



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**“Regulación de la expresión de miRNAs por el virus del Zika en el desarrollo del Sistema Nervioso Central”**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias Bioquímicas**

**PRESENTA**

**Biol. María Elizabeth Santana Román**

**Tutor principal: Dra. Leonor Pérez Martínez  
Instituto de Biotecnología-UNAM**

**Comité tutorial**

**Dra. Rosa Victoria Pando Robles  
Instituto Nacional de Salud Pública**

**Dr. Iván Velasco Velázquez  
Instituto de Fisiología Celular-UNAM**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**Jurado**

**Dra. Susana López Charretón**

**Dra. Hilda Lomeli Buyoli**

**Dr. Ramón González García Conde**

**Dra. Magdalena Guerra Crespo**

**Dra. Svetlana Shiskova**

## **Dedicatoria**

Con todo mi cariño y admiración

A mi mamá, por motivarme siempre a seguir adelante, por educarme con el ejemplo a nunca darme por vencida. Gracias por el amor y el apoyo que me has brindado siempre.

A mi papá, por los consejos, las enseñanzas y el amor que me brindaste, aunque pasen los años aún los tengo presentes ¡GRACIAS!

A mis hermanos Felipe y Estefanía por todo el apoyo incondicional que siempre me han brindado, por su amor y por ser un ejemplo para mí de constancia y superación.

## **Agradecimientos**

A la Dra. Leonor Pérez, por la oportunidad que me brindó para realizar mi tesis de maestría bajo su dirección y asesoría.

Al Dr. Gustavo Pedraza, por los comentarios al proyecto durante los seminarios de grupo.

A mi comité tutorial formado por la Dra. Victoria Pando y el Dr. Iván Velasco, por los comentarios y sugerencias aportados al proyecto.

A los miembros del jurado integrado por la Dra. Susana López, Hilda Lomeli, Ramón González, Magdalena Guerra y Svetlana Shiskova, por la revisión y los comentarios que ayudaron a mejorar esta tesis.

A la Dra. Itzel Escobedo, por la ayuda en la estandarización de la infección con el virus Zika en embriones murinos.

A Oswaldo López por su apoyo en el laboratorio.

A Nilda Sánchez por enseñarme el ensayo de RT-qPCR para miRNAs.

A CONACYT por otorgarme la beca con el no. 856866 que me permitió realizar mis estudios de Maestría en el Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Al Programa de Apoyo a los Estudiantes de Posgrado (PAEP) por el financiamiento para asistir a congresos nacionales.

A mis amigos del laboratorio de neuroinmunobiología: Cristina, Jorgito, Eladio, Luis, Angélica, Elisa, Jhon, Carlos, Leo, por todos los momentos compartidos.

A mis amigos de la maestría Thalía, Uriel y Edgar por todas las risas, las vivencias y el aprendizaje. La maestría fue inolvidable gracias a ustedes.

A mi familia por creer en mí y apoyarme siempre.

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Neuroinmunobiología del departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la tutoría de la Dra. Leonor Pérez Martínez. Este proyecto se realizó gracias al financiamiento otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT IFC 2016-2282) y del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN213119, IN213316, IN211719, IN212316).

## Índice

Lista de abreviaturas.....	8
Índice de figuras.....	10
Índice de tablas .....	11
Resumen .....	12
Abstract .....	13
1.-INTRODUCCIÓN .....	1
1.1.-Generalidades del virus Zika .....	1
1.1.1.- Ciclo de replicación de ZIKV.....	3
1.2.-Manifestaciones clínicas de la infección por ZIKV.....	4
1.3.-Modelos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> en el estudio del SCAZ .....	5
1.4.- miRNAS como reguladores de la neurogénesis.....	9
1.5.-miRNAs y virus neurotrópicos .....	12
2.- ANTECEDENTES.....	14
2.1- Regulación de la expresión de miRNAs.....	19
2.2.-Respuesta antiviral e inflamatoria inducida por ZIKV y su asociación con la proliferación celular.....	21
3.- JUSTIFICACIÓN.....	23
4.-HIPÓTESIS.....	23
5.-OBJETIVO GENERAL.....	23
5.1.-Objetivos específicos .....	23
6.-METODOLOGÍA .....	24
6.1.- Cultivo de líneas celulares .....	24
6.2.-Propagación de ZIKV .....	24
6.3.-Titulación del virus Zika .....	24
6.4.-Ensayos de inmunofluorescencia .....	25
6.5.- Extracción de RNA .....	25
6.6.- RT y PCRs .....	26
6.7.-Infección de líneas celulares .....	26
6.8.-Infección en ratones neonatos C57BL/6 .....	26
6.9.- Tinción de Nissl.....	27
6.10.- Protocolo de infección en embriones de E12.5 de la cepa C57BL/6.....	27
6.11.- Ensayos tipo Western-blot.....	28
6.12.- Determinación de la carga viral .....	28
6.13.-Ensayos de RT-qPCR para miRNAs .....	30
6.14.-Análisis de las vías de señalización de miRNAs .....	31

6.15.- Análisis estadístico .....	32
<b>7.0.- RESULTADOS .....</b>	<b>33</b>
7.1.-ZIKV infecta a las células N2A e induce su diferenciación.....	33
7.2.-La línea celular mHypoE-N1 es susceptible a la infección con ZIKV .....	35
7.3.- La infección con ZIKV aumenta la expresión de los miRNA-125a y miRNA-7 en células mHypoE-N1 .....	37
7.4.- Los miRNA-125a y miRNA-7 modulan vías celulares relacionadas con inflamación .....	37
7.5.- La infección con ZIKV de células mHypoE-N1 no cambia la acumulación de las formas fosforiladas de FT relacionados con inflamación y respuesta antiviral.....	41
7.6.- Los neonatos murinos de la cepa C57BL/6 recapitulan la patogénesis durante la infección con ZIKV.....	43
7.7.- Los embriones de la cepa C57BL/6 son susceptibles la infección con ZIKV .....	45
<b>8.-DISCUSIÓN .....</b>	<b>49</b>
<b>9.-CONCLUSIÓN .....</b>	<b>54</b>
<b>10.-PERSPECTIVAS .....</b>	<b>54</b>
<b>11.- MATERIALES Y MÉTODOS SUPLEMENTARIOS.....</b>	<b>55</b>
11.1.-Purificación de partículas virales y tinción con plata .....	55
<b>12. -FIGURAS SUPLEMENTARIAS .....</b>	<b>56</b>
12.1.-Producción y caracterización de ZIKV .....	56
12.2.-Estandarización de la infección con ZIKV en embriones murinos de la cepa C57BL/6 .....	56
<b>13.- Tablas suplementarias.....</b>	<b>57</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>59</b>



## Lista de abreviaturas

<b>Ang1</b>	Angiopoyetina 1
<b>AXL</b>	Receptor de tirosina cinasa
<b>BH</b>	Barrera hematoencefálica
<b>CA16</b>	Virus coxsackie A16
<b>CTN</b>	Células troncales neurales
<b>CTE</b>	Células troncales embrionarias
<b>CNE</b>	Células neuroepiteliales
<b>CPN</b>	Células progenitoras neurales
<b>CRG</b>	Células radiales de la glia
<b>DLL4</b>	Ligando canónico tipo delta de Notch
<b>dpi</b>	Días post-infección
<b>E</b>	Día embrionario
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidermal
<b>ELA</b>	Esclerosis lateral amiotrófica
<b>FGF2</b>	Factor de crecimiento básico de fibroblastos
<b>FIK1</b>	Cinasa fetal del hígado 1
<b>FT</b>	Factor de transcripción
<b>GDNF</b>	Factor neurotrófico derivado de la glía
<b>GFAP</b>	Proteína ácida fibrilar glial
<b>hpi</b>	Horas post-infección
<b>IFN</b>	Interferón
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1 beta
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IRF</b>	Factor regulador de interferón
<b>LA</b>	Líquido amniótico
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>miRNA</b>	microRNA
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
<b>nt</b>	Nucleótido
<b>OMS</b>	Organización mundial de salud

