

Evaluación de la expresión de los marcadores de neurodesarrollo proteína morfogénica ósea 4 y proteína centrosomal 63 en un modelo murino de infección prenatal por Zika

DEBIE MARTÍNEZ, JESUS GÓMEZ

Resumen— La infección por el virus de Zika no tiene gran efecto en adultos; sin embargo, la transmisión vertical (madre-cría) genera anomalías en el neurodesarrollo embrionario, donde se desconocen múltiples aspectos sobre la patogénesis del virus, razón por la cual se carece de un tratamiento específico para combatir la infección. Esta propuesta ampliará el conocimiento de la infección por Zika al permitir determinar los efectos del virus sobre el desarrollo cerebral en fetos, evaluando si la infección prenatal por Zika induce alteraciones en los marcadores BMP4 y CEP63 del neurodesarrollo en murinos; dos marcadores moleculares que hacen parte de los estadios embrionarios (E8 y E9) o días ocho y nueve de gestación del ratón. Para evaluar la expresión de los marcadores moleculares se usará la técnica de *Western Blot*. Se espera que este virus afecte la expresión de los marcadores moleculares evaluados, debido a que son precursores del neurodesarrollo, en caso de confirmarse, daría algunas de las bases necesarias para el desarrollo de futuras investigaciones en el manejo y tratamiento de esta infección durante la gestación

I. INTRODUCCIÓN

A mediados de 2016, la OMS declaró la infección por Zika como una emergencia de salud pública de importancia internacional por su relación con el daño neurológico grave en fetos [1], el incremento de casos de microcefalia en neonatos y del síndrome de Guillain Barré en adultos [2].

Se conoce que el virus del Zika (ZIKV) circula desde la década de 1950, donde se logró su aislamiento [3], no obstante, se creía que no causaba enfermedad clínica, razón por la cual, durante seis décadas la infección por el virus no atrajo la atención médica [4]; sin embargo, recientemente se ha demostrado su asociación con patologías sobre el sistema nervioso central [5], fenómeno que ha movilizó a la comunidad científica para entender la patogénesis de la enfermedad.

La infección por ZIKV ha generado que la atención se focalice en embarazadas, debido a que la infección durante la gestación está asociada con un incremento de niños nacidos con microcefalia, situación que se ha convertido en un problema de salud pública en países como Brasil, Venezuela, Colombia, entre otros [2]. En Colombia, el boletín epidemiológico de la semana 52 de 2018 del Instituto

Nacional de Salud informó un total de 857 casos de infección por ZIKV, 601 (70.1%) confirmados por clínica, 250 (29.2%) sospechosos y 6 (0.6%) confirmados por laboratorio; 203 del total de casos corresponde al grupo poblacional gestante.

Además de ser un desafío importante para la salud pública, la epidemia puede traer consigo una presión financiera; en el caso de Brasil, frente a los 4.000 niños nacidos con microcefalia (aproximadamente) asociados con infecciones del ZIKV, el sistema de salud no tuvo la capacidad frente a la demanda de recursos médicos [2].

Un estudio retrospectivo en la Polinesia Francesa demostró que existe un mayor riesgo de anomalías del sistema nervioso central en los fetos cuyas madres adquirieron la infección en el primer trimestre del embarazo, teniendo 10 veces más probabilidad (9.28%) de dar a luz a un recién nacido con microcefalia congénita que las madres que no presentaron ningún síntoma [5], en términos generales, se espera que a menor edad gestacional se genere una mayor afectación fetal por parte del virus [6].

La falta de conocimiento sobre la patogénesis del ZIKV genera la necesidad de desarrollar investigaciones básicas que permitan cómo actúa el virus en distintas etapas del neurodesarrollo sobre algunos marcadores moleculares, específicamente aquellos que están presentes durante el primer trimestre de embarazo.

El desarrollo neurológico a nivel embrionario requiere de la participación de factores proteicos cruciales que regulen la proliferación y diferenciación celular, dentro de esos factores se destacan la proteína morfogénica ósea 4 (BMP4) por ser expresada en la formación del mesodermo ventral [4] y la proteína centrosomal 63 (CEP63) por sus posibles implicaciones en la patogénesis de la microcefalia durante el neurodesarrollo [5]; por lo tanto, estos marcadores fueron seleccionados para este estudio por su importancia en el neurodesarrollo.

