas infectadas con ZIKV que tuvieron como resultado bebés con malformaciones congénitas y mujeres embarazadas infectadas con ZIKV con bebés sin ningún tipo de malformación (164). Además, se ha demostrado que el aumento de la concentración de quimiocinas CCL2 está asociada con la gravedad de infecciones por otros flavivirus como el DENV, enfermedades neurológicas y deterioro de la supervivencia neuronal (165, 166). Aun

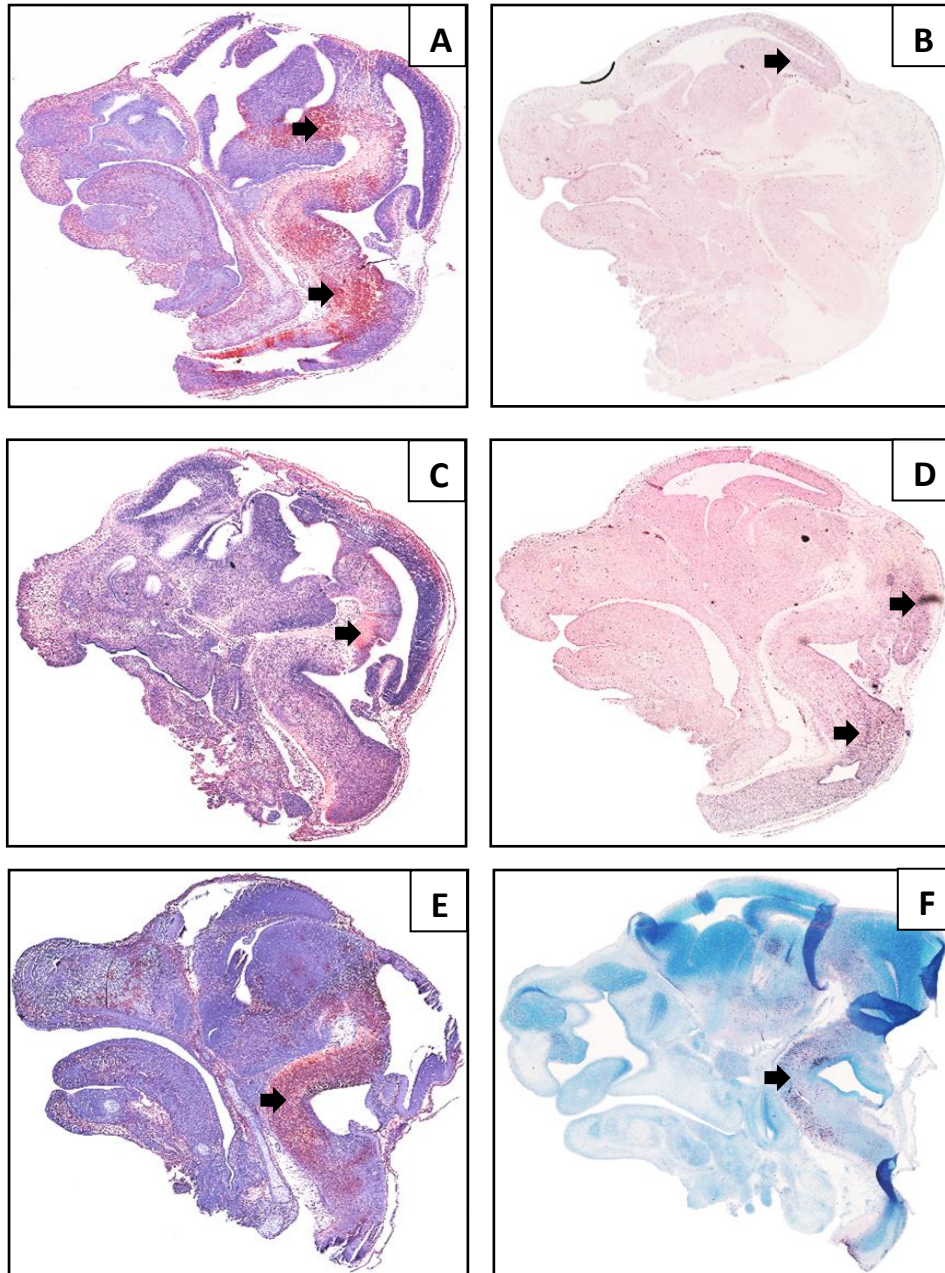
así, existen reportes de madres que presentaron niveles elevados de CCL2 con bebés sanos por lo que la presencia de células inflamatorias no sería el único determinante para que se presenten malformaciones asociadas a la infección por ZIKV (164).



**Figura 5.** Imagen de hibridación in situ ilustrando ARN de replicación y genómico del ZIKV en embriones Balb/c E14,5 infectados. Marcación positiva de ARN de replicación del ZIKV principalmente en la corteza (A), en el rombencéfalo y médula espinal (B). Nótese la presencia del ARN genómico en el prosencéfalo, mesencéfalo, rombencéfalo y médula espinal. Tejidos contracolorados con Eosina (A y B) y con verde metilo al 5% (C). La identificación del genoma viral se realizó con la sonda T7 y la presencia de ARN de replicación con la sonda SP6.

Al comparar los resultados de ISH con IHQ, mediante cortes seriados, se observó aparente colocalización de ARN genómico y de replicación del ZIKV en el rombencéfalo y médula espinal con el antígeno viral (figura 6). Sin embargo, en algunos embriones se encontró marcación positiva para la hebra negativa (ARN de replicación) con ausencia de marcación para el antígeno viral (figura 6A y B). Estos resultados nos muestran la importancia del uso de técnicas simultaneas como la IHQ e ISH para estudiar el tropismo viral (167) en donde se logran obtener resultados complementarios. Además nos permite visualizar las bondades del uso de la ISH como una técnica altamente sensible para la detección en el tejido de blancos de interés tales como genomas de patógenos o de marcadores del neurodesarrollo lo que nos permite, además, hacer asociaciones entre el grado de daño en el tejido y la presencia viral.

En nuestro modelo de infección es posible inferir que el virus utilice la vía hematológica como mecanismo de diseminación a través de la vía placentaria para la transmisión vertical madre cría, sin embargo, una vez el virus alcanza el encéfalo podría usar la vía axonal dado que en un modelo de infección por ZIKV en murinos se ha demostrado que la inoculación en uno de los hemisferios produce la infección en el lado contralateral (4). En nuestro estudio se comprobó la transmisión vertical por la vía hematológica después de la inoculación intraperitoneal con ZIKV en ratones Balb/c hembras infectadas en estado de preñez. Sin embargo, el transporte axonal no pudo ser comprobado mediante este método de inoculación.



**Figura 6.** Comparación entre los resultados obtenidos con IHQ e ISH para el ZIKV. Imágenes de inmunohistoquímica (A, C y E). Marcación para la hebra sentido de ARN genómico (F). Marcación para la hebra antisentido de ARN de replicación (B y D). Nótese que en la figura A se observa una marcación del antígeno viral principalmente en el mesencéfalo, rombencéfalo y médula espinal, mientras que en la figura B la marcación del ARN de replicación se presentó especialmente en el prosencéfalo. En la figura C se observa una marcación leve del antígeno viral en el rombencéfalo, mientras que hay una marcación alta del ARN de replicación en el prosencéfalo, mesencéfalo, rombencéfalo y médula espinal

en la figura D. En la figura 5E y F se aprecia la marcación del antígeno viral y ARN genómico en las mismas áreas que en la figura D pero ahora en ambos tipos de técnicas, indicando posible colocalización. Estas imágenes fueron obtenidas a partir de cortes seriados. 10X.

A pesar de las ventajas de la ISH es posible evidenciar la escasa marcación para la hebra antisentido o ARN de replicación viral, esto puede deberse a que una de las características de la replicación de virus ARN positivo como el ZIKV es la alta proporción de cadenas positivas y baja proporción de hebras negativas. Esta proporción puede ser de 1 a 5% del total de hebras sintetizadas (168, 169). Nuestros resultados difieren a los obtenidos por Valentine y colaboradores (169) quienes solo encontraron presencia de hebras positivas en cerebros de ratones Swiss-Webster postnatales infectados durante estadios embrionarios. Estos resultados podrían atribuirse a tiempos de evaluación más largos entre la fase de inoculación y la fase de análisis de los encéfalos de las crías obtenidas, esperándose una caída en la carga viral como resultado de la reducción en la tasa de replicación.

## 6.2 Expresión diferencial de genes implicados en la formación de la corteza cerebral y el cerebelo en un modelo de infección por ZIKV (objetivo 2)

Previo a la evaluación de la expresión de los genes implicados en el neurodesarrollo fue necesario realizar ensayos de presencia/ausencia del ZIKV en las extracciones de ARN obtenidos a partir de las cabezas de los embriones infectados, de esta manera se analizó la expresión de genes únicamente en los embriones con prueba de RT-PCR positiva (tabla 6).

Grupo muestral	Número de embriones	Positivos por PCR	Reabsorciones
MOCK	9	0	0
MOCK			
MOCK			
ZIKV	24	7	29,16%
ZIKV			
ZIKV			

**Tabla 6.** Ensayos presencia/ ausencia en embriones de ratones Balb/c E14,5 provenientes de madres infectadas con ZIKV.

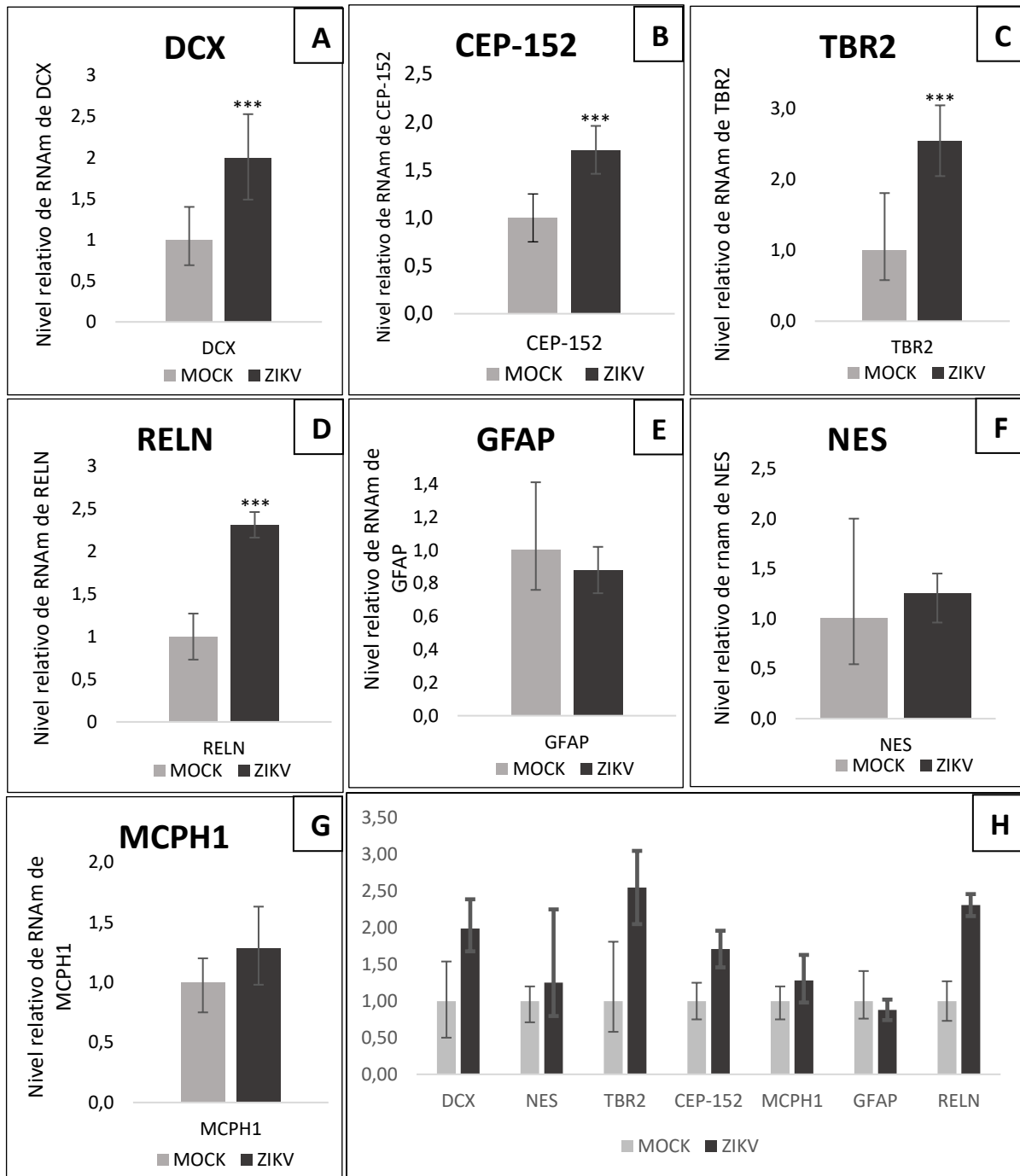
Estos ensayos al igual que los obtenidos por IHQ permitieron evidenciar que no todos los embriones resultaron positivos para ZIKV a pesar de que las placentas si estaban infectadas, probando una vez más que la sola infección de la placenta no determina el tropismo viral hacia el encéfalo y la aparición de alteraciones y malformaciones en el neurodesarrollo (tabla 7) (158).

**Tabla 7.** Ensayos presencia/ ausencia en embriones y placentas de ratones Balb/c E14,5 provenientes de madres infectadas con ZIKV.

<b>Presencia /ausencia</b>		
	<b>Ct Embriones</b>	<b>Ct Placentas</b>
Embrión 1	32,6	19,1
Embrión 2	26,2	19,8
Embrión 3	-----	25,2
Embrión 4	-----	19,4
Embrión 5	31,3	19,9
Embrión 6	30,0	21,5
Embrión 7	31,3	19,8
Embrión 8	31,4	22,8

Los valores de Ct indican el umbral de amplificación para la prueba. Se aceptan como positivos aquellos valores que sean menores a 38 (170).

Los ensayos de expresión diferencial permitieron evidenciar cambios en la expresión en los marcadores de neurodesarrollo evaluados con sobrerregulación de los transcritos DCX, TBR2, RELN y CEP-152 (figura 6) con valores de *P* significativos (Anexo 4). Esta misma tendencia se observó con los marcadores NES y MCPH1 pero sin cambios significativos, contrario a lo observado con GFAP donde se obtuvo una aparente subregulación (figura 7).