**P** Día postnatal

**PI** Progenitoras intermedias

**PN** Placa neural

**RISC** Complejo silenciador inducido por RNA

**RNA<sub>dc</sub>** RNA de doble cadena

**RNA<sub>m</sub>** Ácido ribonucleico mensajero

**RNF11** Proteína 11

**SCAZ** Síndrome congénito asociado a Zika

**Smo** Receptor de membrana "smoothened"

**SNC** Sistema nervioso central

**STAT1** Transductor de señal y activador de la transcripción 1

**STAT3** Transductor de señal y activador de la transcripción 3

**TIM1** Receptor de mucina de inmunoglobulina de células T 1

**TLR3** Receptor tipo toll 3

**TN** Tubo neural

**TNF** Factor de necrosis tumoral

**TUJ1**  $\beta$ -tubulina clase III específica de neuronas

**VEJ** Virus de la encefalitis japonesa

**ZIKV** Virus Zika

**ZSV** Zona subventricular

**ZV** Zona ventricular

**$\mu$ g** Microgramos

**$\mu$ L** Microlitros

**UPR** Unfolded protein response

**UTR** Regiones no traducidas

## Índice de figuras

<b>Figura 1.-</b> Dispersión de ZIKV por los continentes.....	1
<b>Figura 2.-</b> Estructura de ZIKV.....	2
<b>Figura 3.-</b> Genoma y poliproteína de ZIKV.....	2
<b>Figura 4.-</b> Ciclo de replicación de ZIKV.....	4
<b>Figura 5.-</b> Neurogénesis en el SNC embrionario de vertebrados.....	6
<b>Figura 6.-</b> Generación y procesamiento de miRNAs.....	10
<b>Figura 7.-</b> Expresión de miRNAs durante el desarrollo neural embrionario de ratón.....	12
<b>Figura 8.-</b> Análisis transcriptómico de miRNAs durante el desarrollo embrionario hipotalámico murino.....	14
<b>Figura 9.-</b> Función del miRNA-7 en el sistema nervioso central.....	16
<b>Figura 10.-</b> Funciones del miRNA-181a en el sistema nervioso central.....	17
<b>Figura 11.-</b> Funciones de los miRNAs-125a y miRNA-125b en el sistema nervioso central.....	19
<b>Figura 12.-</b> Reconocimiento de arbovirus por TLRs y translocación nuclear de IRFs/NF-κB.....	22
<b>Figura 13.-</b> Titulación de ZIKV por el método de placas líticas.....	25
<b>Figura 14.-</b> Diseño experimental de la inoculación de ZIKV en neonatos del día postnatal 3.....	26
<b>Figura 15.-</b> Técnica de inoculación en embriones C57BL/6.....	28
<b>Figura 16.-</b> Estrategia experimental para la determinación de la carga viral.....	30
<b>Figura 17.-</b> Diagrama de Venn.....	31
<b>Figura 18.-</b> El ZIKV induce la diferenciación de las N2A.....	34
<b>Figura 19.-</b> La infección de las células N2A con ZIKV no afecta la abundancia de los miRNAs-125a, miRNA-125b miRNA-7 y miRNA-181 <sup>a</sup> .....	35
<b>Figura 20.-</b> Las células mHypoE-N1 son susceptibles a la infección con ZIKV.....	36
<b>Figura 21.-</b> El ZIKV induce cambios en la expresión de los miRNAs-125a y miRNA7.....	37
<b>Figura 22.-</b> El miRNA-7 modula vías implicadas en metabolismo celular, respuesta inmune y neurodesarrollo.....	39
<b>Figura 23.-</b> El miRNA-125a modula vías de respuesta inmune innata (TLR), MAP cinasas y estrés oxidativo.....	40
<b>Figura.-24.-</b> La infección con ZIKV no induce el aumento en los niveles de pSTAT3.....	42
<b>Figura 25.-</b> La infección de células mHypoE-N1 con ZIKV no cambia los niveles de p65 y pIRF3.....	43
<b>Figura 26.-</b> Los neonatos C57BL/6 son susceptibles a la infección con ZIKV.....	45
<b>Figura 27.-</b> Los embriones de la cepa C57BL/6 son permisivos a la infección con ZIKV.....	47
<b>Figura 28.-</b> La infección con ZIKV en embriones C57BL/6 no induce cambios en la expresión de los miRNAs-125a y -181a.....	47
<b>Figura 29.-</b> La abundancia de los miRNAs-125a y -181a se modifica con respecto a la carga viral del embrión.....	48
<b>Figura S1.-</b> Cultivo de C6/36 no infectadas e infectadas con ZIKV MR766 linaje africano.....	56

**Figura S2.-Estandarización de la infección con ZIKV en embriones murinos de la cepa C57BL/6.....57**

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.- Mecanismos celulares implicados en el desarrollo de microcefalia durante la infección con ZIKV.....</b>	<b>9</b>
<b>Tabla 2.-Los miRNA-181b, miRNA-125a, miRNA-125b y miRNA-7 contienen en su región promotora sitios de unión a factores de transcripción relacionados con vías inflamatorias y antivirales.....</b>	<b>20</b>
<b>Tabla 3.-Lista de oligonucleótidos usados para la qPCR de los miRNAs y el control interno U6.....</b>	<b>31</b>
<b>Tabla 4.-Carga viral de los embriones infectados con ZIKV.....</b>	<b>46</b>
<b>Tabla S1.-Análisis de los sitios de unión de los miRNA-125a y miRNA-7 al genoma de ZIKV con el programa miRanda.....</b>	<b>57</b>
<b>Tabla S2.-Oligonucleótidos utilizados para los PCRs punto final.....</b>	<b>57</b>
<b>Tabla S3.-Oligonucleótidos utilizados para la reacción de RT de los miRNAs-125a, miRNA-125b, miRNA-7, miRNA-181a y el control interno U6.....</b>	<b>58</b>
<b>Tabla S4.-Anticuerpos utilizados para los ensayos tipo western-blot.....</b>	<b>58</b>

## Resumen

El Sistema Nervioso Central (SNC) está compuesto por neuronas y células gliales. Estas células son originadas desde el neuroepitelio, donde residen las células troncales neuroepiteliales (CNE). Las CNE se caracterizan por tener la capacidad de autorrenovarse y en respuesta a señales específicas dan lugar a células progenitoras neurales (CPN) que posteriormente se diferencian a neuronas o células de la glía. En los últimos años se ha demostrado que la expresión génica durante el desarrollo del SNC puede regularse a nivel postranscripcional mediante RNAs pequeños no codificantes, llamados microRNAs (miRNAs). Recientemente, se ha descrito a nivel mundial un aumento considerable en los casos de microcefalia asociados a la infección por el virus del Zika (ZIKV). Este virus de RNA infecta a células de origen neural causando desregulación en la expresión de miRNAs, aumento en la apoptosis, reducción de la proliferación de CPN e inhibición de la diferenciación celular. Además, la infección por ZIKV induce un aumento en la expresión de receptores tipo Toll (TLR) como TLR 3, 4 y 7, activando factores de transcripción como IRF3, IRF7 y NF- $\kappa$ B. De manera interesante, genes de varios miRNAs contienen en su región promotora sitios de unión para factores de transcripción como IRFs, NF- $\kappa$ B y STATs.