Este estudio pretende evaluar la variación en la expresión de la proteína BMP4 y CEP63 en los días embrionarios 8 (neurulación) y 9 (vesiculación) del desarrollo embrionario en murinos (ratones de la familia Murinae), que provienen de hembras gestantes infectadas por el ZIKV, los días embrionarios 8 y 9, corresponden de manera análoga a los días de gestación 20-28 y 24-36 en humanos respectivamente [6], [7]. Con este estudio se pretende determinar si el ZIKV tiene algún efecto en la expresión de estas proteínas, y si la infección prenatal induce cambios en la expresión de los

DEBIE NATALIA MARTÍNEZ, JESUS DAVID GOMEZ pertenecen a la carrera BIOLOGÍA de la UNIVERSIDAD DE LA SALLE BOGOTÁ, COLOMBIA.

El proyecto fue asesorado por YENNY YOLANDA LOZANO

Agradecemos a la entidad Colciencias por la financiación y al Instituto Nacional de Salud de Colombia por permitimos vincularnos a este estudio.

marcadores del neurodesarrollo en un modelo murino. Estos resultados podrían aportar nuevos avances y ser la base de la evaluación de marcadores en un modelo prenatal de infección en humanos.

II. CONCEPTOS BÁSICOS

El ZIKV es un flavivirus [3], con genoma de ARN de 11 Kb. Codifica una poliproteína que es procesada en tres proteínas estructurales: cápside (C), precursor de membrana (prM) y envoltura (E), además de siete proteínas no estructurales: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 y un péptido de 2 Kb. El virus ingresa a las células del hospedero por intervención de proteínas E a los receptores de membrana de la célula hospedera, generando que se internalice por endocitosis [1].

El modo de transmisión predominante del ZIKV es a través de vectores, sin embargo, se ha demostrado que el virus puede transmitirse por transfusiones de sangre [1], [2], [8], [9], [10], o por vía sexual [2], [8], [11]. Este virus, también tiene la capacidad transmitirse verticalmente en *A. aegypti*, en ratones y humanos, en estos dos últimos se da principalmente cuando la madre adquiere el virus durante el primer trimestre del embarazo y es en este caso donde la cría tiene mayor probabilidad de tener problemas graves en el desarrollo neuronal [12]–[15].

La infección fetal por ZIKV puede provocar una infección aguda del tejido cerebral, que se ha asociado con diversas patologías del sistema nervioso central (SNC), principalmente con la microcefalia y cuadros neurológicos agudos del sistema nervioso periférico (SNP) como el síndrome de Guillain-Barré [16], [17].

Se ha estudiado si el virus del ZIKV afecta o interrumpe los progenitores neurales del cerebro, evidenciándose que esta infección causa la reducción en los niveles de transcripción de algunos morfógenos [18].

La complejidad del desarrollo embrionario requiere de la participación de factores proteicos cruciales que regulen la proliferación y diferenciación celular, dentro de esos factores se encuentran las proteínas morfogénicas óseas (BMPs) [4], [19]. La actividad de BMP4 contribuye a la formación del mesodermo ventral, además, el mesodermo dorsal se forma por la supresión de esta. Se ha evidenciado que la deficiencia de BMP4 en ratones causa que no sobrevivan el período embrionario [4].

La Proteína Centrosomal 63 (CEP 63) es indispensable para que se produzca la duplicación del centriolo de forma correcta. En ratones con deficiencia en la expresión de CEP63 se observó reducción considerable del tamaño del cerebro [5].

III. METODOLOGÍA PROPUESTA

1 Determinación de la expresión proteica

1.1 Obtención de cortes de tejido embrionario.

Se usarán tejidos cerebrales de ratones SJL de crías cuyas madres fueron previamente infectadas en los días embrionarios E8 y E9 para extraer las proteínas BMP4 y CEP63, los tejidos de murinos serán proporcionados por el

Instituto Nacional de Salud (INS) y se conservarán a una temperatura de

-70°C hasta su uso

1.2 Separación de proteínas por tamaño. Electroforesis en gel.

A partir de muestras de tejidos cerebrales de murinos se realizará un proceso de lisis para la obtención de proteínas. Se lavará el tejido en un matraz o placas de cultivo celular agregando solución salina tamponada con fosfato frío (PBS) y se agitarán suavemente, durante este proceso se mantendrá la placa de cultivo celular en hielo. Se agregará PBS. Luego, se agregarán 180µL de buffer de lisis de células con 20 µL de cóctel inhibidor de proteasa fresco, durante 30 minutos se incubará en hielo y se aclarará el lisado nuevamente centrifugando a (12000 RPM - gravedades) con una temperatura de 4°C, posteriormente se transferirá el sobrenadante que contiene la mezcla de proteínas a un nuevo tubo y se almacenará a una temperatura de -20°C o -80°C. Finalmente se medirá la concentración de proteínas usando el método de Ácido Bicinconínico (BCA). Se usará como control negativo tejidos de cerebro de murinos en los días E8 y E9 sin infección por el virus y como control de carga se empleará beta actina.