**Figura 7.** Niveles de transcritos de marcadores de neurodesarrollo evaluados en encéfalos de ratones Balb/c E14,5 infectados por ZIKV. Los niveles de expresión de DCX, CEP-152, TBR2, RELN, GFAP, MCPH1 y NES se analizaron mediante qRT-PCR. Los datos corresponden a los resultados de tres réplicas técnicas normalizados con GAPDH. Se tomó el valor de (1) como el valor base de todos los Mock y contra este se compararon los valores de expresión en los infectados. Los valores de expresión fueron determinados mediante el método de Livak  $2^{\Delta\Delta Ct}$  los valores de Ct correspondieron al umbral de detección, este umbral

siempre se deja con un valor base de 1 para las muestras control o MOCK y los valores que varían estarán por encima o por debajo de este parámetro (171). Las barras de error corresponden a la desviación estándar media con valores máximos y mínimos. Análisis mediante la prueba no paramétrica de Wilcoxon- Mann Whitney U; \* $p < 0,005$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$ .

De acuerdo con nuestros resultados y los observados en otros trabajos, es posible afirmar que la infección por ZIKV altera la expresión de un gran número de genes cruciales para el desarrollo cortical y cerebelar. En distintos modelos de infección por ZIKV comúnmente se reporta expresión a la baja de genes asociados al neurodesarrollo, sin embargo, en nuestro modelo de infección se encontró sobreexpresión de los transcritos evaluados.

La proteína DCX es una de las proteínas determinantes para regular la migración neuronal durante la neurogénesis; su expresión en el ratón es transitoria durante las primeras etapas del desarrollo, llegando a sus niveles más altos durante el día embrionario 14 (E14) (172) pero su expresión comienza a disminuir progresivamente desde el E15 hasta el día postnatal (P1) y se encuentra casi ausente en el cerebro adulto (P60) (173). Gleeson y colaboradores demostraron marcación fuerte de DCX en la corteza cerebral en desarrollo, la eminencia ganglionar lateral, el tálamo, el mesencéfalo, el rombencéfalo, el cerebelo, la médula espinal y la retina en el ratón en desarrollo en el estadio E14,5 (136); resultados que llaman la atención por que coinciden con las mismas zonas en donde encontramos marcación positiva para ARN de replicación y antígeno viral de ZIKV.

En este estudio encontramos aumento en la expresión de DCX (figura 7A) pero nuestros resultados difieren de los obtenidos en otros modelos de estudio como cultivos de células madre y en embriones de ratón (E16,5-E18,5) en donde se reporta disminución en la expresión de los transcritos y de la proteína; diferencias que podrían ser atribuidas al estadio embrionario evaluado. Sin embargo, cabe resaltar que la proteína DCX participa en la organización y estabilización de los microtúbulos, por lo cual, su sobreexpresión podría conllevar a una mayor estabilidad de los mismos, siendo esta una estrategia de mayor eficacia para la diseminación del ZIKV (174).

En el presente estudio también se encontró aumento en la expresión del marcador CEP-152 (figura 7B). Este es uno de los genes asociados a la microcefalia congénita (MCPH) y uno de los marcadores que codifican para las proteínas centrosomales. Es importante recordar que los centrosomas son cruciales en la organización de los microtúbulos, esenciales en la estabilidad celular y se conforman por centriolos que ayudan a formar el huso mitótico. Se ha demostrado que la sobreexpresión de CEP-152 está involucrada en la creación de nuevos centriolos y en la duplicación centrosomal en embriones y cultivos de *Drosophila*, al igual que en células humanas (175), pero el aumento en el número de centriolos podría llevar a malformaciones o cambios en la ubicación espacial del huso mitótico.

En estudios en ratón se ha reportado que el mal posicionamiento del huso mitótico da como resultado el agotamiento de las células progenitoras neurales (176, 177), una condición que contribuye a la aparición de microcefalia, dado que el aumento experimental de la cantidad de centriolos en el cerebro de ratón da origen al ensamblaje de husos multipolares y con ello a la formación de células hijas aneuploides que sufren apoptosis (178).

Otro marcador que presentó un aumento significativo en la expresión en los embriones infectados es el TBR2 (figura 7C). La sobreexpresión de este gen disminuye la expresión de SOX2 (179), el cual, regula la diferenciación neuronal durante el desarrollo embrionario. La inhibición del marcador SOX2 conlleva a la terminación del ciclo celular causando la pérdida de progenitores gliales o neurales, una condición que contribuye al agotamiento y la diferenciación neural temprana (180). Se ha encontrado que la inactivación de TBR2 provoca bloqueos en el desarrollo (181, 182) y se ha comprobado a nivel experimental que la infección con ZIKV reduce significativamente la expresión de este gen en las NPC (127), sin embargo, el aumento de TBR2 podría jugar un papel relevante en las malformaciones asociadas al ZIKV porque la diferenciación prematura de las NPC es otro factor que puede contribuir a la microcefalia congénita (183, 184).

TBR2 es expresado específicamente por los progenitores intermedios (IP) que dan origen a las neuronas piramidales excitatorias de la corteza cerebral durante la neurogénesis (185). Se ha demostrado que el proceso de neurogénesis laminar de los IP está regulado por TBR2 mediante la diferenciación de las neuronas de la capa inferior y superior según la fase del neurodesarrollo evaluada, por ejemplo, en el estadio E12,5 la inactivación de TBR2 induce a la neurogénesis mientras que su activación en el E14,5 y 16,5 reduce la misma, causando una diferenciación neuronal temprana que a su vez genera el agotamiento de los progenitores intermedios. Este evento podría resultar en disminución en el grosor de las capas corticales (185).

Otro marcador que presentó un aumento significativo en la expresión durante la infección por ZIKV en el modelo prenatal de ratón es Reelina (figura 7D). Como se ha mencionado anteriormente, este gen resulta crucial para la migración neuronal durante el neurodesarrollo, coordinando la migración tangencial en el mesencéfalo y la médula espinal y radial en el rombencéfalo (186). Al igual que DCX la expresión de Reelina se ha reportado en regiones donde evidenciamos una amplia marcación de antígeno viral. Es posible que el ZIKV además de infectar las células migratorias también las use como medio de transporte y que de esta manera pueda afectar distintas regiones cerebrales.

El marcador GFAP no presentó cambios significativos en la expresión entre controles e infectados pero sí una tendencia a la baja en los embriones de ratón de madres inoculadas con ZIKV (figura 7E). Es probable que no se haya encontrado cambios en la expresión de GFAP para el estadio evaluado porque en esta etapa se da inicio a la gliogénesis por lo que el número de células gliales infectadas pueda ser muy bajo (24). Estos resultados contrastan

con los obtenidos por Alpuche-Lazcano y colaboradores quienes evidenciaron aumento de ARNm de GFAP en cultivos primarios de embriones de ratón infectados con ZIKV, cultivos de astrocitos y ratones, en el estadio postnatal P0 (187-189). Cabe resaltar que el SNC responde a las lesiones o daños alterando la morfología de los astrocitos con un aumento en el número de células que expresan GFAP. Estos resultados también han sido reportados en biopsias de cerebros humanos postmortem infectados con el ZIKV(188).

Nestina es un marcador de neurodesarrollo expresado en células progenitoras neurales y ha sido implementado en diversos modelos de infección con el ZIKV para demostrar el neurotropismo que presenta este virus hacia las neuronas inmaduras (127, 190). En nuestros resultados de expresión observamos una leve tendencia a la alta en los embriones infectados sin presentar un cambio significativo en comparación con los controles (figura 7F). Sin embargo, Lossia y colaboradores, evidenciaron un aumento significativo en la expresión de este marcador en cultivos primarios de células neurales obtenidas de embriones de ratón en el estadio E14,5 e infectadas con el ZIKV (191).

El marcador MCPH1 presentó una tendencia de expresión a la alta en los encéfalos de los embriones infectados pero sin cambios significativos (figura 7G). Al igual que CEP-152 MCPH1 es uno de los genes asociados a la microcefalia congénita. La expresión de MCPH1 está regulada por Musashi-1 (MSI1), una proteína que interactúa con las regiones no codificantes del ZIKV para aumentar la replicación viral (16). Los cambios en la expresión de MCPH1 resultan de gran interés porque sus modificaciones generan desbalances en la condensación cromosómica e inducen que este evento ocurra de manera prematura, otra característica que podría contribuir a la generación de microcefalia en humanos (192, 193). MCPH1 se expresa en las mitocondrias o cerca de la membrana externa y afecta directamente las funciones mitocondriales al interferir con las vías bioenergéticas, alterando así la proliferación y supervivencia de los progenitores neuronales (137).

La expresión de MCPH1 aumenta durante las primeras etapas del neurodesarrollo antes de la semana 16 en humano, posterior a la concepción y su expresión está involucrada en la división de células radiales gliales (RGC) (137). Se ha demostrado que el gen MCPH1 promueve la división simétrica de células progenitoras neuronales, mediante la vía de señalización Chk1/CDC25B, la cual es necesaria para regular la división de los progenitores y de esta manera regular el tamaño normal del cerebro (194). En estudios realizados en cultivos primarios de ratones E12,5, la inactivación de MCPH1 generó aumento de muerte de células progenitoras neurales y disminución significativa en la expresión de *Cdk1* y *Chek1*.(137, 194).

De acuerdo con estos resultados de expresión diferencial, la infección por el ZIKV en estadios embrionarios tempranos conlleva a la alteración en la expresión de varios marcadores cruciales para el desarrollo. Estas alteraciones pueden estar asociadas directamente al cambio en la estabilidad celular o de estructuras celulares como los

microtúbulos y centriolos cuya estabilidad está regulada por genes como DCX y CEP-152. Por otro lado, la sobreexpresión encontrada en los marcadores analizados podría estar involucrada en la alteración de otras proteínas que regulan el correcto funcionamiento de los procesos celulares aumentando con ello la posibilidad de generar malformaciones.

Los cambios en los marcadores evaluados podrían indicar modificaciones en los tipos celulares en los que se expresan o que los marcadores puedan ser utilizados como receptores de entrada viral tal y como se pretendió comprobar en los ensayos de acoplamiento molecular presentados más adelante. Aquí el virus podría promover la sobreexpresión o subregulación en pro de incrementar su tasa de replicación. Por ejemplo, la expresión del receptor tirosina kinasa AXL inhibe la expresión del interferón tipo 1, condición que podría favorecer la entrada de distintos flavivirus que usan AXL como blanco de infección viral, como es el caso del virus del dengue y del ZIKV. (195).

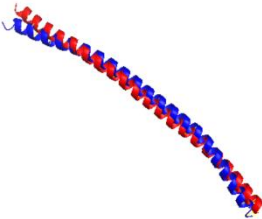
### 6.3 Interacción de proteínas virales y marcadores de neurodesarrollo (objetivo 3)

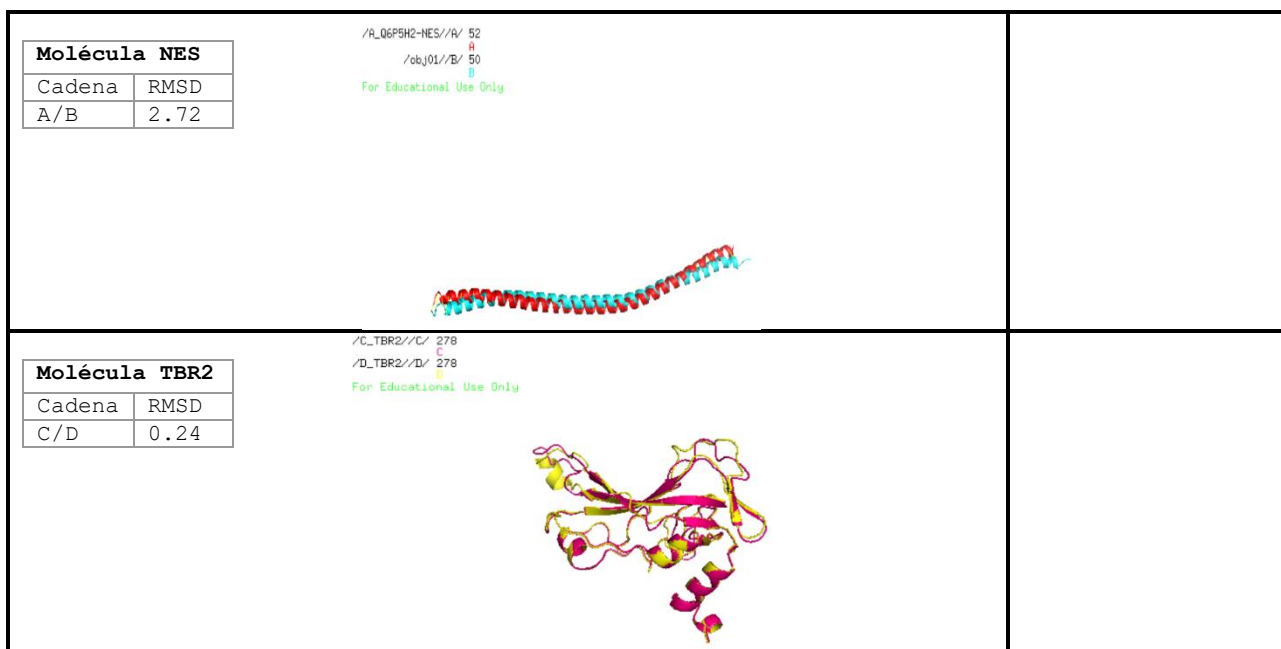
Previo a los estudios de acoplamiento molecular se realizaron alineamientos lineales y tridimensionales para determinar el grado de homología entre las cadenas de las proteínas GFAP, NES y TBR2 (tabla 8). En todos los alineamientos lineales se encontró un porcentaje de similitud del 100% y en los alineamientos tridimensionales se hallaron valores de RMSD (distancia media cuadrática) (2.23 para GFAP, 2.13 para NES y 0.24 para TBR2). De acuerdo con los resultados obtenidos en los estudios de interacción molecular (tabla 9 y figura 8), sólo la proteína no estructural NS4A del ZIKV presentó interacciones con cuatro de las proteínas (MCPH1, RELN, DCX y TBR2) además de la proteína AXL. Esta última proteína se usó como control positivo de interacción con proteínas del ZIKV (tabla 9) porque se ha demostrado que el virus utiliza la molécula de AXL como blanco de unión viral (196). Además, se ha demostrado que esta proteína se expresa durante la neurogénesis con mayor expresión en los bordes del ventrículo lateral y en la zona subventricular externa, lo cual a la vez concuerda con las zonas de mayor tropismo del ZIKV (197).