El presente estudio tuvo como objetivo determinar si el ZIKV modula la expresión de miRNAs que han sido identificados previamente en nuestro grupo de trabajo y que están involucrados en el desarrollo del SNC. Para ello se establecieron modelos de estudio tanto *in vitro* como *in vivo*. La estrategia *in vitro* incluyó el uso de las líneas celulares neurales mHypoE-N1 y N2A que se infectaron con el ZIKV MR766 (linaje africano) y se midió la abundancia de los miRNA-125a, miRNA-125b, miRNA-181a y miRNA-7 por ensayos de RT-qPCR. Asimismo, se determinó la acumulación de las formas fosforiladas de IRF3, NF- $\kappa$ B/p65 y STAT3 por ensayos tipo western-blot. Finalmente, se establecieron dos modelos de infección *in vivo*: la inoculación de ZIKV directamente en el líquido amniótico de ratonas gestantes de la cepa C57BL/6 para infectar embriones del día embrionario 12.5 y la inoculación intracraneal de ZIKV en neonatos murinos del día postnatal 3.

Los estudios *in vitro* demostraron que el ZIKV aumenta la abundancia de los miRNA-125a y miRNA-7 en las células mHypoEN1 de manera dependiente del tiempo post-infección en comparación con las células no infectadas. Sin embargo, no se observaron cambios en la acumulación de las formas fosforiladas de las proteínas IRF3, NF- $\kappa$ B/p65 y STAT3. Los experimentos de infección *in vivo* en embriones de ratón de la cepa C57BL/6 permitieron determinar la abundancia de los miRNA-125a y miRNA-181a en función de la carga viral por embrión.

En conclusión, el ZIKV afecta la expresión de miRNAs que juegan un papel importante en la proliferación celular durante el desarrollo del SNC. Sin embargo, la vía a través de la cual se activan los miRNAs en respuesta a ZIKV aún queda por determinarse.

Palabras clave: ZIKV, miRNAs, receptores tipo toll e IRFs.

## Abstract

The Central Nervous System (CNS) is composed of neurons and glia cells. These cells are derived from the neuroepithelium where the neuroepithelial cells (CNE) reside; they are characterized by their capacity to self-renew and in response to specific signals give rise to neural progenitor cells (NPCs) that subsequently differentiate into neurons or glia cells. In recent years, it has been shown that gene expression during CNS development can be regulated at the post-transcriptional level by small non-coding RNAs, called microRNAs (miRNAs). Recently, a considerable increase in microcephaly cases associated with Zika virus (ZIKV) infection has been reported worldwide. This RNA+ virus infects NPC, causing deregulation in miRNAs expression, increase in apoptosis, reduction in the NPC proliferation and inhibition of cell differentiation. In addition, ZIKV infection results in up-regulation of the expression of several toll-like receptors (TLR), such as TLR 3, 4 and 7, and activation of the IRF3, IRF7 and NF- $\kappa$ B transcription factors. Interestingly, promoter region of several miRNA genes contain binding elements to IRFs, NF- $\kappa$ B and STATs transcription factors.

The aim of this study was to determine whether the ZIKV affects the expression of miRNAs important for the CNS development. For the *in vitro* studies, the neuronal cell lines mHypoE-N1 and N2A were infected with the ZIKV MR766 (African lineage), and the abundance of miRNA-125a, miRNA-125b, miRNA-181a and miRNA-7 was determined by RT-qPCR assays. In addition, the accumulation of phosphorylated IRF3, NF- $\kappa$ B/p65 and STAT3 proteins was evaluated by western-blot assays. Furthermore, *in vivo* infection models were established: ZIKV was inoculated directly to the amniotic fluid of C57BL/6 pregnant mice to infect embryos from postnatal day 12.5 and alternatively, we performed intracranial ZIKV inoculation in postnatal day 3 neonates.

Our *in vitro* studies demonstrated that ZIKV infection results in up-regulation of the abundance of miRNA-125a and miRNA-7 in a time-dependent manner compared to uninfected cells. However, no changes were observed in the accumulation of the phosphorylated forms of the IRF3, NF- $\kappa$ B/p65 and STAT3 proteins. The *in vivo* infection in mouse embryos of the C57BL/6 strain allow to determine how the abundance of miRNA-125a and miRNA-181a depends on the viral load per embryo.

In conclusion, the ZIKV infection results in up-regulation of miRNAs that play an important role in cell proliferation during CNS development. However, the pathway through which these miRNAs are activated in response to ZIKV remains as an open question.

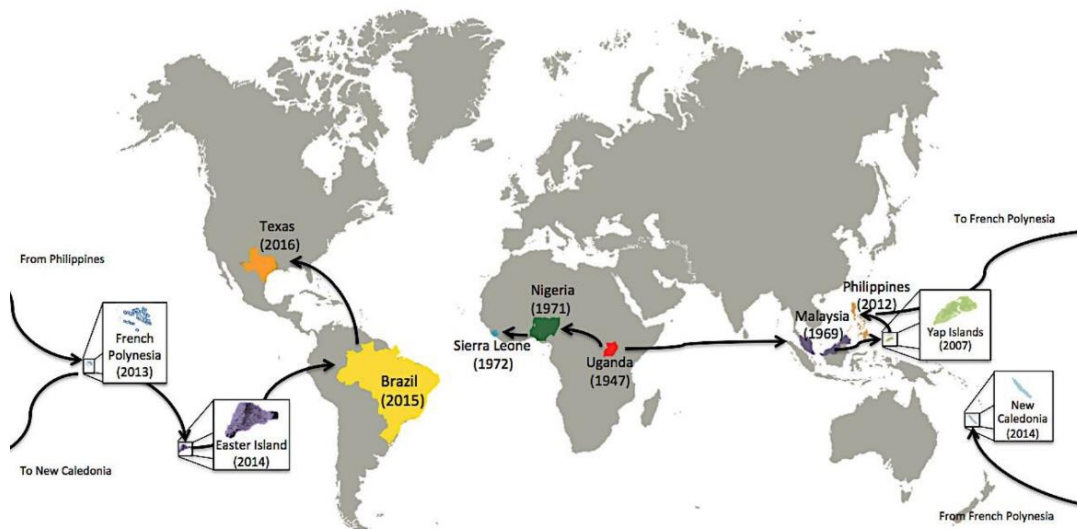
Key words: ZIKV, miRNAs, toll-like receptors and IRFs