Se determinará el volumen del extracto de la proteína (Volumen=Masa/Concentración usada) con el fin de asegurar 30 µg de muestra en cada pozo, luego se adicionarán 5 µL de buffer de carga, se igualará el volumen de cada línea con agua destilada doble (dd H₂O), hasta que haya un volumen final de 15 µL por línea. Por último, se calentarán las muestras en baño de maría durante 5 minutos a una temperatura próxima a los 100°C.

Para la separación de las proteínas presentes en la muestra, se empleará un gel de poliacrilamida al 10%. Se pondrá el buffer y el gel dentro de la cubeta de electroforesis y se conectará a una fuente de alimentación de corriente, luego se retirará el peine con cuidado, se usará un marcador de carga seguido de las muestras en cada pozo, finalmente se pondrá el gel a 80V por 20 minutos sólo mientras las muestras cruzan el gel concentrador, posteriormente se subirá el voltaje a 180V por 50 minutos o hasta que el colorante se encuentre en la parte inferior del gel.

1.3 Transferencia de las proteínas del gel a la membrana de nitrocelulosa.

El papel filtro y la membrana de nitrocelulosa tendrán las mismas dimensiones del gel, el papel filtro, la esponja y la membrana de nitrocelulosa se mojarán en buffer de transferencia. Se creará el “sándwich de transferencia” y se pondrá en el aparato de transferencia que debe mantenerse a una temperatura de 4°C, se adicionará buffer de transferencia hasta que el sándwich quede cubierto por completo, los electrodos se pondrán de modo que la membrana de nitrocelulosa quede entre el gel y el electrodo positivo. La transferencia se hará durante 17 horas a 30V.

2 Inmunodetección

La membrana se bloqueará con leche descremada al 2% durante 2 horas, se añadirá el anticuerpo primario en albúmina

de suero bovino (BSA) al 5%, y se incubará durante la noche a 4°C en un agitador, se usaran anticuerpos específicos contra las proteínas conjugados con HRP (*Horseradish peroxidase*) o AP (*Alkaline phosphatase*), posteriormente a temperatura ambiente y en un agitador se lavara la membrana 3 veces con TBST por 5 minutos cada vez, luego se añadirá el anticuerpo secundario en leche descremada al 2% en TBST, se incubará durante 2 hora y luego se lavará 3 veces la membrana con TBST durante 5 minutos cada vez, finalmente se prepara la mezcla de un sustrato quimioluminiscente ECL (Thermo Scientific™), se incubará la membrana durante 1-2 minutos y se visualizará el resultado en el cuarto oscuro [20].

3 Análisis del efecto de la infección

Para determinar si hay diferencia significativa en la expresión de los marcadores moleculares a evaluar se usará un análisis de varianza (ANOVA) en el software R *project* y las gráficas en el software graphpad prism®.

IV. RESULTADOS ESPERADOS

Se espera evaluar la expresión de las proteínas BMP4 y CEP63 en un modelo prenatal murino, además, observar cambios en la expresión de las mismas al repetir la técnica de *Western Blot* en el modelo prenatal infectado con ZIKV (Figura 1). Esta variación se cuantificará para mostrar de forma más precisa el efecto del virus sobre estos marcadores que podrían estar involucrados con anomalías como la microcefalia

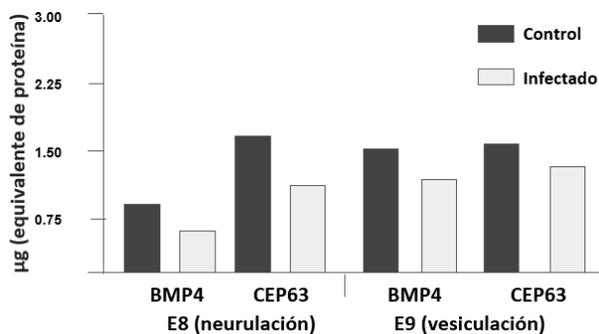


Figura 1. Efecto del virus en la expresión de las proteínas BMP4 y CEP63.

Este estudio aportará conocimiento sobre la patogénesis del virus, lo cual ayudará a comprender sus efectos sobre los marcadores moleculares involucrados en el neurodesarrollo, permitiendo así dar algunas bases para el manejo y tratamiento de esta infección durante la gestación.

Teniendo en cuenta las implicaciones en la salud, principalmente en recién nacidos cuyas madres adquirieron la infección en su periodo de gestación, el desarrollo de este proyecto tendrá gran impacto social a través del objetivo de desarrollo sostenible de salud y bienestar al aportar información sobre la patogénesis del ZIKV, estos resultados podrían ser la base de la evaluación de marcadores en un modelo prenatal de infección en humanos, además de aportar el conocimiento necesario para generar posibles blancos terapéuticos.