En cada análisis de acoplamiento se encontraron diferentes grupos o clusters de las mejores interacciones, las cuales fueron reportadas por el programa como mejores posiciones. Para cada cluster siempre se seleccionó la posición uno la cual correspondía al valor más negativo de energía libre de Gibbs (HADDOCK score y Z-score) (tabla 9, figura 8 y anexo 5)

El acoplamiento que realiza HADDOCK consta de tres etapas: 1. Aleatorización de orientaciones y minimización de la energía del cuerpo rígido (EM) sin aguas, 2. Simulación semirrígida en el espacio del ángulo de torsión (TAD-SA) con aguas y 3. Refinamiento final en el espacio cartesiano con solvente explícito. Una vez terminada la simulación de acoplamiento el software presentó distintas estructuras de interacción proteína-proteína en diferentes clusters de entre aproximadamente 200 interacciones más probables, ubicando la estructura con la suma ponderada más negativa en el primer lugar. Las estructuras con la energía intramolecular más baja (HADDOCK y Z-score más negativo) son aquellas que presentan una interacción más espontánea con más afinidad y por lo tanto, las interacciones que poseen mayor probabilidad de ocurrir en un ensayo experimental.

**Tabla 8.** Resultado prueba de similitud entre cadenas de las moléculas GFAP, NES y TBR2

<b>Alineamiento lineal</b>								
<b>Molécula GFAP</b>		<b>Porcentaje de similitud</b>						
GFAP _B CDLESLRGTNESLERQMREQEERHARESASYQEALARLEEEGQSLKEEMARHLQEYQDLL 60	GFAP _A CDLESLRGTNESLERQMREQEERHARESASYQEALARLEEEGQSLKEEMARHLQEYQDLL 60	100%						
*****								
GFAP _B NVKLALDIEIATYRKLEGG 79	GFAP _A NVKLALDIEIATYRKLEGG 79							
*****								
<b>Molécula NES</b>								
NES_A --WRARADDELAALRVLVDQRWREKHEAEVQRDNLAEELESVAGRCQQVRLARERTIEEA 58	NES_B ASWRARADDELAALRVLVDQRWREKHEAEVQRDNLAEELESVAGRCQQVRLARERTIEEA 60	100%						
*****								
NES_A ACSRRALEAEKNARGWLSTQAAELEERELEALRASHEEERAHNAQA 104	NES_B ACSRRALEAEKNARGWLSTQAAELEERELEALRASHEEERAHNAQA 106							
*****								
<b>Molécula TBR2</b>								
TBR2-C LWLKFHRHQTEMIITKQGRMFPPFLSFNINGLNPTAHYNVFEVVLADPNHWRFGGKWW 60	TBR2-D LWLKFHRHQTEMIITKQGRMFPPFLSFNINGLNPTAHYNVFEVVLADPNHWRFGGKWW 60	100%						
*****								
TBR2-C TCGKADNNMQGNKMYVHPESPNTGSHWMRQEISFGKLLTNNKGANNNTQMIVLQSLHK 120	TBR2-D TCGKADNNMQGNKMYVHPESPNTGSHWMRQEISFGKLLTNNKGANNNTQMIVLQSLHK 120							
*****								
TBR2-C YQPRLHIVEVTEDGVEDLNEPSKTQTFSTQFIAVTAYQNTDITQLKIDHNPFAGFR 180	TBR2-D YQPRLHIVEVTEDGVEDLNEPSKTQTFSTQFIAVTAYQNTDITQLKIDHNPFAGFR 180							
*****								
TBR2-C D 181	TBR2-D D 181							
*								
<b>Alineamiento en 3D</b>								
<table border="1" style="display: inline-table; margin-right: 20px;"> <tr> <th colspan="2" style="text-align: left;"><b>Molécula GFAP</b></th> </tr> <tr> <td style="width: 50%;">Cadena</td> <td style="width: 50%;">RMSD</td> </tr> <tr> <td>A/B</td> <td>2.13</td> </tr> </table> <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="font-size: 8px; margin-right: 10px;">                 /GFAP_A/A/ 291                  /GFAP_B/B/ 291                  For Educational Use Only             </div>  </div>		<b>Molécula GFAP</b>		Cadena	RMSD	A/B	2.13	
<b>Molécula GFAP</b>								
Cadena	RMSD							
A/B	2.13							

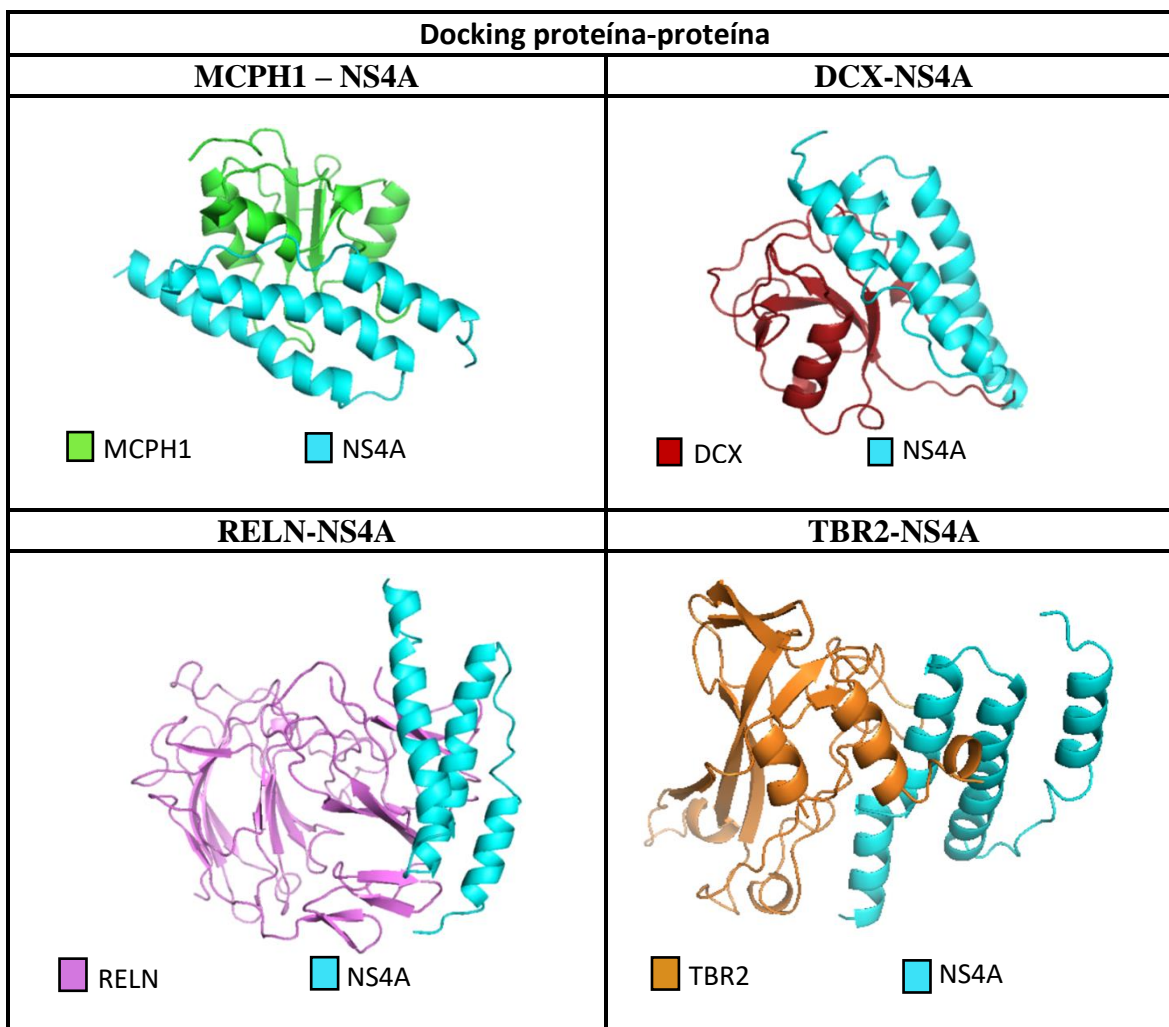


**Nota.** El valor RMSD es utilizado para estudiar el grado de divergencia de las estructuras alineadas. A mayor valor RMSD mayores son las diferencias.

**Tabla 9.** Resultados obtenidos en la simulación de interacción entre la proteína no estructural NS4A del ZIKV y las moléculas de las proteínas del neurodesarrollo.

Interacción proteína-proteína		Posiciones estructurales	Clusters	HADDOCK score	Z-score	RMSD
NS4A	AXL	390	13	-74.8 +/- 1.3*	-2.0	0,4 +/- 4.7
	CEP-152	380	19	75.7 +/-12.8	-1.9	1.2 +/- 0.8
	DCX	368	15	-54.1 +/- 9.5 *	-2.5	0.5 +/- 0.3
	GFAP	394	11	27.0 +/- 8.5	-2.1	0.7 +/- 0.4
	MCPH1	378	18	-70 +/- 4.6*	-2.2	0.6 +/- 0.4
	NES	390	12	186 +/- 1.8	-2.0	1.1 +/- 0.8
	Reln	385	21	-54.5 +/- 7.4*	-1.9	0.5 +/- 0.3
	Tbr2	388	16	-37.1 +/- 1.0*	-1.6	5.3 +/- 0.1
NS5	AXL	385	18	7.8 +/- 6.7	-1.9	2.8 +/- 0.1
	CEP-152	395	7	219.1 +/- 2.6	-1.3	1.1 +/- 0.8
	DCX	282	26	58.6 +/- 10.0	-1.7	7.1 +/- 0.0
	GFAP	343	19	131.0 +/- 25.7	-2.1	0.6 +/- 0.5
	MCPH1	270	23	46.8 +/- 9.0	-2.0	0.4 +/- 0.2
	NES	389	12	229.0 +/- 8.1	-1.6	3.0 +/- 0.1
	Reln	304	16	95.2 +/- 28.4	-2.1	1.2 +/- 0.8
	Tbr2	390	6	31.0 +/- 5.4	-1.5	10.2 +/- 0.1

\*Moléculas con posible interacción proteína-proteína.



**Figura 8.** Visualización de las interacciones de las proteínas del neurodesarrollo evaluadas con la proteína no estructural NS4A del ZIKV.

Como se encontraron energías de interacción favorables para MCPH1, RELN, DCX y TBR2 con NS4A del ZIKV se procedió a la evaluación en detalle de las interacciones intermoleculares existentes tales como enlaces iónicos, interacciones hidrofóbicas y enlaces de hidrogeno. El resumen de las interacciones se encuentra en la tabla 10 y en mayor detalle en los anexos 6, 7 y 8.

**Tabla 10.** Resumen de las interacciones presentes entre las proteínas del neurodesarrollo y la proteína no estructural NS4A del ZIKV.

Molécula	Hidrofóbicas	Iónicas	Puente de hidrógeno
MCPH1	23	4	1
DCX	19	3	5
RELN	28	4	3
TBR2	15	-	2
AXL	9	13	3

Entre las interacciones analizadas se encontró una interacción más favorable con el receptor AXL, previamente postulado en la literatura como blanco de unión viral y con valores muy cercanos a las energías de interacción se encontraron las otras interacciones simuladas con MCPH1, DCX y RELN (tabla 9). Una posible explicación se debe a que estos acoplamientos presentaron un mayor número de puentes de hidrógeno e interacciones iónicas como se observó con el receptor AXL otorgándole a las moléculas analizadas un mayor grado en la fuerza de unión porque se ha demostrado que los enlaces de hidrogeno están involucrados con el plegamiento de las proteínas y a un mayor número de este tipo de enlaces las moléculas presentan mayor estabilidad (198). Sin embargo, los enlaces de hidrogeno son débiles en comparación con los enlaces iónicos, estos enlaces, se conforman por la unión de aminoácidos con cargas eléctricas opuestas y son necesarios para mantener la estabilidad y estructura de la proteína (199).

Al observar con mayor detalle los resultados de interacción molecular, es posible notar que las cuatro proteínas que presentaron interacción con la proteína de replicación NS4A del ZIKV no comparten el mismo número o tipo de enlaces. Al comparar los resultados de acoplamiento molecular de AXL con los acoplamientos obtenidos para las proteínas del neurodesarrollo, observamos que este receptor presentó un mayor número de enlaces iónicos principalmente con (ARG y LYS) en comparación a los obtenidos de las interacciones con las proteínas del neurodesarrollo evaluadas, sin embargo, el número de enlaces de hidrogeno resultó similar con un promedio de 3. Esta afirmación se soporta con los resultados obtenidos con TBR2 en donde se encontró un mayor número de enlace de hidrógeno respecto a MCPH1 pero con un valor de energía libre menor. Probablemente esto se presentó debido al mayor número de interacciones iónicas que resultaron de la interacción entre este marcador y NS4A. Por lo anterior, aunque la presencia de ambos tipos de enlaces parece ser importante para las interacciones moleculares con la proteína de replicación NS4A del ZIKV, el aumento de enlaces iónicos parece ser crucial en mejorar la interacción intermolecular.

A nivel experimental se han realizado escasos ensayos de asociación entre la presencia de proteínas de replicación NS4A y NS5 del ZIKV y los cambios en la expresión en las proteínas del neurodesarrollo. Aquí se ha llegado a la conclusión de que las proteínas NS4A y NS5 del ZIKV reducen la expresión de DCX en las NPC a nivel proteico y del ARNm, llegando a disminuir la expresión de DCX aproximadamente en un 25% en el cerebro fetal. Esta disminución afecta directamente la migración neuronal durante el neurodesarrollo, impactando así el desarrollo normal de la estructura de la corteza, al reducir el grosor de las capas corticales de los cerebros infectados (19), además, se ha encontrado que cultivos de NPC transducidos con NS4A y NS5 del ZIKV disminuyen la expresión de DCX (200), hasta en un 70% en el 4 día post infección (dpi) (19).

A pesar que no comprobamos algún tipo de interacción entre la proteína NS5 del ZIKV y los marcadores de neurodesarrollo evaluados, cabe resaltar que la proteína NS5 juega un papel

importante en la replicación del virus y esta a su vez reduce la señalización del interferón tipo I mediante la unión con STAT2 humano (18), bloqueando con ello la señal de interferón tipo 1.