# 1.-INTRODUCCIÓN

## 1.1.-Generalidades del virus Zika

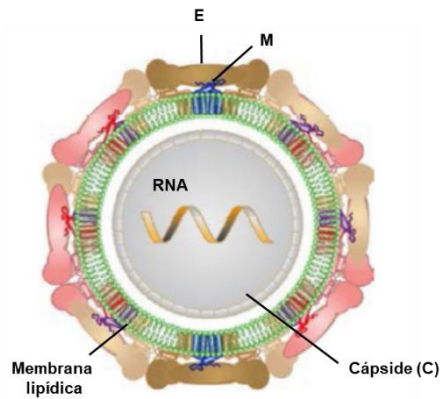
El virus Zika (ZIKV) pertenece al grupo de los arbovirus, es decir, son virus transmitidos por artrópodos del género *Aedes*, principalmente por las especies *A. aegypti* y *A. albopictus* (Bhatt et al., 2013; Chang et al., 2016). ZIKV forma parte la familia *Flaviviridae*, del género *Flavivirus* y es el agente causal de diversas manifestaciones clínicas en personas infectadas. El ZIKV fue descubierto en África en 1947, en el bosque de Zika, Uganda. Años después, entre 1960 y 1970 el virus pasó del continente africano al continente asiático; después, en el año 2007 llegó a la isla de Yap donde infectó a dos tercios de la población. En el año 2012 el ZIKV entró a las islas Filipinas, en 2013 a la Polinesia Francesa y siguió diseminándose por las islas del Pacífico. En el año 2015 se registró por primera vez en el continente americano entrando por Brasil y dispersándose al norte de América. Finalmente, en el año 2016 llegó a México y Texas (Figura 1) (Chang et al., 2016). El ZIKV se ha clasificado en dos linajes, el asiático y el africano. Los virus del linaje asiático son los que circulan actualmente en el continente americano (Lanciotti et al., 2017) y se asocian con el aumento en los casos de microcefalia en Brasil (OMS, 2016).



**Figura 1.-Dispersión de ZIKV por los continentes.** En color rojo se muestra Uganda que fue el país donde se descubrió el ZIKV en el año de 1947, se observa su posterior dispersión por el mundo hasta llegar al continente americano en el 2015. Brasil es el país donde se ha registrado el mayor número de casos de microcefalia asociada a la infección con ZIKV (Tomado de Chang et al., 2016).

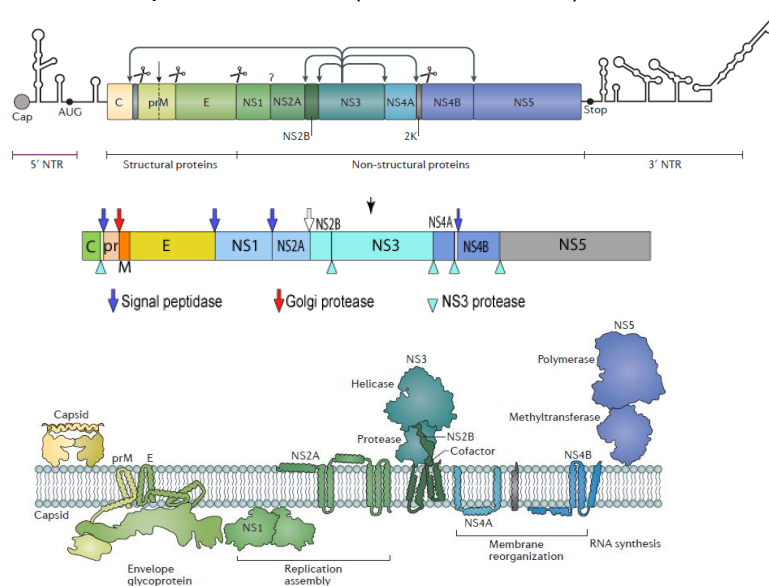
El ZIKV se caracteriza por ser envuelto (presenta una membrana) con un diámetro aproximado de 50 nm. La partícula viral madura está formada por tres proteínas estructurales: la proteína de membrana (M) que se origina desde su precursor de pre-membrana (prM) por un procesamiento proteolítico, la proteína de envoltura (E) que está en forma de dímero y la proteína de la cápside (C) que interacciona con el genoma viral formando una nucleocápside icosaédrica. Las proteínas M y E están ancladas a una bicapa de lípidos derivada del retículo endoplásmico de la célula huésped, esta bicapa lipídica rodea a la nucleocápside (Saiz et al., 2016) (Figura 2).





**Figura 2.-Estructura de ZIKV.** Se observa la partícula madura de ZIKV que incluye a la proteína E en la superficie, esquematizada en colores arena, marrón y rosa. La proteína M se localiza debajo de la proteína E y está representada en colores violeta, azul y rojo; tanto E como M se encuentran ancladas a la membrana lipídica. La proteína C interacciona con el RNA viral para formar la nucleocápside (Tomado de Rey et al., 2018).

El ZIKV tiene un genoma de RNA de aproximadamente 11 kb, es de cadena sencilla, con polaridad positiva, con una estructura tipo “cap” en el extremo 5’, presenta un único marco de lectura abierto (Song et al., 2017) y está flanqueado por regiones no traducidas en los extremos 5’ y 3’ (Zhong-Yu et al., 2019). El RNA viral se traduce en los ribosomas asociados al retículo endoplásmico rugoso dependiente del “cap”, originando una poliproteína transmembranal asociada al retículo endoplásmico. La poliproteína es procesada por una proteasa celular (furina), por peptidasas señal de la célula y por una proteasa viral (NS3/NS2B) de manera co-traduccional y postraduccional, originando tres proteínas estructurales y siete proteínas no estructurales (Neufeldt et al., 2018). Las proteínas no estructurales son: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 (Figura 3) que son encargadas de la replicación del RNA viral, del ensamblaje de nuevos virus y de la evasión de la respuesta inmune (Saiz et al., 2016).



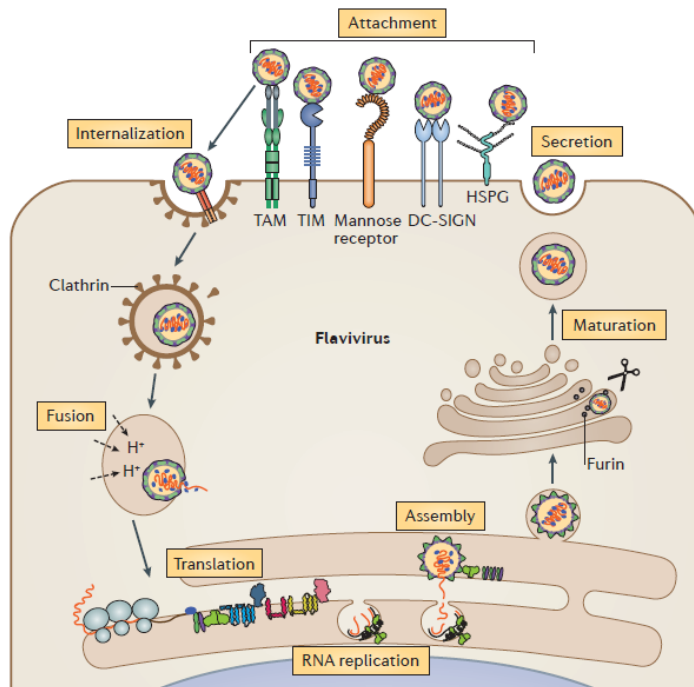
**Figura 3.-Genoma y poliproteína de ZIKV.** El ZIKV contiene un genoma de RNA de cadena sencilla con polaridad positiva, flanqueado por regiones no traducidas en los extremos 5’ y 3’. El RNA se traduce a una poliproteína transmembranal que es procesada por una proteasa celular (furina), por peptidasas señal de la célula y por una proteasa viral (NS3/NS2B) en tres proteínas estructurales y siete proteínas no estructurales, en la imagen se señalan los sitios de corte para el procesamiento de la poliproteína. NTR, non translated región (Tomado de Mazeaud et al., 2018).