V. CONCLUSIONES

Este estudio aportará información sobre los cambios en la expresión de los marcadores moleculares BMP4 y CEP63, dando las bases para una futura evaluación de otros marcadores asociados al neurodesarrollo en un modelo prenatal infectado con ZIKV.

REFERENCIAS

- [1] E. T. Pimienta-Rodríguez and R. Fando- Calzada, "Vacunas experimentales contra el Zika," *Rev. CENIC. Ciencias Biológicas*, vol. 47, no. 3, 2016.
- [2] N. Zoghbi and Á. López, "La llegada del virus zika a venezuela y su posible huella en la salud materna-infantil. una discusión impostergable," *Comunidad y Salud*, vol. 14, no. 1, pp. 67–73, 2016.
- [3] A. D. Haddow *et al.*, "Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 6, no. 2, p. e1477, 2012.
- [4] V. Fernández-Sánchez and H. Mayani, "BMP4: Importante regulador del desarrollo embrionario y la hematopoyesis," *Rev. Investig. clínica*, vol. 60, no. 1, pp. 68–74, 2008.
- [5] M. Marjanović *et al.*, "CEP63 deficiency promotes p53-dependent microcephaly and reveals a role for the centrosome in meiotic recombination," *Nat. Commun.*, vol. 6, p. 7676, Jul. 2015.
- [6] J. Pruszkak, *Neural surface antigens: from basic biology towards biomedical applications*. Academic Press, 2015.
- [7] E. Shimokita and Y. Takahashi, "Secondary neurulation: Fate-mapping and gene manipulation of the neural tube in tail bud," *Dev. Growth Differ.*, vol. 53, no. 3, pp. 401–410, 2011.
- [8] V. Sikka *et al.*, "The emergence of Zika virus as a global health security threat: a review and a consensus statement of the INDUSEM Joint Working Group (JWG)," *J. Glob. Infect. Dis.*, vol. 8, no. 1, p. 3, 2016.
- [9] M. L. Barjas-Castro *et al.*, "Probable transfusion-transmitted Zika virus in Brazil," *Transfusion*, vol. 56, no. 7, pp. 1684–1688, 2016.
- [10] M. M. Magnus *et al.*, "Risk of Zika virus transmission by blood donations in Brazil," *Hematol. Transfus. Cell Ther.*, 2018.
- [11] D. Musso, C. Roche, E. Robin, T. Nhan, A. Teissier, and V.-M. Cao-Lormeau, "Potential sexual transmission of Zika virus," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 21, no. 2, p. 359, 2015.
- [12] S. Thangamani, J. Huang, C. E. Hart, H. Guzman, and R. B. Tesh, "Vertical transmission of Zika virus in *Aedes aegypti* mosquitoes," *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 95, no. 5, pp. 1169–1173, 2016.
- [13] G. C. Valentine *et al.*, "Timing of Gestational Exposure to Zika Virus is Associated with Postnatal Growth Restriction in a Murine Model," *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2018.
- [14] K.-Y. Wu *et al.*, "Vertical transmission of Zika virus targeting the radial glial cells affects cortex development of offspring mice," *Cell Res.*, vol. 26, no. 6, p. 645, 2016.
- [15] M. Besnard, S. Lastere, A. Teissier, V. M. Cao-Lormeau, and D. Musso, "Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014," *Eurosurveillance*, vol. 19, no. 13, p. 20751, 2014.
- [16] A. B. Rosenfeld, D. J. Doobin, A. L. Warren, V. R. Racaniello, and R. B. Vallee, "Replication of early and recent Zika virus isolates throughout mouse brain development," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 114, no. 46, pp. 12273–12278, 2017.
- [17] J. D. Beckham, D. M. Pastula, A. Massey, and K. L. Tyler, "Zika virus as an emerging global pathogen: neurological complications of Zika virus," *JAMA Neurol.*, vol. 73, no. 7, pp. 875–879, 2016.
- [18] A. Thawani, D. Sirohi, R. J. Kuhn, and D. M. Fekete, "Zika Virus Can Strongly Infect and Disrupt Secondary Organizers in the

Ventricular Zone of the Embryonic Chicken Brain,” *Cell Rep.*, vol. 23, no. 3, pp. 692–700, 2018.

- [19] B. L. Hogan, “Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development,” *Genes Dev.*, vol. 10, no. 13, pp. 1580–1594, 1996.
- [20] T. Mahmood and P.-C. Yang, “Western blot: technique, theory, and trouble shooting,” *N. Am. J. Med. Sci.*, vol. 4, no. 9, p. 429, 2012