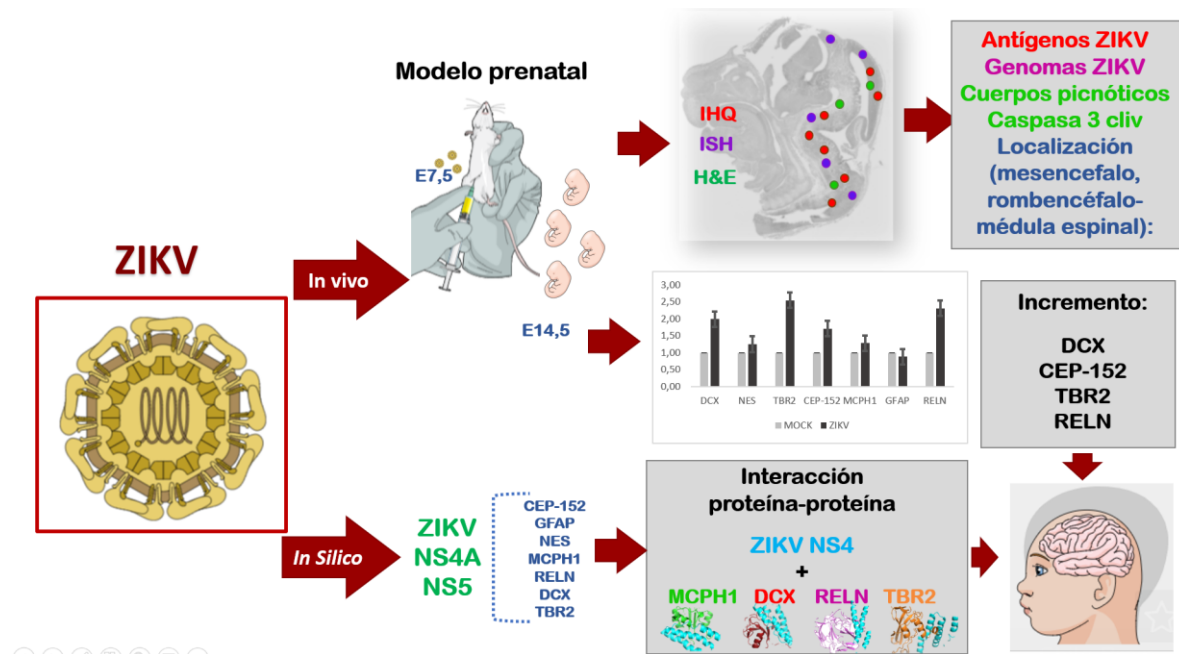
A partir de los resultados obtenidos, se llevó a cabo un análisis de correlación entre las proteínas que presentaron interacción molecular y sus respectivos resultados de expresión (tabla 11), esto con el fin de determinar si la interacción con las proteínas de replicación del virus puede estar relacionada con los niveles de expresión de los marcadores del neurodesarrollo, al tener un número de datos pequeño se optó por una prueba estadística no paramétrica que permitiera correlacionar los datos sin tener en cuenta el orden de los mismos como sucede con otros coeficientes de correlación tales como el coeficiente de Spearman.

**Tabla 11.** Análisis de correlación entre los marcadores que presentaron interacción molecular con las proteínas de replicación y los valores de expresión.

<b>Análisis de correlación de Kendall</b>		
	Valor de interacción	Valor de expresión
Valor de interacción		0,6667
		(4)
		0,1742
Valor de expresión	0,6667	
Tamaño de la muestra	(4)	
Valor -P	0,1742	

De acuerdo con nuestros resultados, podemos decir que existe una tendencia de correlación entre los valores de interacción con los valores de expresión de los marcadores, pero estos resultados no son significativos, por lo tanto, no es posible afirmar que la expresión de los marcadores de neurodesarrollo evaluados pueda ser alterado por la interacción con las proteínas de replicación del ZIKV.

El resumen de los hallazgos histológicos y moleculares de este estudio se describen en la figura 9.



## 7 Conclusiones

Finalmente, con la elaboración de este trabajo se logró dar respuesta a las siguientes preguntas que surgieron durante la elaboración de la escritura del mismo:

- ¿Puede el ZIKV afectar la expresión de genes involucrados en el desarrollo de la corteza cerebral y cerebelar en modelos de rata o ratón infectados durante la etapa prenatal?

Los resultados de expresión diferencial obtenidos en encéfalos de embriones Balb/c E14,5 a partir de madres inoculadas con ZIKV por la vía intraperitoneal, indicaron que este flavivirus alteró la expresión de los marcadores de neurodesarrollo DCX, CEP-152, RELN y TBR2 evaluados en este estudio. Estos genes están involucrados en procesos de corticogénesis y cerebelogénesis, por lo tanto, los cambios en su expresión podrían estar asociados a malformaciones encefálicas tales como la microcefalia reportada durante la infección por ZIKV.

- ¿Las proteínas codificadas por los genes evaluados podrían tener algún tipo de interacción con proteínas asociadas a la replicación viral y dicha interacción podría influir en el patrón de expresión de estos genes?

Al comparar nuestros resultados de expresión diferencial con los obtenidos a partir de la interacción molecular, observamos que las proteínas DCX, RELN y TBR2 presentaron aumento significativo en la expresión e interacciones favorables con la proteína de replicación NS4A del ZIKV. El marcador CEP-152 presentó un aumento en su expresión pero ningún tipo de interacción con la proteína de replicación NS4A, mientras que, MCPH1 mostró una interacción favorable pero el grado de expresión no cambió de manera significativa entre controles e infectados.

En la mayoría de moléculas evaluadas se observó que aquellas que presentaron cambios en la expresión coincidieron en su mayoría con aquellas que mostraron interacciones con la proteína NS4A excepto para MCPH1 en donde se observó una tendencia en la expresión a la alta en el grupo de infectados pero sin cambios significativos, por ello, es posible considerar que el virus aumenta la expresión de algunos marcadores del neurodesarrollo para favorecer su interacción con las proteínas de replicación viral como sucede con la proteína NS4A del ZIKV.

- ¿Las alteraciones morfológicas observadas en un modelo de infección por Zika se encuentran asociadas a la cantidad de antígeno o ARN viral o son el resultado de un efecto indirecto del virus sobre el encéfalo de los embriones infectados?

En los resultados obtenidos de IHQ e ISH observamos que las regiones con más antígeno y ARN de replicación del ZIKV fueron el rombencéfalo y médula espinal, regiones donde también encontramos un mayor número de alteraciones asociadas a procesos morfológicos

relacionados a procesos de degeneración celular y en las que además se han reportado alteraciones morfológicas en modelos de infección por ZIKV (161-163).

Con las respuestas a las preguntas de investigación, se dio cumplimiento a cada uno de los objetivos planteados concluyéndose que el virus zika genera alteraciones morfológicas como la aparición de núcleos picnóticos altamente asociadas a la presencia y replicación viral del mismo. Por otro lado, en este trabajo se reportó por primera vez cambios en la expresión de marcadores del neurodesarrollo cortical y cerebelar asociados a la infección por el ZIKV como MCPH1, CEP-152, RELN, TBR2; marcadores previamente asociados a otras formas de microcefalia. Además, es posible considerar que el virus zika puede aumentar la expresión de los marcadores evaluados, como parte de la estrategia utilizada para fomentar su diseminación.

Por otro lado, este estudio es el primer reporte en donde se evidencia interacción molecular entre las proteínas del neurodesarrollo MCPH1, DCX, RELN y TBR2 con la proteína de replicación viral NS4A. Estos resultados postulan a los genes evaluados como posibles blancos de unión al ZIKV y permiten plantear futuros mecanismos de infección por el ZIKV.

## **8 Perspectivas futuras**

Evaluar la dinámica de interacción entre los marcadores de neurodesarrollo DCX, MCPH1, RELN y TBR2 y la proteína de replicación NS4A del ZIKV.

Evaluar experimentalmente las interacciones que presentaron resultados favorables en los ensayos de docking molecular mediante ensayos de co-precipitación o proximidad del ligamiento.

## 9 Referencias

1. Ludlow M, Kortekaas J, Herden C, Hoffmann B, Tappe D, Trebst C, et al. Neurotropic virus infections as the cause of immediate and delayed neuropathology. *Acta Neuropathol.* 2016;131:159-84.
2. Lewis MH. Environmental complexity and central nervous system development and function. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2004;10(2):91-5.
3. Koch C, Laurent G. Complexity and the Nervous System. 1999.
4. van den Pol AN, Mao G, Yang Y, Ornaghi S, Davis JN. Zika Virus Targeting in the Developing Brain. *J Neurosci.* 2017;37(8):2161-75.
5. Szaba FM, Tighe M, Kummer LW, Lanzer KG, Ward JM, Lanthier P, et al. Zika virus infection in immunocompetent pregnant mice causes fetal damage and placental pathology in the absence of fetal infection. *PLoS Pathog.* 2018;14(4).
6. Heymann DL, Hodgson A, Sall AA, Freedman DO, Staples JE, Althabe F, et al. Zika virus and microcephaly: why is this situation a PHEIC? *Lancet.* 2016;387(10020):719-21.
7. Musso D, Gubler DJ. Zika Virus. *Clin Microbiol Rev.* 2016. p. 487-524.
8. Martines RB, Bhatnagar J, Keating MK, Silva-Flannery L, Muehlenbachs A, Gary J, et al. Notes from the Field: Evidence of Zika Virus Infection in Brain and Placental Tissues from Two Congenitally Infected Newborns and Two Fetal Losses--Brazil, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2016;65(6):159-60.
9. Calvet G, Aguiar RS, Melo AS, Sampaio SA, de Filippis I, Fabri A, et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect Dis.* 2016.
10. Rubin EJ, Greene MF, Baden LR. Zika Virus and Microcephaly. *N Engl J Med.* 2016;374(10):984-5.
11. Tang H, Hammack C, Ogden SC, Wen Z, Qian X, Li Y, et al. Zika Virus Infects Human Cortical Neural Precursors and Attenuates Their Growth. *Cell Stem Cell.* 2016;18(5):587-90.
12. Oliveira Melo AS, Malinger G, Ximenes R, Szejnfeld PO, Alves Sampaio S, Bispo de Filippis AM. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2016;47(1):6-7.
13. Mlakar J, Korva M, Tul N, Popovic M, Poljsak-Prijatelj M, Mraz J, et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. *N Engl J Med.* 2016;374(10):951-8.
14. Cao B, Parnell LA, Diamond MS, Mysorekar IU. Inhibition of autophagy limits vertical transmission of Zika virus in pregnant mice. *J Exp Med.* 2017;214(8):2303-13.
15. Cugola FR, Fernandes IR, Russo FB, Freitas BC, Dias JLM, Guimarães KP, et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature.* 2016;534(7606):267.
16. Chavali PL, Stojic L, Meredith LW, Joseph N, Nahorski MS, Sanford TJ, et al. Neurodevelopmental protein Musashi-1 interacts with the Zika genome and promotes viral replication. *Science.* 2017;357(6346):83-8.
17. Hou S, Kumar A, Xu Z, Airo AM, Stryapunina I, Wong CP, et al. Zika Virus Hijacks Stress Granule Proteins and Modulates the Host Stress Response. *J Virol.* 2017;91(16).
18. Grant A, Ponia SS, Tripathi S, Balasubramaniam V, Miorin L, Sourisseau M, et al. Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling. *Cell Host Microbe.* 2016;19(6):882-90.
19. Jiang X, Dong X, Li SH, Zhou YP, Rayner S, Xia HM, et al. Proteomic Analysis of Zika Virus Infected Primary Human Fetal Neural Progenitors Suggests a Role for Doublecortin in the Pathological Consequences of Infection in the Cortex. *Front Microbiol.* 2018;9.
20. Frantz GD, Weimann JM, Levin ME, McConnell SK. Otx1 and Otx2 define layers and regions in developing cerebral cortex and cerebellum. *J Neurosci.* 1994;14(10):5725-40.
21. Carletti B, Rossi F. Neurogenesis in the cerebellum. *Neuroscientist.* 2008;14(1):91-100.

22. Marín Padilla M. Desarrollo de la corteza cerebral humana. Teoría citoarquitectónica 1999. 208 p.
23. Lorente De No R. Cerebral cortex : architecture, intracortical connections, motor projections. *Physiology of the Nervous System*. 1938:288-313.
24. Martynoga B, Drechsel D, Guillemot F. Molecular Control of Neurogenesis: A View from the Mammalian Cerebral Cortex. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(10).
25. Silbereis J, Heintz T, Taylor MM, Ganat Y, Ment LR, Bordey A, et al. Astroglial cells in the external granular layer are precursors of cerebellar granule neurons in neonates. *Molecular and cellular neurosciences*. 2010;44(4):362-73.
26. Yamano T, Shimada M, Abe Y, Ohta S, Ohno M. Destruction of external granular layer and subsequent cerebellar abnormalities. *Acta Neuropathologica*. 1983;59(1):41-7.
27. Delgado-Esteban M, García-Higuera I, Maestre C, Moreno S, Almeida A. APC/C-Cdh1 coordinates neurogenesis and cortical size during development. *Nature Communications*. 2013;4(1):2879.
28. Jaeger AS, Murrieta RA, Goren LR, Crooks CM, Moriarty RV, Weiler AM, et al. Zika viruses of African and Asian lineages cause fetal harm in a mouse model of vertical transmission. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(4).
29. Winkler CW, Peterson KE. Using immunocompromised mice to identify mechanisms of Zika virus transmission and pathogenesis. *Immunology*. 2018;153(4):443-54.
30. Shan C, Xie X, Luo H, Muruato AE, Liu Y, Wakamiya M, et al. Maternal vaccination and protective immunity against Zika virus vertical transmission. *Nature Communications*. 2019;10(1):5677.
31. Jaeger AS, Murrieta RA, Goren LR, Crooks CM, Moriarty RV, Weiler AM, et al. Zika viruses of African and Asian lineages cause fetal harm in a mouse model of vertical transmission. *PLoS neglected tropical diseases* [Internet]. 2019 2019/04//; 13(4):[e0007343 p.]. Available from: <http://europepmc.org/abstract/MED/30995223> Available.
32. Yun SI, Lee YM. Japanese encephalitis: The virus and vaccines. *Hum Vaccin Immunother*. 2014;10(2):263-79.
33. Luo MH, Hannemann H, Kulkarni AS, Schwartz PH, O'Dowd JM, Fortunato EA. Human Cytomegalovirus Infection Causes Premature and Abnormal Differentiation of Human Neural Progenitor Cells. *J Virol*. 2010;84(7):3528-41.
34. Weaver SC, Costa F, Garcia-Blanco MA, Ko AI, Ribeiro GS, Saade G, et al. Zika Virus: History, Emergence, Biology, and Prospects for Control. *Antiviral Res*. 2016;130:69-80.
35. Grard G CM, Mombo IM, Nkoghe D, Mboui Ondo S, Jiolle D. Zika Virus in Gabon (Central Africa) – 2007: A New Threat from *Aedes albopictus*? *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2014;8(2).
36. Duffy MR, Chen T-H, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. <http://dxdoiorg/101056/NEJMoa0805715>. 2009.
37. Cao-Lormeau VM, Blake A, Mons S, Lastere S, Roche C, Vanhomwegen J, et al. Guillain-Barre Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet*. 2016;387(10027):1531-9.
38. Hennessey M, Fischer M, Staples JE. Zika Virus Spreads to New Areas - Region of the Americas, May 2015-January 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2016;65(3):55-8.
39. Alvis-Guzmán N, Zakzuk-Sierra J, Vargas-Moranth R, Alcocer-Olaciregui A, Parra-Padilla D. Dengue, Chikunguña and Zika in Colombia 2015-2016. 22. 2017.
40. Siddique R, Liu Y, Nabi G, Sajjad W, Xue M, Khan S. Zika Virus Potentiates the Development of Neurological Defects and Microcephaly: Challenges and Control Strategies. *Front Neurol*. 2019;10.
41. Neufeldt CJ, Cortese M, Acosta EG, Bartenschlager R. Rewiring cellular networks by members of the. *Nature Reviews Microbiology*. 2018;16(3):125.