### 1.1.1.- Ciclo de replicación de ZIKV

El ZIKV presenta un amplio tropismo celular ya que infecta trofoblastos, células de Hofbauer, células epiteliales amnióticas (Tabata et al., 2016), fibroblastos dérmicos, queratinocitos epidérmicos, células dendríticas inmaduras (Hamel et al., 2015), astrocitos, células progenitoras neurales (CPN), neuronas (Pol et al., 2017) y células radiales de la glía (Brault et al., 2016). El reconocimiento de ZIKV con su célula blanco es mediado por la proteína viral E y por receptores de la familia de lectinas tipo C, como la molécula de adhesión intercelular 3 específica de células dendríticas (DC-SIGN o CD209) (Hamel et al., 2015). Además, se ha descrito que ZIKV entra a las células blanco mediante "mimetismo apoptótico; en este modo de entrada los lípidos cargados negativamente (fosfatidilserina) que se encuentran en la membrana viral son reconocidos por receptores de fosfatidilserina transmembrana TAM (Tyro3, Axl y Mer) y TIM1 (inmunoglobulina de células T y dominio de mucina), los cuales, en condiciones normales se encuentran en las células fagocíticas y reconocen a la fosfatidilserina de las células apoptóticas (Agreli et al., 2019; Tabata et al., 2016). Posterior al reconocimiento, el virus es internalizado por endocitosis mediada por clatrina; después, el endosoma madura a un endosoma tardío y se acidifica por acción de la bomba V-ATPasa, desencadenando un cambio estructural e irreversible en la proteína E (se forman homotrímeros), por lo cual, hay fusión entre la membrana viral y la del endosoma (Rey et al., 2018; Yu et al., 2008) liberando el RNA de ZIKV en el citoplasma que es traducido a una poliproteína y replicado en el retículo endoplásmico rugoso (Neufeldt et al., 2018).

Las proteínas NS4A, NS4B, NS2A y NS1 remodelan la membrana del retículo endoplásmico rugoso, creando invaginaciones que forman conjuntos de vesículas que se conocen como fábricas de replicación (Zhong-Yu et al., 2019). Dentro de las fábricas de replicación se encuentra la proteína NS3 que tiene actividad de NTPasa, NS5 que posee actividades de guanililtransferasa, guanina-N7-metiltransferasa y nucleósido-2'-O-metiltransferasa, ambas proteínas son necesarias para la adición del "cap" en el extremo 5' y la metilación del genoma viral; además, NS5 es una RNA polimerasa dependiente de RNA responsable de la síntesis del genoma de ZIKV (Cortese et al., 2017). La replicación del RNA viral se lleva a cabo mediante la circularización del mismo, formando una estructura tipo "asa" debido a las interacciones de largo alcance entre las regiones 5' y 3'. NS5 sintetiza una molécula de RNA de cadena negativa desde el RNA de cadena positiva, formándose un RNA de doble cadena que se conoce como intermedio replicativo. Posteriormente, NS3 que presenta actividad de helicasa, desenrolla el RNA de doble cadena para desplazar la molécula de RNA positiva, así NS5 sintetiza copias de RNA de cadena positiva usando como molde el RNA de cadena negativa. Finalmente, las copias de RNA positivo son usadas en la traducción o en el ensamblado de nuevas partículas virales (Mazeaud et al., 2018).

El ensamblado de las partículas virales comienza cuando la proteína C encapsula el RNA formando una nucleocápside icosaédrica que brota del lumen del retículo endoplásmico, adquiriendo la membrana de este organelo que contiene heterodímeros de las proteínas prM y E, formando así una partícula inmadura de ZIKV (Zhong-Yu et al., 2019; Neufeldt et al., 2018). Una vez que el virión inmaduro brota del retículo endoplásmico es llevado al aparato de Golgi por medio del transporte vesicular, en el trans-golgi, la proteína viral prM es cortada por la proteasa celular furina dando origen al péptido pr, a la proteína M y a la maduración del virus. El virus maduro sale de la célula por exocitosis y en el medio extracelular, que está a pH neutro, el péptido pr se disocia de la proteína E y se origina una partícula viral recubierta por dímeros de la proteína E (Sirohi y Kuhn, 2017) (Figura 4).



**Figura 4.- Ciclo de replicación de ZIKV.** El ZIKV es reconocido en la superficie celular por receptores de la familia DC-SIGN, TIM y TAM, es internalizado por endocitosis mediada por clatrina; después, ocurre la fusión de membranas con la subsecuente liberación del genoma viral que es replicado en el retículo endoplásmico rugoso; también, en este organelo se lleva a cabo el ensamblado de partículas virales, las cuales maduran en el aparato de Golgi por acción de la proteasa celular furina; posteriormente, los viriones maduros son liberados al medio extracelular mediante exocitosis (Tomado de Neufeldt et al., 2018).

Aparte de la transmisión por vector como se ha mencionado anteriormente, ZIKV se transmite por vía sexual, saliva, leche materna, transfusiones de sangre y por transmisión vertical (de la madre al feto) (OMS, 2018), originando diversas manifestaciones clínicas en las personas infectadas.

## 1.2.-Manifestaciones clínicas de la infección por ZIKV

La mayoría de las infecciones con ZIKV son asintomáticas (80%) (Maestre y Fernández-Sesma, 2016); sin embargo, cuando se manifiesta la enfermedad es en forma aguda y autolimitante, en la cual se presenta fiebre, dolor de cabeza, artralgia, mialgia, conjuntivitis y erupción maculopapular. Esta sintomatología puede a menudo confundirse con otras infecciones por arbovirus como dengue o chikungunya (Duffy, 2009). En ocasiones, pueden presentarse manifestaciones más severas donde se incluye el síndrome de Guillain-Barré en adultos y el síndrome congénito asociado con el virus Zika (SCAZ) en recién nacidos, dentro del cual está incluida la microcefalia congénita (Song et al., 2017). El síndrome de Guillain-Barré es una enfermedad neurológica aguda (generalmente reversible) que resulta de la destrucción autoinmune del sistema nervioso periférico, en la cual se presenta parálisis con reflejos disminuidos o ausentes que puede ocasionar la muerte (Chung y Deimling, 2018). En México, la Secretaría de Salud informó que en el año 2017 se presentaron 1,131 casos de síndrome de Guillain-Barré, de los cuales 11 fueron asociados con ZIKV (SS, 2017). En cambio, la microcefalia es un trastorno congénito que se caracteriza por una reducción en la circunferencia occipitofrontal (dos desviaciones estándar por debajo de la media para la edad, sexo y etnia), como resultado

de un menor número de neuronas generadas durante la etapa embrionaria, debido al aumento en la muerte celular, defectos en la proliferación y diferenciación de las células progenitoras neurales (CPN) (Passemard et al., 2013).