42. Scaturro P, Stukalov A, Haas DA, Cortese M, Draganova K, Płaszczycza A, et al. An orthogonal proteomic survey uncovers novel Zika virus host factors. *Nature*. 2018;561(7722):253.
43. Ledermann JP, Guillaumot L, Yug L, Saweyog SC, Tided M, Machieng P, et al. *Aedes hensilli* as a potential vector of Chikungunya and Zika viruses. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(10):e3188.
44. S. Ios H-PM, I. Leparc Goffart, V. Gauthier, T. Cardoso, M. Herida. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Infections par le virus Zika et épidémies récentes. Médecine et Maladies Infectieuses*. 2014;44(7):302-7.
45. Besnard M, Lastere S, Teissier A, Cao-Lormeau V, Musso D. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Euro Surveill*. 2014;19(13).
46. Hills SL, Russell K, Hennessey M, Williams C, Oster AM, Fischer M, et al. Transmission of Zika Virus Through Sexual Contact with Travelers to Areas of Ongoing Transmission - Continental United States, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2016;65(8):215-6.
47. Barjas-Castro ML, Angerami RN, Cunha MS, Suzuki A, Nogueira JS, Rocco IM, et al. Probable transfusion-transmitted Zika virus in Brazil. *Transfusion*. 2016;56(7):1684-8.
48. Musso D, Roche C, Robin E, Nhan T, Teissier A, Cao-Lormeau VM. Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(2):359-61.
49. Barzon L, Pacenti M, Berto A, Sinigaglia A, Franchin E, Lavezzo E, et al. Isolation of infectious Zika virus from saliva and prolonged viral RNA shedding in a traveller returning from the Dominican Republic to Italy, January 2016. *Euro Surveill*. 2016;21(10):30159.
50. Dupont-Rouzeyrol M, mdupont@pasteur.nc, Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie RIidP, Noumea Cedex, New Caledonia, Biron A, Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie RIidP, Noumea Cedex, New Caledonia, O'Connor O, et al. Infectious Zika viral particles in breastmilk. *The Lancet*. 2016;387(10023):1051.
51. Bayer A, Lennemann NJ, Ouyang Y, Bramley JC, Morosky S, De Azeved Marques ET, et al. Type III Interferons Produced by Human Placental Trophoblasts Confer Protection Against Zika Virus Infection. *Cell Host Microbe*. 2016;19(5):705-12.
52. Zammarchi L, Spinicci M, Bartoloni A. Zika Virus: a Review from the Virus Basics to Proposed Management Strategies. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*. 2016;8(1):e2016056-e.
53. Nicastrì E, Castilletti C, Liuzzi G, Iannetta M, Capobianchi MR, Ippolito G. Persistent detection of Zika virus RNA in semen for six months after symptom onset in a traveller returning from Haiti to Italy, February 2016. *Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2016;21(32):30314.
54. Paniz-Mondolfi AE, Rodriguez-Morales AJ, Blohm G, Marquez M, Villamil-Gomez WE. ChikDenMaZika Syndrome: the challenge of diagnosing arboviral infections in the midst of concurrent epidemics. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2016;15.
55. Gilmore EC, Walsh CA. Genetic Causes of Microcephaly and Lessons for Neuronal Development. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2013;2(4):461-78.
56. Jackson AP, Eastwood H, Bell SM, Adu J, Toomes C, Carr IM, et al. Identification of microcephalin, a protein implicated in determining the size of the human brain. *Am J Hum Genet*. 2002;71(1):136-42.
57. Bond J, Roberts E, Mochida GH, Hampshire DJ, Scott S, Askham JM, et al. ASPM is a major determinant of cerebral cortical size. *Nat Genet*. 2002;32(2):316-20.
58. Bond J, Roberts E, Springell K, Lizarraga SB, Scott S, Higgins J, et al. A centrosomal mechanism involving CDK5RAP2 and CENPJ controls brain size. *Nat Genet*. 2005;37(4):353-5.
59. Kumar A, Girimaji SC, Duvvari MR, Blanton SH. Mutations in STIL, encoding a pericentriolar and centrosomal protein, cause primary microcephaly. *Am J Hum Genet*. 2009;84(2):286-90.
60. Bilguvar K, Ozturk AK, Louvi A, Kwan KY, Choi M, Tatli B, et al. Whole-exome sequencing identifies recessive WDR62 mutations in severe brain malformations. *Nature*. 2010;467(7312):207-10.

61. Sir JH, Barr AR, Nicholas AK, Carvalho OP, Khurshid M, Sossick A, et al. A primary microcephaly protein complex forms a ring around parental centrioles. *Nat Genet.* 2011;43(11):1147-53.
62. Coronell-Rodríguez W, Arteta-Acosta C, Suárez-Fuentes MA, Burgos-Rolon MC, Rubio-Sotomayor MT, Sarmiento-Gutiérrez M, et al. Infección por virus del Zika en el embarazo, impacto fetal y neonatal. *Rev chil infectol.* 2016;33(6):665-73.
63. Miner JJ, Cao B, Govero J, Smith AM, Fernandez E, Cabrera OH, et al. Zika virus infection during pregnancy in mice causes placental damage and fetal demise. *Cell.* 2016;165(5):1081-91.
64. Silasi M, Cardenas I, Racicot K, Kwon JY, Aldo P, Mor G. VIRAL INFECTIONS DURING PREGNANCY. *Am J Reprod Immunol.* 2015;73(3):199-213.
65. Kwon JY, Romero R, Mor G. New insights into the relationship between viral infection and pregnancy complications. *Am J Reprod Immunol.* 2014;71(5):387-90.
66. Sarno M, Sacramento GA, Khouri R, do Rosario MS, Costa F, Archanjo G, et al. Zika Virus Infection and Stillbirths: A Case of Hydrops Fetalis, Hydranencephaly and Fetal Demise. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(2):e0004517.
67. Schuler-Faccini L, Ribeiro EM, Feitosa IM, Horovitz DD, Cavalcanti DP, Pessoa A, et al. Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly - Brazil, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2016;65(3):59-62.
68. Johansson MA, Mier-y-Teran-Romero L, Reefhuis J, Gilboa SM, Hills SL. Zika and the Risk of Microcephaly. *N Engl J Med.* 2016;375(1):1-4.
69. Oliveira WKd, Cortez-Escalante J, Oliveira WTGHD, Carmo GMId, Henriques CMP, Coelho GE, et al. Increase in Reported Prevalence of Microcephaly in Infants Born to Women Living in Areas with Confirmed Zika Virus Transmission During the First Trimester of Pregnancy — Brazil, 2015 | *MMWR. MMWR Morb Mortal Wkly Rep;* 2016 2019-04-08T03:25:01Z/.
70. Bierne H, Travier L, Mahlaköiv T, Tailleux L, Subtil A, Lebreton A, et al. Activation of Type III Interferon Genes by Pathogenic Bacteria in Infected Epithelial Cells and Mouse Placenta. *PLoS One.* 2012;7(6).
71. Götz M, Huttner WB. The cell biology of neurogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2005;6(10):777-88.
72. Agirman G, Broix L, Nguyen L. Cerebral cortex development: an outside-in perspective. *FEBS Letters.* 2017;591(24):3978-92.
73. Ming G, Song H. Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. *Neuron.* 2011;70(4):687-702.
74. Mirzaa GM, RiviÈRe J-B, Dobyns WB. Megalencephaly Syndromes and Activating Mutations in the PI3K-AKT Pathway: MPPH and MCAP. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics.* 2013;163(2):122-30.
75. Lee DY. Roles of mTOR Signaling in Brain Development. *Exp Neurobiol.* 2015;24(3):177-85.
76. Cloëtta D, Thomanetz V, Baranek C, Lustenberger RM, Lin S, Oliveri F, et al. Inactivation of mTORC1 in the Developing Brain Causes Microcephaly and Affects Gliogenesis. *J Neurosci.* 2013;33(18):7799-810.
77. Franke TF. PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene.* 2008;27(50):6473-88.
78. Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, Ekcharyawat P, Neyret A, Luplertlop N, et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J Virol.* 2015;89(17):8880-96.
79. Heaton NS, Randall G. Dengue virus induced autophagy regulates lipid metabolism. *Cell Host Microbe.* 2010;8(5):422-32.
80. Sir D, Kuo C, Tian Y, Liu HM, Huang EJ, Jung JU, et al. Replication of Hepatitis C Virus RNA on Autophagosomal Membranes\*. *J Biol Chem.* 2012;287(22):18036-43.
81. Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature.* 2011;469(7330):323-35.

82. Liang Q, Luo Z, Zeng J, Chen W, Foo SS, Lee SA, et al. Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Deregulate Akt-mTOR Signaling in Human Fetal Neural Stem Cells to Inhibit Neurogenesis and Induce Autophagy. *Cell Stem Cell*. 2016;19(5):663-71.
83. Baldock R, Bard J, Davidson D, Morriss-Kay G. Kaufman's Atlas of Mouse Development Supplement: With Coronal Sections: Elsevier Science; 2015.
84. Molnár Z, Métin C, Stoykova A, Tarabykin V, Price DJ, Francis F, et al. Comparative aspects of cerebral cortical development. *European Journal of Neuroscience*. 2006;23(4):921-34.
85. Tata M, Wall I, Joyce A, Vieira JM, Kessar N, Ruhrberg C. Regulation of embryonic neurogenesis by germinal zone vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1132016. p. 13414-9.
86. Rubenstein JL. Development of the Cerebral Cortex: Implications for Neurodevelopmental Disorders. *J Child Psychol Psychiatry*. 2011;52(4):339-55.
87. Chen JG, Rasin MR, Kwan KY, Sestan N. Zfp312 is required for subcortical axonal projections and dendritic morphology of deep-layer pyramidal neurons of the cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(49):17792-7.
88. Komiyama T, Luo L. Intrinsic control of precise dendritic targeting by an ensemble of transcription factors. *Curr Biol*. 2007;17(3):278-85.
89. Cubelos B, Sebastian-Serrano A, Kim S, Moreno-Ortiz C, Redondo JM, Walsh CA, et al. Cux-2 controls the proliferation of neuronal intermediate precursors of the cortical subventricular zone. *Cereb Cortex*. 2008;18(8):1758-70.
90. Cubelos B, Sebastián-Serrano A, Beccari L, Calcagnotto ME, Cisneros E, Kim S, et al. Cux1 and Cux2 Regulate Dendritic Branching, Spine Morphology, and Synapses of the Upper Layer Neurons of the Cortex. *Neuron*. 2010;66(4):523-35.
91. Curran T, D'Arcangelo G. Role of reelin in the control of brain development. *Brain research Brain research reviews*. 1998;26(2-3):285-94.
92. Liu Q, Xie F, Siedlak S.L. et al. CMLS, *Cell. Mol. Life Sci. Neurofilament proteins in neurodegenerative diseases* | SpringerLink. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 2004;61(24):3057-75.
93. Poulain FE, Sobel A. The microtubule network and neuronal morphogenesis: Dynamic and coordinated orchestration through multiple players. *Mol Cell Neurosci*. 2010;43(1):15-32.
94. Monteiro MR, Kandratavicius L, Leite JP. O papel das proteínas do citoesqueleto na fisiologia celular normal e em condições patológicas. *J epilepsy clin neurophysiol*. 2011;17(1):17-23.
95. van Binsbergen E, Ellis RJ, Abdelmalik N, Jarvis J, Randhawa K, Wyatt-Ashmead J, et al. A fetus with de novo 2q33.2q35 deletion including MAP2 with brain anomalies, esophageal atresia, and laryngeal stenosis. *Am J Med Genet A*. 2014;164a(1):194-8.
96. Alcántara S, Ruiz M, D'Arcangelo G, Ezan F, de Lecea L, Curran T, et al. Regional and Cellular Patterns of reelin mRNA Expression in the Forebrain of the Developing and Adult Mouse. *J Neurosci*. 1998;18(19):7779-99.
97. Ayala R, Shu T, Tsai L-H. Trekking across the Brain: The Journey of Neuronal Migration. *Cell*. 2007;128(1):29-43.
98. Rohlfs Domínguez P. Development of the nervous system in humans. Overview of the prenatal stage until 2013. *Revista Internacional de Psicología*. 2016;15(1).
99. Choi BH, Lapham LW. Radial glia in the human fetal cerebrum: a combined Golgi, immunofluorescent and electron microscopic study. *Brain Res*. 1978;148(2):295-311.
100. Rakic P. Evolution of the neocortex: a perspective from developmental biology. *Nature Reviews Neuroscience*. 2009;10(10):724-35.
101. Elkin Navarro Quiroz MA, Roberto Navarro-Quiroz, Pierine España-Puccini, Anderson Díaz-Perez, Jose Luis Villarreal, Lucy Vasquez, Augusto Torres. Neurogénesis en Cerebro Adulto. *Salud Uninorte*. 2018;34(1):144-59.
102. Dusart P, Fagerberg L, Perisic L, Civelek M, Struck E, Hedin U, et al. A systems-approach reveals human nestin is an endothelial-enriched, angiogenesis-independent intermediate filament protein. *Scientific Reports*. 2018;8(1):1-15.

103. Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*. 1990;60(4):585-95.
104. Lindqvist J, Wistbacka N, Eriksson JE. Studying Nestin and its Interrelationship with Cdk5. *Methods Enzymol*. 2016;568:509-35.
105. D'Arcangelo G. Reelin in the Years: Controlling Neuronal Migration and Maturation in the Mammalian Brain. *Advances in neuroscience*. 2014;2014:19.
106. Raaf J, Kernohan JW. A study of the external granular layer in the cerebellum. The disappearance of the external granular layer and the growth of the molecular and internal granular layers in the cerebellum. *American Journal of Anatomy*. 1944;75(2):151-72.
107. Yamano T, Shimada M, Abe Y, Ohta S, Ohno M. Destruction of external granular layer and subsequent cerebellar abnormalities. *Acta neuropathologica*. 1983;59(1):41-7.
108. Lakatosova S, Ostatnikova D. Reelin and its complex involvement in brain development and function. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2012;44(9):1501-4.
109. de Oliveira WK, de Franca GVA, Carmo EH, Duncan BB, de Souza Kuchenbecker R, Schmidt MI. Infection-related microcephaly after the 2015 and 2016 Zika virus outbreaks in Brazil: a surveillance-based analysis. *Lancet*. 2017;390(10097):861-70.
110. Yuan L, Huang XY, Liu ZY, Zhang F, Zhu XL, Yu JY, et al. A single mutation in the prM protein of Zika virus contributes to fetal microcephaly. *Science*. 2017;358(6365):933-6.
111. Pettersson JH, Eldholm V, Seligman SJ, Lundkvist A, Falconar AK, Gaunt MW, et al. How Did Zika Virus Emerge in the Pacific Islands and Latin America? *MBio*. 2016;7(5).
112. Hertzog J, Dias Junior AG, Rigby RE, Donald CL, Mayer A, Sezgin E, et al. Infection with a Brazilian isolate of Zika virus generates RIG-I stimulatory RNA and the viral NS5 protein blocks type I IFN induction and signaling. *Eur J Immunol*. 2018;48(7):1120-36.
113. Adibi JJ, Marques ET, Jr., Cartus A, Beigi RH. Teratogenic effects of the Zika virus and the role of the placenta. *Lancet*. 2016;387(10027):1587-90.
114. Kennedy LA. The pathogenesis of brain abnormalities in the fetal alcohol syndrome: an integrating hypothesis. *Teratology*. 1984;29(3):363-8.
115. Dekaban AS. Abnormalities in children exposed to x-radiation during various stages of gestation: tentative timetable of radiation injury to the human fetus. I. *J Nucl Med*. 1968;9(9):471-7.
116. Mostoufi-zadeh M, Driscoll SG, Bianco SA, Kundsinn RB. Placental evidence of cytomegalovirus infection of the fetus and neonate. *Arch Pathol Lab Med*. 1984;108(5):403-6.
117. Hadeed AJ, Siegel SR. Maternal cocaine use during pregnancy: effect on the newborn infant. *Pediatrics*. 1989;84(2):205-10.
118. Attardo A, Fabel K, Krebs J, Haubensak W, Huttner WB, Kempermann G. Tis21 Expression Marks Not Only Populations of Neurogenic Precursor Cells but Also New Postmitotic Neurons in Adult Hippocampal Neurogenesis. *Cereb Cortex*. 2010;20(2):304-14.
119. Arnold SJ, Huang GJ, Cheung AF, Era T, Nishikawa SI, Bikoff EK, et al. The T-box transcription factor Eomes/Tbr2 regulates neurogenesis in the cortical subventricular zone. *Genes Dev*. 2008;22(18):2479-84.
120. Huang Y, Li Y, Zhang H, Zhao R, Jing R, Xu Y, et al. Zika virus propagation and release in human fetal astrocytes can be suppressed by neutral sphingomyelinase-2 inhibitor GW4869. *Cell Discovery*. 2018;4(1):19.
121. Goodfellow FT, Willard KA, Wu X, Scoville S, Stice SL, Brindley MA. Strain-Dependent Consequences of Zika Virus Infection and Differential Impact on Neural Development. *Viruses*. 2018;10(10):550.
122. Morrison TE, Diamond MS, Pierson TC. Animal Models of Zika Virus Infection, Pathogenesis, and Immunity. 2017.
123. Laiton-Donato K, Alvarez-Diaz DA, Rengifo AC, Torres-Fernandez O, Usme-Ciro JA, Rivera JA, et al. Complete Genome Sequence of a Colombian Zika Virus Strain Obtained from BALB/c

- Mouse Brain after Intraperitoneal Inoculation. Microbiology resource announcements. 2019;8(46).
124. Au - Herrlinger SA, Au - Shao Q, Au - Ma L, Au - Brindley M, Au - Chen J-F. Establishing Mouse Models for Zika Virus-induced Neurological Disorders Using Intracerebral Injection Strategies: Embryonic, Neonatal, and Adult. *JoVE*. 2018(134):e56486.
  125. Marzi A, Emanuel J, Callison J, McNally KL, Arndt N, Chadinha S, et al. Lethal Zika Virus Disease Models in Young and Older Interferon  $\alpha/\beta$  Receptor Knock Out Mice. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018;8.
  126. Lazear Helen M, Govero J, Smith Amber M, Platt Derek J, Fernandez E, Miner Jonathan J, et al. A Mouse Model of Zika Virus Pathogenesis. *Cell Host & Microbe*. 2016;19(5):720-30.
  127. Li C, Xu D, Ye Q, Hong S, Jiang Y, Liu X, et al. Zika virus disrupts neural progenitor development and leads to microcephaly in mice. *Cell Stem Cell*. 2016;19(1):120-6.
  128. Yockey LJ, Varela L, Rakib T, Khoury-Hanold W, Fink SL, Stutz B, et al. Vaginal Exposure to Zika Virus during Pregnancy Leads to Fetal Brain Infection. *Cell*. 2016;166(5):1247-56 e4.
  129. Sapparapu G, Fernandez E, Kose N, Cao B, Fox JM, Bombardi RG, et al. Neutralizing human antibodies prevent Zika virus replication and fetal disease in mice. *Nature*. 2016;540(7633):443-7.
  130. Garcez PP, Nascimento JM, Vasconcelos JMd, Costa RMd, Delvecchio R, Trindade P, et al. Zika virus disrupts molecular fingerprinting of human neurospheres. *Scientific Reports*. 2017;7:40780.
  131. Ferraris P, Cochet M, Hamel R, Gladwyn-Ng I, Alfano C, Diop F, et al. Zika virus differentially infects human neural progenitor cells according to their state of differentiation and dysregulates neurogenesis through the Notch pathway. *Emerging Microbes & Infections*. 2019;8(1):1003-16.
  132. Garcez PP, Loiola EC, Madeiro da Costa R, Higa LM, Trindade P, Delvecchio R, et al. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science*. 2016;352(6287):816-8.
  133. Dang J, Tiwari SK, Lichinchi G, Qin Y, Patil VS, Eroshkin AM, et al. Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3. *Cell Stem Cell*. 2016;19(2):258-65.
  134. Rakhade SN, Jensen FE. Epileptogenesis in the immature brain: emerging mechanisms. *Nat Rev Neurol*. 2009;5(7):380.
  135. Fang Y, Eglen R. Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development. *SLAS discovery*. 2017:2472555217696795.
  136. Gleeson JG, Lin PT, Flanagan LA, Walsh CA. Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron*. 1999;23(2):257-71.
  137. Journiac N, Gilabert-Juan J, Cipriani S, Benit P, Liu X, Jacquier S, et al. Cell Metabolic Alterations due to Mcph1 Mutation in Microcephaly. *Cell Reports*. 2020;31(2):107506.
  138. Cizmecioglu O, Arnold M, Bahtz R, Settele F, Ehret L, Haselmann-Weiss U, et al. Cep152 acts as a scaffold for recruitment of Plk4 and CPAP to the centrosome. *J Cell Biol*. 2010;191(4):731-9.
  139. Nigg EA, Raff JW. Centrioles, centrosomes, and cilia in health and disease. *Cell*. 2009;139(4):663-78.
  140. Brown NJ, Marjanović M, Lüders J, Stracker TH, Costanzo V. Cep63 and Cep152 Cooperate to Ensure Centriole Duplication. *PLoS One*. 2013;8(7).
  141. Sessa A, Mao CA, Hadjantonakis AK, Klein WH, Broccoli V. Tbr2 directs conversion of radial glia into basal precursors and guides neuronal amplification by indirect neurogenesis in the developing neocortex. *Neuron*. 2008;60(1):56-69.
  142. Roessmann U, Velasco ME, Sindely SD, Gambetti P. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) in ependymal cells during development. An immunocytochemical study. *Brain Research*. 1980;200(1):13-21.

143. Hamad MIK, Jbara A, Rabaya O, Petrova P, Daoud S, Melliti N, et al. Reelin signaling modulates GABAB receptor function in the neocortex. *J Neurochem*. 2020.
144. Bernal A, Arranz L. Nestin-expressing progenitor cells: function, identity and therapeutic implications. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(12):2177-95.
145. Garber JC, Barbee RW, Bielitzki JT, Clayton L, Donovan J, Hendriksen C, et al. Guide for the care and use of laboratory animals. The National Academic Press, Washington DC. 2011;8:220.
146. 2010/63/UE D. del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010 , relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos Texto pertinente a efectos del EEE. 2010. p. 33–79.
147. Chosewood LC, Wilson DE. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories: Diane Publishing; 2007.
148. Organization WH. Laboratory biosafety manual: World Health Organization; 2004.
149. Fuentes F, Mendoza R, Rosales A, Cisneros R, Salud INd. Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: ratón. Instituto Nacional de Salud (Perú) Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud Lima. 2008:52.
150. Balls M, Straughan DW. The three Rs of Russell & Burch and the testing of biological products. *Dev Biol Stand*. 1996;86:11-8.
151. Scremin AM, Scremin OU, Brechner T. Survival under hypoxia. Age dependence and effect of cholinergic drugs. *Stroke*. 1980;11(5):548-52.
152. Rivera J, Neira M, Parra E, Méndez J, Sarmiento L, Caldas ML. Detección de antígenos del virus dengue en tejidos post mortem. *Biomédica*. 2014;34(4).
153. Rivera J, Neira M, Sarmiento L, Parra E, Caldas ML. Virus de la influenza. <https://revistabiomedicaorg/indexphp/biomedica>. 2016.
154. Rivera J, Rengifo A, Santamaría G, Corchuelo S, Álvarez-Díaz D, Parra E, et al. Inmunorreacción de la infección por el virus de Zika en retina de ratones. *Biomédica*. 2019;39(2):8-10.
155. Corchuelo S, Gómez C, Rosales A, Santamaria G, Rivera JA, Saad EP, et al. CISH and IHC for the Simultaneous Detection of ZIKV RNA and Antigens in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Cell Blocks and Tissues. *Curr Protoc*. 2021;1(12):e319.
156. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(1):235-42.
157. Tobón ACJ. Infecciones por Virus Zika en Colombia-2015. *Medicina*. 2015;19(2):125-33.
158. Khaiboullina SF, Lopes P, de Carvalho TG, Real ALCV, Souza DG, Costa VV, et al. Host Immune Response to ZIKV in an Immunocompetent Embryonic Mouse Model of Intravaginal Infection. *Viruses*. 2019;11(6):558.
159. Chen J, Liang Y, Yi P, Xu L, Hawkins HK, Rossi SL, et al. Outcomes of Congenital Zika Disease Depend on Timing of Infection and Maternal-Fetal Interferon Action. *Cell Reports*. 2017;21(6):1588-99.
160. Cui L, Zou P, Chen E, Yao H, Zheng H, Wang Q, et al. Visual and motor deficits in grown-up mice with congenital Zika virus infection. *EBioMedicine*. 2017;20:193-201.
161. Shelton SM, Soucy AR, Kurzion R, Zeldich E, Connor JH, Haydar TF. Forebrain Neural Precursor Cells Are Differentially Vulnerable to Zika Virus Infection. *eNeuro*. 2021;8(5).
162. Fauser M, Weselek G, Hauptmann C, Markert F, Gerlach M, Hermann A, et al. Catecholaminergic Innervation of Periventricular Neurogenic Regions of the Developing Mouse Brain. *Frontiers in Neuroanatomy*. 2020;14:64.
163. Thawani A, Sirohi D, Kuhn RJ, Fekete DM. Zika Virus Can Strongly Infect and Disrupt Secondary Organizers in the Ventricular Zone of the Embryonic Chicken Brain. *Cell reports*. 2018;23(3):692-700.
164. Foo S-S, Chen W, Chan Y, Lee W-S, Lee S-A, Cheng G, et al. Biomarkers and immunoprofiles associated with fetal abnormalities of ZIKV-positive pregnancies. *JCI insight*. 2018;3(21):e124152.