Los datos epidemiológicos han establecido una asociación entre el aumento de casos de microcefalia y la infección por ZIKV (Nunes et al., 2016). En octubre de 2015, durante el primer brote de ZIKV en el noreste de Brasil se observó un aumento en la ocurrencia de microcefalia (2,952 casos, OMS) y otros defectos congénitos (Mlakar et al., 2016), registrándose 48 casos por cada 10,000 nacimientos (de Oliveira, 2017). Además, en México, al analizar los reportes de microcefalia durante el período anterior a la introducción de ZIKV se registró una incidencia de 3.7 casos por cada 100,000 nacimientos. Por el otro lado, en el período posterior a la introducción de ZIKV se registraron 11.5 casos por cada 100,000 nacimientos (entre los años 2015-2017), lo que indica un aumento en la tasa de microcefalia de aproximadamente 3 veces (Hernández-Ávila et al., 2018). De acuerdo con datos de la OMS, entre los años 2015 a 2018 se registraron en México, 7,008 mujeres embarazadas e infectadas con ZIKV y a 20 neonatos de estas mujeres se les diagnosticó SCAZ (OMS, 2018).

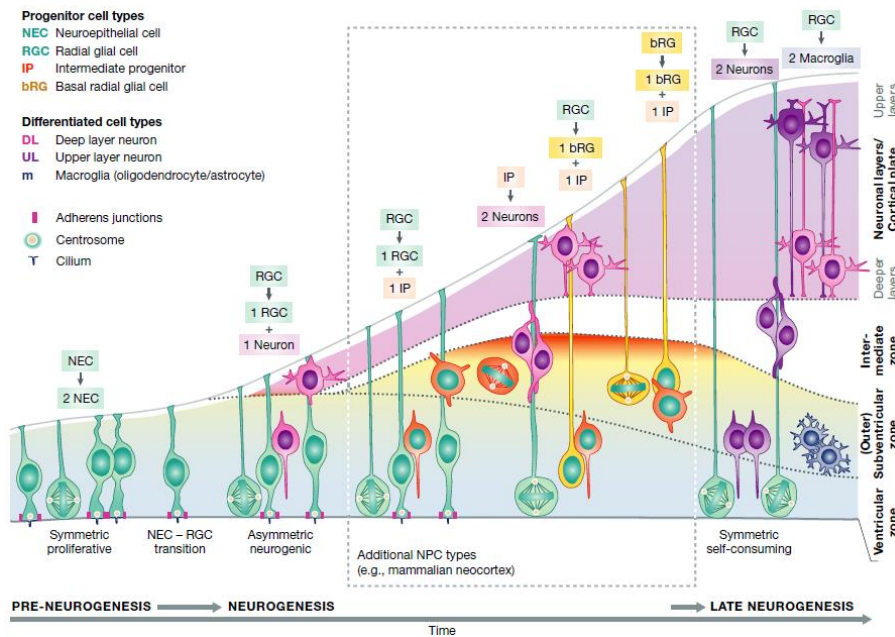
Mientras que los datos epidemiológicos sugirieron una correlación entre la infección con ZIKV y el aumento en los casos de microcefalia, los estudios de caso confirmaron que ZIKV es el agente causal de la microcefalia en los fetos de mujeres embarazadas. En 2016, en Natal, Brasil se reportó el caso de una mujer europea embarazada quien a la semana 13 de gestación presentó fiebre alta, dolor musculoesquelético, dolor retroocular y erupción maculopapular generalizada. Posteriormente, por estudios de ultrasonido, detectaron anomalías fetales desde la semana 28; hacia la semana 32 se observó un retraso en el crecimiento fetal, microcefalia, ventriculomegalia moderada y calcificaciones en el cerebro. El análisis de la autopsia fetal mostró la presencia de ZIKV en el tejido cerebral, hidrocefalia, calcificaciones distróficas multifocales en la corteza, reducción en el tamaño del cerebelo, astrogliosis e inflamación del parénquima cerebral (Mlakar et al., 2016). Estos hallazgos fueron subsecuentemente corroborados al analizar tres fetos de 22-25 semanas de gestación positivos para ZIKV. El análisis histológico mostró microcefalia y meningoencefalitis caracterizada por infiltrado de macrófagos y linfocitos T (Beaufrère et al., 2019). En el caso de los recién nacidos positivos para ZIKV se observa microcefalia y calcificaciones cerebrales (Caires-Júnior et al., 2018).

Debido a la evidencia contundente de la asociación de ZIKV con el aumento en los casos de microcefalia se han desarrollado modelos *in vivo* e *in vitro* para caracterizar los mecanismos celulares y moleculares que participan en SCAZ durante la infección con ZIKV.

### 1.3.-Modelos *in vivo* e *in vitro* en el estudio del SCAZ

La neurogénesis es el proceso por el cual se generan las neuronas e incluye una serie de eventos secuenciales que implican cambios en la expresión génica altamente regulados (Paridaen y Huttner, 2014). Es un evento complejo que involucra la proliferación de células troncales pluripotentes, la migración, la diferenciación celular, la sobrevivencia y la integración de las neuronas a circuitos neuronales (Agirman et al., 2017). Al inicio de la neurogénesis, células multipotentes que residen y se dividen en la zona ventricular del cerebro en desarrollo llamadas células neuroepiteliales (CNE) que son células troncales neurales (CTN) presentan divisiones simétricas o proliferativas para aumentar su número (Florio y Huttner, 2014). Posteriormente, las

CNE cambian su identidad y mediante divisiones asimétricas originan a las células radiales de la glía (CRG), un tipo de CPNs que se localizan en la zona ventricular y generan de manera directa o indirecta a todas las neuronas (Götz y Huttner, 2005; Laguesse et al., 2015). Las CRG se dividen asimétricamente para autorrenovarse y generar una neurona (neurogénesis directa). Conforme avanza la neurogénesis, las CRG dan lugar a otro tipo de CPNs que se ubican en la zona subventricular donde se dividen simétricamente para originar a dos neuronas (neurogénesis indirecta) (Noctor et al., 2004). Más tarde en el desarrollo, las CRG originan a los progenitores gliales que dan lugar a todas las células de la glía (Figura 5) (Paridaen y Huttner, 2014). En consecuencia, el correcto tamaño del cerebro depende en gran medida de la generación de un número apropiado de progenitores neurales que se diferenciarán a los distintos tipos celulares neuronales y gliales.



**Figura 5.-Neurogénesis en el SNC embrionario de vertebrados.** Se muestran las células neuroepiteliales, las cuales son multipotentes y dan origen a CRG mediante divisiones asimétricas; las CRG tienen un potencial de diferenciación menor y presentan divisiones simétricas y asimétricas, originando a otras CPN que bajo divisiones simétricas dan lugar a las neuronas y a células de la glía (Tomado de Paridaen y Huttner, 2014).