165. Sathupan P, Khongphattanayothin A, Srisai J, Srikaew K, Poovorawan Y. The role of vascular endothelial growth factor leading to vascular leakage in children with dengue virus infection. *Ann Trop Paediatr.* 2007;27(3):179-84.
166. Zlotnik A, Yoshie O. The chemokine superfamily revisited. *Immunity.* 2012;36(5):705-16.
167. Corchuelo S, Gómez CY, Rosales AA, Santamaria G, Rivera JA, Saad EP, et al. CISH and IHC for the Simultaneous Detection of ZIKV RNA and Antigens in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Cell Blocks and Tissues. *Curr Protoc.* 2021;1(12):e319.
168. Strauss EG, Strauss JH. Replication strategies of the single stranded RNA viruses of eukaryotes. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1983;105:1-98.
169. Valentine GC, Seferovic MD, Fowler SW, Major AM, Gorchakov R, Berry R, et al. Timing of gestational exposure to Zika virus is associated with postnatal growth restriction in a murine model. *Am J Obstet Gynecol.* 2018;219(4):403.e1-.e9.
170. Álvarez-Díaz DA, Valencia-Álvarez E, Rivera JA, Rengifo AC, Usme-Ciro JA, Peláez-Carvajal D, et al. An updated RT-qPCR assay for the simultaneous detection and quantification of chikungunya, dengue and zika viruses. *Infection, Genetics and Evolution.* 2021;93:104967.
171. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols.* 2008;3(6):1101-8.
172. Walker TL, Yasuda T, Adams DJ, Bartlett PF. The doublecortin-expressing population in the developing and adult brain contains multipotential precursors in addition to neuronal-lineage cells. *J Neurosci.* 2007;27(14):3734-42.
173. Hannan AJ, Henke RC, Seeto GS, Capes-Davis A, Dunn J, Jeffrey PL. Expression of doublecortin correlates with neuronal migration and pattern formation in diverse regions of the developing chick brain. *J Neurosci Res.* 1999;55(5):650-7.
174. Cortese M, Goellner S, Acosta EG, Neufeldt CJ, Oleksiuk O, Lampe M, et al. Ultrastructural Characterization of Zika Virus Replication Factories. *Cell reports.* 2017;18(9):2113-23.
175. Dzhindzhev NS, Yu QD, Weiskopf K, Tzolovsky G, Cunha-Ferreira I, Riparbelli M, et al. Asterless is a scaffold for the onset of centriole assembly. *Nature.* 2010;467(7316):714-8.
176. Wang X, Tsai JW, Imai JH, Lian WN, Vallee RB, Shi SH. Asymmetric centrosome inheritance maintains neural progenitors in the neocortex. *Nature.* 2009;461(7266):947-55.
177. Yingling J, Youn YH, Darling D, Toyo-Oka K, Pramparo T, Hirotsune S, et al. Neuroepithelial stem cell proliferation requires LIS1 for precise spindle orientation and symmetric division. *Cell.* 2008;132(3):474-86.
178. Marthiens V, Rujano MA, Pennetier C, Tessier S, Paul-Gilloteaux P, Basto R. Centrosome amplification causes microcephaly. *Nat Cell Biol.* 2013;15(7):731-40.
179. Hodge RD, Nelson BR, Kahoud RJ, Yang R, Mussar KE, Reiner SL, et al. Tbr2 is essential for hippocampal lineage progression from neural stem cells to intermediate progenitors and neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2012;32(18):6275-87.
180. Graham V, Khudyakov J, Ellis P, Pevny L. SOX2 Functions to Maintain Neural Progenitor Identity. *Neuron.* 2003;39(5):749-65.
181. Hevner RF. Intermediate progenitors and Tbr2 in cortical development. *Journal of Anatomy.* 2019;235(3):616-25.
182. Russ AP, Wattler S, Colledge WH, Aparicio SA, Carlton MB, Pearce JJ, et al. Eomesodermin is required for mouse trophoblast development and mesoderm formation. *Nature.* 2000;404(6773):95-9.
183. Lancaster MA, Renner M, Martin C-A, Wenzel D, Bicknell LS, Hurles ME, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature.* 2013;501(7467):373-9.
184. Gabriel E, Ramani A, Altinisik N, Gopalakrishnan J. Human Brain Organoids to Decode Mechanisms of Microcephaly. *Frontiers in Cellular Neuroscience.* 2020;14:115.

185. Mihalas AB, Elsen GE, Bedogni F, Daza RAM, Ramos-Laguna KA, Arnold SJ, et al. Intermediate Progenitor Cohorts Differentially Generate Cortical Layers and Require Tbr2 for Timely Acquisition of Neuronal Subtype Identity. *Cell Rep.* 2016;16(1):92-105.
186. Vaswani AR, Blaess S. Reelin Signaling in the Migration of Ventral Brain Stem and Spinal Cord Neurons. *Frontiers in cellular neuroscience.* 2016;10:62-.
187. Alpuche-Lazcano SP, Saliba J, Costa VV, Campolina-Silva GH, Marim FM, Ribeiro LS, et al. Profound downregulation of neural transcription factor Npas4 and Nr4a family in fetal mice neurons infected with Zika virus. *PLOS Neglected Tropical Diseases.* 2021;15(5):e0009425.
188. Ledur PF, Karmirian K, Pedrosa CdSG, Souza LRQ, Assis-de-Lemos G, Martins TM, et al. Zika virus infection leads to mitochondrial failure, oxidative stress and DNA damage in human iPSC-derived astrocytes. *Scientific Reports.* 2020;10(1):1218.
189. Limonta D, Jovel J, Kumar A, Airo AM, Hou S, Saito L, et al. Human Fetal Astrocytes Infected with Zika Virus Exhibit Delayed Apoptosis and Resistance to Interferon: Implications for Persistence. *Viruses.* 2018;10(11).
190. Li H, Saucedo-Cuevas L, Regla-Nava JA, Chai G, Sheets N, Tang W, et al. Zika Virus Infects Neural Progenitors in the Adult Mouse Brain and Alters Proliferation. *Cell stem cell.* 2016;19(5):593-8.
191. Lossia OV, Conway MJ, Tree MO, Williams RJ, Goldthorpe SC, Srinageshwar B, et al. Zika virus induces astrocyte differentiation in neural stem cells. *Journal of NeuroVirology.* 2018;24(1):52-61.
192. Martin C-A, Murray JE, Carroll P, Leitch A, Mackenzie KJ, Halachev M, et al. Mutations in genes encoding condensin complex proteins cause microcephaly through decatenation failure at mitosis. *Genes & development.* 2016;30(19):2158-72.
193. Neitzel H, Neumann LM, Schindler D, Wirges A, Tönnies H, Trimborn M, et al. Premature chromosome condensation in humans associated with microcephaly and mental retardation: a novel autosomal recessive condition. *American journal of human genetics.* 2002;70(4):1015-22.
194. Gruber R, Zhou Z, Sukchev M, Joerss T, Frappart PO, Wang ZQ. MCPH1 regulates the neuroprogenitor division mode by coupling the centrosomal cycle with mitotic entry through the Chk1-Cdc25 pathway. *Nat Cell Biol.* 2011;13(11):1325-34.
195. Meertens L, Labeau A, Dejarnac O, Cipriani S, Sinigaglia L, Bonnet-Madin L, et al. Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. *Cell Rep.* 2017;18(2):324-33.
196. Xie S, Zhang H, Liang Z, Yang X, Cao R. AXL, an Important Host Factor for DENV and ZIKV Replication. *Frontiers in cellular and infection microbiology.* 2021;11:575346-.
197. Nowakowski TJ, Pollen AA, Di Lullo E, Sandoval-Espinosa C, Bershteyn M, Kriegstein AR. Expression Analysis Highlights AXL as a Candidate Zika Virus Entry Receptor in Neural Stem Cells. *Cell Stem Cell.* 2016;18(5):591-6.
198. White SH. How Hydrogen Bonds Shape Membrane Protein Structure. *Advances in Protein Chemistry.* 72: Academic Press; 2005. p. 157-72.
199. Williams G. *Advanced Biology For You:* OUP Oxford; 2015.
200. McGrath EL, Rossi SL, Gao J, Widen SG, Grant AC, Dunn TJ, et al. Differential Responses of Human Fetal Brain Neural Stem Cells to Zika Virus Infection. *Stem Cell Reports.* 2017;8(3):715-27.

## Material complementario

### Anexo 1. Características de estabilidad para el diseño de primers.

Características	Mínimo	Máximo
Longitud de primers	17 bp	24 bp
Temperatura de fusión	35.8°C	62.5°C
Estabilidad del pentámero 3´	8.5 -Kc/M	
Secuencia unica en el 3´	7bp	
Estabilidad de homodímeros o dímeros de primer	$\Delta G = -3.0 - 2 \text{ Kcal/mol}$	

### Anexo 2. Primers específicos de marcadores moleculares de neurodesarrollo expresados en ratón.

Nombre	Orientación	Longitud del primer pb	Secuencia	GC%	TM	Tamaño del producto
CEP 152	Forward	21	CCCTTTGCAGAACGCCACCAC	61,9	65,3°C	197
	Reverse	23	CCGCAACACTTCCGCTTTTACCA	52,17	64,7°C	
Nestin	Forward	19	CCCTGAAGTCGAGGAGCTG	63,16	61,7°C	166
	Reverse	19	CTGCTGCACCTCTAAGCGA	57,89	59,5°C	
Reelin	Forward	21	GTACCGGGACAGGAATACCAT	52,4	61,3°C	73
	Reverse	22	CAGTTGCTGGTAGGAGTCAAAG	50	62,1°C	
DCX	Forward	23	CATTTTGACGAACGAGACAAAGC	43,38	61,1°C	63
	Reverse	21	TGGAAGTCCATTCATCCGTGA	47,62	59,4°C	
MCPH1	Forward	24	AGCTCCGATCTGCCGACTTGAACG	58,33	64,8°C	101
	Reverse	23	GGCTGCTGGCTGGCGCTATGAAC	65,22	66,3°C	
TBR2	Forward	21	GGCCCCTATGGCTCAAATTCC	57,2	63,3°C	141
	Reverse	23	GAACCACTTCCACGAAAACATTG	43,5	61,1°C	
GFAP	Forward	19	CGGAGACGCATCACCTCTG	63,2	61,7°C	120
	Reverse	21	TGGAGGAGTCATTTCGAGACAA	47,6	51,4°C	

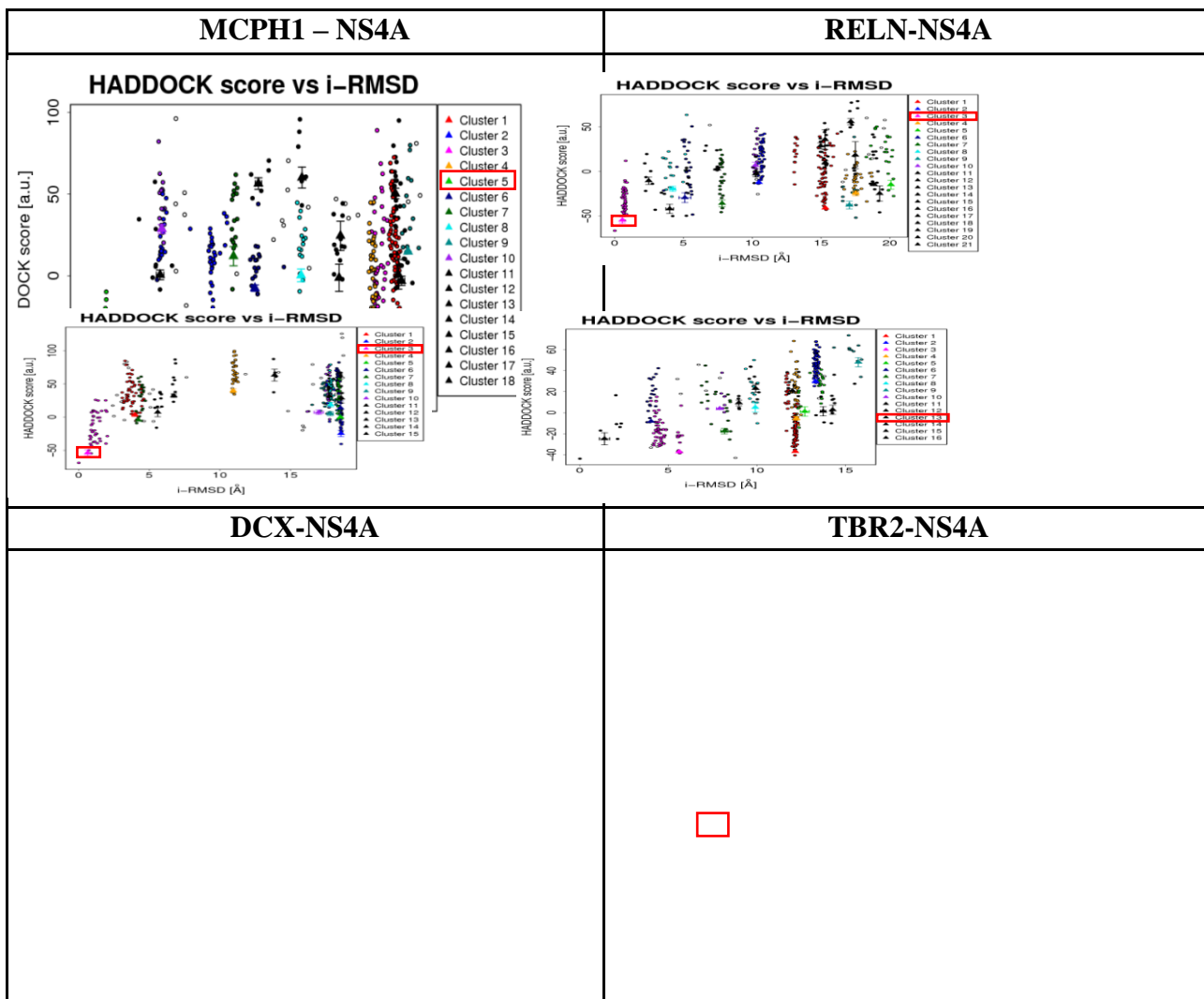
**Anexo 3.** Análisis estadístico de la inmunoreacción de caspasa 3 evaluado en un modelo prenatal infectado con ZIKV.

Estructura	Grupo biológico	Distribución de normalidad		Prueba de aleatoriedad de residuos			Pruebas de normalidad				Prueba de hipótesis
		Sesgo	Curtosis				Shapiro - Wilk	Chi cuadrado	Kolmogorov	Chi cuadrado	Prueba t
Proscéfalos	Controles	1,5559	0,351288	0,780874	0,734091	0,235752	0,149766	0,617389	0,88213	0,818731	0,589226 Valor P= 0,559107
	Infectados	1,36788	-0,563262	0,316922	0,809457	0,734504	0,0703061	0,241624	0,64174	0,0489629	
Mesencéfalo	Controles	2,33079	2,06715	1	0,333536	0,975216	0,010059	0,100559	0,269727	0,00408677	0,238619 Valor P= 0,813829
	Infectados	0,347016	-1,23542	0,762065	0,901433	0,813198	0,079793	0,124726	0,472345	0,22313	
Rombencéfalo	Controles	0,813572	-0,214852	0,702546	1	0,537784	0,430339	0,238103	0,709947	0,317309	1,16969 Valor P= 0,256589
	Infectados	2,78784	2,82263	0,762065	0,901433	0,580993	0,00164411	0,000439049	0,103763	8,13568E-05	
Médula	Controles	1,5278	1,2401				0,0840436	0,308441	0,904152		1,55371 Valor P= 0,151303
	Infectados	0,594608	-0,775104				0,237701	0,0712872	0,889286		

**Anexo 4.** Análisis estadístico de la expresión diferencial de los marcadores de neurodesarrollo evaluados en un modelo prenatal infectado con ZIKV.

Nombre del gen	RQ	Veces de cambio	P valor Test de T	Grupo biológico	Distribución de normalidad		Prueba de aleatoriedad de residuos			Pruebas de normalidad				Prueba de homocedasticidad	Prueba de hipótesis
					Sesgo	Curtosis				Shapiro - Wilk	Chi cuadrado	Kolmogorov	Chi cuadrado	F	
DCX	1,989	1,989	0,01	Controles	2,16584	0,76265	0,466079	0,921731	0,47347	0,006135	0,0353524	0,266793	0,006966	0,4239	U= 140,0
				Infectados	0,810769	-0,3867	0,780874	0,734091	0,21353	0,429401	0,188573	0,66592	0,135335		valor-P = 0,000346554
MCPH1	1,288	1,288	0,206	Controles	-0,043992	1,41388	0,224449	0,49162	0,18512	0,0349199	0,0598823	0,544839	0,085902	0,744473	U= 67,0
				Infectados	0,920399	-0,9498	0,403984	0,157053	0,09730	0,0150934	0,124652	0,405452	0,317309		valor-P = 0,196511
TBR2	2,559	2,559	0,029	Controles	-0,083972	-0,1588	0,795805	1,0	0,81573	0,817198	0,173015	0,0258914	0,845663	1,09549	U= 100,0
				Infectados	0,975049	0,41854	1,0	0,193608	0,96826	0,147618	0,256997	0,909248	-----		valor-P == 0,000581848
REELIN	2,315	2,315	0,003	Controles	0,97583	-0,8798	0,808035	0,49162	0,25924	0,084801	0,325706	0,456474	0,167146	2,60729	U= 225,0
				Infectados	-0,603864	-0,6657	0,1262	0,004598	0,75875	0,508807	0,617389	0,724537	0,868175		valor-P = 0,00000339552
GFAP	0,889	-1,12	0,516	Controles	0,019623	-1,1796	0,070075	1,0	0,31754	0,061481	0,000774	0,545389	0,011920	6,5669	U= 46,0
				Infectados	0,45009	-0,9559	0,164264	1,0	0,29389	0,231016	0,238103	0,569828	0,317309		valor-P = 0,422935
CEP-152	1,717	1,717	0,018	Controles	2,50554	1,03837	0,437556	0,760903	0,09376	0,0005575	0,00732665	0,101039	0,000256	2,69297	U= 159,0
				Infectados	0,776969	0,75473	0,780874	0,734091	0,34719	0,866488	0,700566	0,778801	0,997114		valor-P = 0,000830509
NESTIN	1,251	1,251	0,572	Controles	-0,849106	-0,8591	0,795805	0,361309	0,05233	0,0408732	0,122066	0,509128	0,286505	3,98959	U= 79,0
				Infectados	0,715752	-0,7895	0,164264	0,734091	0,70789	0,23107	0,50829	0,649017	0,213215		valor-P = 0,934548

**Anexo 5.** Distancia media cuadrática obtenida de las mejores posiciones estructurales de las proteínas del neurodesarrollo evaluadas.



**Anexo 6.** Interacciones hidrofóbicas entre marcadores de neurodesarrollo y la proteína no estructural NS4A del ZIKV.

<b>INTERACCIONES HIDROFÓBICAS DENTRO 5 Angstroms – MCPH1</b>					
<b>Posición</b>	<b>Residuo</b>	<b>Cadena</b>	<b>Posición</b>	<b>Residuo</b>	<b>Cadena</b>
30	TYR	A	60	LEU	B
30	TYR	A	90	ALA	B
34	PHE	A	60	LEU	B
34	PHE	A	93	TRP	B
79	VAL	A	93	TRP	B
80	LEU	A	105	ILE	B
80	LEU	A	106	ALA	B
80	LEU	A	85	MET	B
80	LEU	A	88	LEU	B
80	LEU	A	92	ALA	B
82	VAL	A	93	TRP	B
87	MET	A	102	PRO	B
87	MET	A	96	TRP	B
97	PHE	A	106	ALA	B
97	PHE	A	85	MET	B
98	PRO	A	110	ILE	B
98	PRO	A	111	VAL	B
98	PRO	A	85	MET	B
99	ALA	A	85	MET	B
100	VAL	A	110	ILE	B
100	VAL	A	114	LEU	B
100	VAL	A	85	MET	B
106	LEU	A	78	ILE	B

<b>INTERACCIONES HIDROFÓBICAS DENTRO DE 5 Angstroms - DCX</b>					
<b>Posición</b>	<b>Residuo</b>	<b>Cadena</b>	<b>Posición</b>	<b>Residuo</b>	<b>Cadena</b>
46	LEU	A	49	PRO	B
52	ALA	A	93	TRP	B
64	TYR	A	117	VAL	B
64	TYR	A	78	ILE	B
64	TYR	A	81	MET	B
65	PHE	A	110	ILE	B
65	PHE	A	111	VAL	B
65	PHE	A	114	LEU	B
65	PHE	A	81	MET	B
65	PHE	A	85	MET	B
68	ILE	A	106	ALA	B
69	VAL	A	86	VAL	B
71	ALA	A	93	TRP	B
91	LEU	A	111	VAL	B
95	ILE	A	115	LEU	B

95	ILE	A	119	LEU	B
142	VAL	A	83	PHE	B
146	TRP	A	86	VAL	B
150	VAL	A	55	ILE	B

<b>INTERACCIONES HIDROFÓBICAS DENTRO DE 5 Angstroms – RELN</b>					
<b>Posición</b>	<b>Residuo</b>	<b>Cadena</b>	<b>Posición</b>	<b>Residuo</b>	<b>Cadena</b>
1294	LEU	A	110	ILE	B
1294	LEU	A	111	VAL	B
1294	LEU	A	114	LEU	B
1294	LEU	A	85	MET	B
1300	TYR	A	114	LEU	B
1330	MET	A	102	PRO	B
1330	MET	A	93	TRP	B
1330	MET	A	96	TRP	B
1332	TRP	A	92	ALA	B
1332	TRP	A	93	TRP	B
1369	TRP	A	66	LEU	B
1387	PHE	A	85	MET	B
1387	PHE	A	86	VAL	B
1389	TRP	A	86	VAL	B
1390	ILE	A	56	MET	B
1390	ILE	A	60	LEU	B
1399	VAL	A	55	ILE	B
1404	LEU	A	83	PHE	B
1404	LEU	A	86	VAL	B
1407	VAL	A	83	PHE	B
1407	VAL	A	86	VAL	B
1408	TYR	A	78	ILE	B
1409	ILE	A	114	LEU	B
1409	ILE	A	85	MET	B
1424	ILE	A	78	ILE	B
1427	VAL	A	121	PRO	B
1427	VAL	A	123	PRO	B
1429	PHE	A	123	PRO	B

<b>INTERACCIONES HIDROFÓBICAS DENTRO DE 5 Angstroms – TBR2</b>					
<b>Posición</b>	<b>Residuo</b>	<b>Cadena</b>	<b>Posición</b>	<b>Residuo</b>	<b>Cadena</b>
290	ILE	A	73	MET	B
299	PHE	A	66	LEU	B
352	TYR	A	58	LEU	B
355	PRO	A	57	LEU	B
355	PRO	A	58	LEU	B
371	PHE	A	58	LEU	B
436	ALA	A	73	MET	B
437	TYR	A	70	PHE	B

447	ILE	A	70	PHE	B
452	PHE	A	66	LEU	B
452	PHE	A	86	VAL	B
453	ALA	A	70	PHE	B
453	ALA	A	83	PHE	B
456	PHE	A	83	PHE	B

<b>INTERACCIONES HIDROFÓBICAS DENTRO DE 5 Angstroms – AXL</b>					
<b>Posición</b>	<b>Residuo</b>	<b>Cadena</b>	<b>Posición</b>	<b>Residuo</b>	<b>Cadena</b>
265	LEU	A	119	LEU	B
265	LEU	A	121	PRO	B
285	MET	A	72	LEU	B
298	PHE	A	105	ILE	B
302	PRO	A	100	ILE	B
461	ALA	A	69	PHE	B
482	PHE	A	108	VAL	B
482	PHE	A	112	VAL	B
635	PHE	A	112	VAL	B
635	PHE	A	116	LEU	B
656	TYR	A	105	ILE	B
656	TYR	A	108	VAL	B
656	TYR	A	109	LEU	B

**Anexo 7. Interacciones iónicas entre marcadores de neurodesarrollo y la proteína no estructural NS4A del ZIKV.**

<b>INTERACCIONES IONICAS DENTRO DE 6 Angstroms– MCPH1</b>					
<b>Posición</b>	<b>Residuo</b>	<b>Cadena</b>	<b>Posición</b>	<b>Residuo</b>	<b>Cadena</b>
36	LYS	A	53	GLU	B
84	LYS	A	101	GLU	B
103	ASP	A	74	ARG	B
103	ASP	A	76	LYS	B

<b>INTERACCIONES IONICAS DENTRO DE 6 Angstroms - DCX</b>					
<b>Posición</b>	<b>Residuo</b>	<b>Cadena</b>	<b>Posición</b>	<b>Residuo</b>	<b>Cadena</b>
76	ARG	A	101	GLU	B
86	ASP	A	104	ARG	B
137	GLU	A	76	LYS	B

<b>INTERACCIONES IONICAS DENTRO DE 6 Angstroms – RELN</b>					
<b>Posición</b>	<b>Residuo</b>	<b>Cadena</b>	<b>Posición</b>	<b>Residuo</b>	<b>Cadena</b>
1392	GLU	A	53	GLU	B
1405	ASP	A	74	ARG	B

1422	ASP	A	76	LYS	B
1431	ASP	A	76	LYS	B

<b>INTERACCIONES IONICAS DENTRO DE 6 Angstroms – AXL</b>						
<b>Posición</b>	<b>Residuo</b>	<b>Cadena</b>	<b>Posición</b>	<b>Residuo</b>	<b>Cadena</b>	
275	GLU	A	122	LYS	B	
276	ASP	A	122	ARG	B	
305	ARG	A	53	ARG	B	
305	ARG	A	99	LYS	B	
307	ARG	A	50	ARG	B	
307	ARG	A	53	LYS	B	
309	LYS	A	50	LYS	B	
411	ARG	A	50	ARG	B	
415	HIS	A	50	ARG	B	

**Anexo 8. Interacciones de puente de hidrógeno entre marcadores de neurodesarrollo y la proteína no estructural NS4A del ZIKV.**

<b>PUENTES DE HIDROGENO -MCPH1 -NS4A</b>											
<b>DONADOR</b>				<b>ACEPTOR</b>				<b>PARAMETROS</b>			
<b>POSICION</b>	<b>CADENA</b>	<b>RESIDUO</b>	<b>ATOM</b>	<b>POSICION</b>	<b>CADENA</b>	<b>RESIDUO</b>	<b>ATOM</b>	<b>Dd-a</b>	<b>Dh-a</b>	<b>A(d-H-N)</b>	<b>A(a-O=C)</b>
79	B	GLY	N	102	A	THR	O	3.25	3.98	37.68	150.93

Dd-a = Distancia entre donante y aceptante

Dh-a = Distancia entre el hidrogeno y el aceptor

A(d-H-N) = Ángulo entre donante H-N

A(a-O=C) = Ángulo entre el aceptor O=C

MO = Ocupación múltiple

Los Angulo no definidos se escriben como 999.99

<b>PUENTES DE HIDROGENO -DCX -NS4A</b>												
<b>Posición</b>	<b>Cadena</b>	<b>Residuo</b>	<b>ATOM</b>	<b>Posición</b>	<b>Cadena</b>	<b>Residuo</b>	<b>ATOM</b>	<b>MO</b>	<b>Dd-a</b>	<b>Dh-a</b>	<b>A(d-H-N)</b>	<b>A(a-O=C)</b>
45	A	ALA	N	97	B	LEU	O	-	3,25	9,99	999,99	999,99
47	A	SER	N	49	B	PRO	O	-	3,16	2,54	120,96	89,68
65	A	PHE	N	81	B	MET	O	-	3,12	3,56	56,19	147,36
92	A	SER	N	107	B	CYS	O	-	3,17	2,44	130,32	166,60
112	B	VAL	N	92	A	SER	O	-	3,24	3,34	75,76	158,53

Dd-a = Distancia entre donante y aceptante

Dh-a = Distancia entre el hidrogeno y el aceptor

A(d-H-N) = Ángulo entre donante H-N

A(a-O=C) = Ángulo entre el aceptor O=C

MO = Ocupación múltiple

Los Angulo no definidos se escriben como 999.99

PUENTES DE HIDROGENO -RELN -NS4A												
DONADOR				ACEPTOR					PARAMETROS			
Posición	Cadena	Residuo	ATOM	Posición	Cadena	Residuo	ATOM	MO	Dd-a	Dh-a	A(d-H-N)	A(a-O=C)
1294	A	LEU	N	106	B	ALA	O	-	3,49	9,99	999,99	999,99
1407	A	VAL	N	79	B	GLY	O	-	2,78	1,84	159,36	129,69
82	B	GLY	N	1407	A	VAL	O	-	2,98	2,30	125,65	145,15

Dd-a = Distancia entre donante y aceptante

Dh-a = Distancia entre el hidrogeno y el aceptor

A(d-H-N) = Ángulo entre donante H-N

A(a-O=C) = Ángulo entre el aceptor O=C

MO = Ocupación múltiple

Los Angulo no definidos se escriben como 999.99

PUENTES DE HIDROGENO -TBR2 -NS4A												
DONADOR				ACEPTOR					PARAMETROS			
Posición	Cadena	Residuo	ATOM	Posición	Cadena	Residuo	ATOM	MO	Dd-a	Dh-a	A(d-H-N)	A(a-O=C)
372	A	GLY	N	58	B	LEU	O	-	3.35	2.90	108.83	115.11
455	A	GLY	N	82	B	GLY	O	-	3,33	3,21	88,20	81,74

Dd-a = Distancia entre donante y aceptante

Dh-a = Distancia entre el hidrogeno y el aceptor

A(d-H-N) = Ángulo entre donante H-N

A(a-O=C) = Ángulo entre el aceptor O=C

MO = Ocupación múltiple

Los Angulo no definidos se escriben como 999.99

PUENTES DE HIDROGENO -AXL -NS4A												
DONADOR				ACEPTOR					PARAMETROS			
Posición	Cadena	Residuo	ATOM	Posición	Cadena	Residuo	ATOM	MO	Dd-a	Dh-a	A(d-H-N)	A(a-O=C)
263	A	GLN	N	115	B	LEU	O	-	3,10	3,63	50,69	149,86
265	A	LEU	N	119	B	LEU	O	-	3,26	3,67	58,00	153,75
276	A	ASP	N	122	B	GLU	O	-	2,85	1,88	1,88	133,18

Dd-a = Distancia entre donante y aceptante

Dh-a = Distancia entre el hidrogeno y el aceptor

A(d-H-N) = Ángulo entre donante H-N

A(a-O=C) = Ángulo entre el aceptor O=C

MO = Ocupación múltiple

Los Angulo no definidos se escriben como 999.99