En los últimos años, debido al aumento en los casos de SCAZ, se han generado modelos de estudio tanto *in vitro* como *in vivo* para estudiar la patogénesis de ZIKV asociada a microcefalia (Morrison y Diamond, 2017). En este sentido, los modelos *in vitro* han permitido caracterizar algunos de los mecanismos celulares y moleculares que conducen al desarrollo de microcefalia durante la infección con ZIKV. Actualmente, se cuenta con cultivos celulares primarios (bidimensionales) en los cuales las células se aíslan del tejido animal o humano; sin embargo, presentan un tiempo de vida reducido (Pena et al., 2018). De manera equivalente, se tienen cultivos de células inmortalizadas en las que se han introducido mutaciones que les permiten proliferar por periodos de tiempo largos (Tan et al., 2018). También, se han desarrollado modelos tridimensionales (3D) como los organoides y neuroesferas, que son estructuras originadas de CTNs que mimetizan el desarrollo neural embrionario. Así mismo, se han generado células troncales pluripotentes inducidas (iPSC) que pueden diferenciarse a CTNs y CPNs (Liang et al., 2019). En los modelos *in vivo* se cuenta con ratones inmunocompetentes de las cepas C57BL/6,

BALB/c, Swiss webster y los CD1. También, se incluyen ratones inmunocomprometidos generados mediante la desactivación de genes, dentro de los cuales se incluye la cepa A129 que es mutante para los receptores IFN  $\alpha$  y  $\beta$ , la cepa AG129 con mutaciones en los receptores de IFN $\alpha/\beta$  y los C57BL/6 mutantes para los factores reguladores de interferón (IRF) 3, 5 y 7, entre otros (Pena et al., 2018). Los modelos *in vivo* inmunocomprometidos han contribuido al estudio del impacto de ZIKV en el SNC, debido a que hay una mayor susceptibilidad al virus y se exacerban los defectos congénitos relacionados a la infección. Sin embargo, el uso de ratones inmunocomprometidos limita el estudio de la inmunidad del huésped en el desarrollo del CNS durante la infección con ZIKV (Caine et al., 2018).

Las alteraciones en el neurodesarrollo durante la infección con ZIKV son causadas por defectos en la proliferación celular y en la sobrevivencia de las CPN. En cultivos de organoides infectados con ZIKV las CPNs reducen su proliferación, debido a que se detienen en la fase G1 del ciclo celular como resultado de una disminución en el complejo ciclina E/CDK2; por lo cual, disminuyen los marcadores SOX2 y nestina, resultando en una menor producción neuronal (Garcez et al., 2015) que correlaciona con la reducción en el grosor de la zona ventricular, subventricular y de la placa cortical de la corteza cerebral en desarrollo (Cugola et al., 2016). Aparte, las CPNs infectadas con ZIKV muestran un retraso en la salida del ciclo celular, por lo que disminuye la transición de CRG a progenitoras intermedias (PI) (Li et al., 2016). También, se reduce la diferenciación de las CPN a neuronas, evidenciado por una disminución en los marcadores neuronales Neurod1 y Satb2 (Garcez et al., 2017). De manera interesante, las CPNs infectadas con ZIKV se diferencian hacia el linaje de astrocitos, mientras que la expresión de genes relacionados con la diferenciación a oligodendrocitos disminuye (Lossia et al., 2017).

En CPNs humanas (hCPNs) derivadas de hiPSC e infectadas con ZIKV la vía de p53 desencadena apoptosis a través de la activación de caspasa 3, por lo que el uso de inhibidores de p53 promueve la sobrevivencia de las hCPNs infectadas (Zhang et al., 2016). Así mismo, la activación de caspasa 3 se ha observado en cultivos de organoides y neuroesferas humanas infectadas con ZIKV (Garcez et al., 2016). Además, la electroporación del gen que codifica para la proteína E disminuye la sobrevivencia de las CPNs en la corteza embrionaria de ratones de la cepa C57BL6/JNCBS (Bhagat et al., 2018). De manera interesante, se conoce que la elevada tasa de replicación viral que se observa en las CPN infectadas con ZIKV se debe a la abundancia de la proteína Musashi 1 (MSI1). MSI1 es una proteína de unión a RNAm que se expresa en CPNs, su función es mantener la señalización de Notch a través de reprimir la expresión del RNAm de Numb (implicado en diferenciación neuronal) que es un regulador negativo de la vía de Notch, por lo cual se mantiene la pluripotencia de las CPNs (Imai et al., 2001). Sin embargo, en CPNs infectadas, MSI1 se une preferentemente a la región 3' UTR del RNA genómico de ZIKV haciendo más eficiente su traducción a expensas de los RNAm celulares (Chavali et al., 2018; Klein et al., 2018).

La infección con los diferentes linajes de ZIKV y la susceptibilidad del hospedero son factores que determinan el fenotipo de SCAZ. Las CPN de distintos individuos responden diferente a la infección por ZIKV, debido a la expresión diferencial de genes implicados en el ciclo celular, UPR (unfolded protein response), autofagia, replicación y reparación de DNA y la vía de mTOR (vía de señalización que regula el ciclo celular) (Zhang et al., 2016; McGrath et al., 2017). La vía de UPR está modulada por tres receptores que se encuentran unidos a la membrana del retículo endoplásmico como la cinasa del retículo endoplásmico similar a PKR (PERK), la enzima que

requiere inositol 1 (IRE1a) y el factor activador de la transcripción 6 (ATF6) (Alfano et al., 2019). La inducción de UPR por defectos en la traducción de los RNAm y la agregación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico disminuye la producción de progenitores neurales, dando lugar a un fenotipo de microcefalia en embriones murinos (Laguesse et al., 2015a). En la infección con virus de RNA hay remodelación de membranas en el retículo endoplásmico lo que ocasiona estrés, con la subsecuente activación de UPR (Thepparit et al., 2013). El ZIKV activa UPR en CTNs humanas (hCTNs) derivadas de hiPSCs y aumenta la expresión de CHOP que desencadena apoptosis e inhibe la neurogénesis; de igual manera, la activación de UPR se observa en modelos *in vivo* de embriones murinos inmunocompetentes de la cepa NMR, evidenciando que UPR aumenta la neurogénesis directa con respecto a la indirecta, por lo que se genera un menor número de neuronas en la placa cortical (Gladwyn-Ng et al., 2018). También, el estrés al retículo endoplásmico y la activación de UPR se observa en embriones inmunocomprometidos de la cepa AG6 (deficientes para IFN tipo I y II) (Tan et al., 2018);

La inactivación génica de *raptor* (gen asociado a la regulación del complejo mTOR 1) en fetos murinos prolonga el ciclo celular en las CPN y se reduce el número de células que se generan; además, aumenta la expresión de caspasa 3 en las neuronas inmaduras originando un fenotipo de microcefalia (Cloetta et al., 2013). En hCPNs derivadas de iPSC de gemelos dicigotos y discordantes (uno afectado y otro sano) para SCAZ la vía de mTOR regula la liberación de partículas virales en los gemelos afectados por ZIKV, mediante el aumento del transcrito inducible por daño al DNA 4 (DDIT4L) que codifica para una proteína que inhibe a mTOR. También, la inhibición de mTOR con rapamicina aumenta la liberación de partículas de ZIKV, mientras que su activación con bafilomicina suprime la liberación de las partículas virales (Caires-Júnior et al., 2018). Además, las mutaciones de pérdida de función de Akt, que es una proteína cinasa que activa a mTOR ocasionan microcefalia en humanos (Mirzaa et al., 2013). En hCTN la coexpresión de NS4A y NS4B suprimen la fosforilación de Akt, en consecuencia, se reducen los niveles de mTOR fosforilado y se activa autofagia que favorece la replicación viral en las hCTN e inhibe la neurogénesis (Liang et al., 2017); mientras que, la inhibición de la autofagia con fármacos específicos disminuye la progenie viral de ZIKV en células de fibroblastos (Hamel et al., 2015). En cambio, en las células de la glía y neuronas maduras (modelo de *Drosophila melanogaster*) la activación de la autofagia disminuye la replicación viral y evita la muerte celular (Liu et al., 2018).

**Tabla 1.-Mecanismos celulares implicados en el desarrollo de microcefalia durante la infección con ZIKV.**

Modelo	Observación	Referencia
Neuroesferas	MSI1 se une a la región 3' UTR del genoma de ZIKV favoreciendo su traducción a expensas de los RNAm celulares	Chavali et al., 2017 Klein et al., 2018
Organoides	Se reducen los niveles de SOX2 y nestina (Disminución de la proliferación celular)	Cugola et al., 2016
Organoides	Las CPNs se arrestan en la fase G1 del ciclo celular, como resultado de una disminución en el complejo ciclina E/CDK2.	Garcez et al., 2016
Ratones de la cepa ICR	Disminuye la transición de CRG a progenitoras intermedias	Li et al., 2016
Neuroesferas humanas	Disminuye la diferenciación neural	Garcez et al., 2017
Organoides y neuroesferas humanas	Las CPNs entran a apoptosis dependiente de caspasa 3	Garcez et al., 2016
hCPNs derivadas de hiPSC	Se activa la vía de p53 y se desencadena muerte celular	Zhang et al., 2016
hCTNs derivadas de hiPSCs	Activación de UPR que ocasiona un aumento en la neurogénesis directa con respecto a la indirecta.	Gladwyn-Ng et al., 2018
hCPNs derivadas de hiPSCs	Disminuye DDIT4L un inhibidor de mTOR, ocasionando un aumento en la liberación de partículas virales de ZIKV	Caires-Júnior et al. 2018
hCTN	NS4A y NS4B inducen la fosforilación de Akt, con lo cual, se activa autofagia que favorece la replicación viral e inhibe la neurogénesis	Liang et al., 2017
fCTN	Diferenciación prematura de las CPN a neuronas, disminución en la sobrevivencia y defectos en la migración celular	Bhagat et al., 2018
<i>Drosophila melanogaster</i>	En las células de la glía y neuronas maduras se activa autofagia y disminuye la replicación viral	Liu et al., 2018
Ratones de la cepa AG6	Estrés en el retículo endoplásmico y activación de UPR	Tan et al., 2018

Musashi 1, MSI1; región no traducida, UTR; células radiales de la glía, CRG; células progenitoras neurales humanas, hCPNs; células troncales neurales humanas, hCTN; células troncales neurales fetales, fCTN; Unfolded protein response, UPR.

De manera general, con los datos obtenidos con fetos humanos y con los modelos de estudio *in vivo* e *in vitro* se ha logrado dilucidar algunos mecanismos celulares y moleculares que ayudan a entender la patogénesis del ZIKV (Tabla 1). Los análisis transcriptómicos de CPN infectadas con ZIKV muestran alteraciones en la expresión de genes del metabolismo de ácidos nucleicos (Rolfe et al., 2019), de proteínas involucradas en splicing alternativo y proteínas importantes para la biogénesis de miRNAs (Garcez et al., 2017). En este sentido, aún falta por determinar el papel del metabolismo del RNA durante la neurogénesis en respuesta a ZIKV.

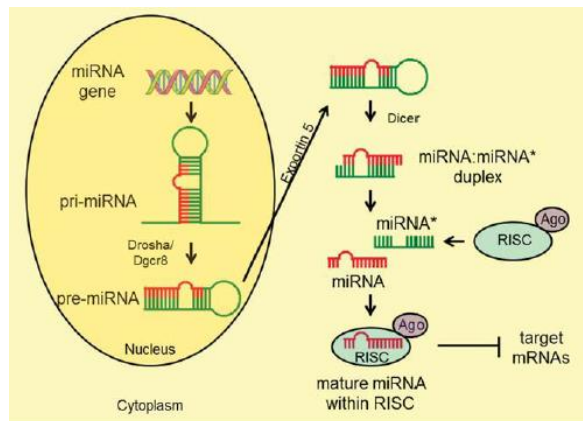
#### 1.4.- miRNAs como reguladores de la neurogénesis

Durante la neurogénesis, los eventos de expresión génica, proliferación y diferenciación en las CPNs deben ser rigurosamente controladas en tiempo y espacio. En este contexto, los miRNAs participan en la regulación de la expresión génica a nivel postranscripcional (Agirman et al., 2017). Se ha demostrado que un miRNA puede controlar la expresión de más de un RNAm, de manera análoga, la expresión de un RNAm puede estar regulado por múltiples miRNAs (Díaz et al., 2014).

Los miRNAs son transcritos por la RNA polimerasa II como precursores largos llamados pri-miRNAs (de “transcrito primario”) con un tamaño aproximado de más de 1000 nucleótidos. El pri-miRNA es procesado en el núcleo por la ribonucleasa Drosha en asociación con la proteína de región crítica del síndrome de DiGeorge gen 8 (DGCR8), dando lugar a un pre-miRNA (de “precursor”) con un tamaño de 70 nucleótidos y con una estructura secundaria de tallo-asa (Díaz



et al., 2014). El pre-miRNA es exportado al citoplasma mediante exportina 5 dependiente de Ran GTP. En el citoplasma, este pre-miRNA es cortado por la enzima Dicer pasando a ser un miRNA dúplex con alrededor de 20 a 22 nucleótidos. Posteriormente, una de las dos cadenas del miRNA dúplex, generalmente la cadena con mayor estabilidad termodinámica, se carga en la proteína de la familia Argonauta (AGO), la cual es una de las principales proteínas del complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC). El miRNA conduce a RISC a su RNAm blanco, reconociendo por la complementariedad de bases las secuencias de unión, que en animales bilaterales generalmente se encuentran en el extremo 3' UTR del RNAm blanco (Ma et al., 2011; Meza-Sosa et al., 2012). En consecuencia, se promueve el corte y posterior degradación del RNAm blanco o la inhibición de la traducción, en animales bilaterales el segundo mecanismo es el más frecuente (Cai et al., 2009) (Figura 6).



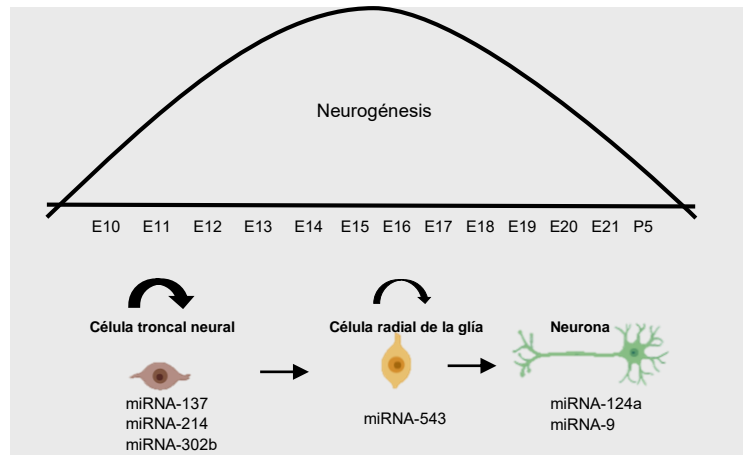
**Figura 6.-Generación y procesamiento de miRNAs.-** El gen del miRNA es transcrito por la RNA polimerasa II generando un pri-miRNA que es procesado por el complejo Drosha y DGCR8 formando un pre-miRNA con la estructura secundaria tallo-asa que es transportado fuera del núcleo mediante exportina-5. En el citoplasma, el pre-miRNA es procesado por Dicer formando un miRNA dúplex, tras lo cual, la hebra guía del miRNA se asocia al complejo RISC. Posteriormente, el miRNA dirige al complejo RISC a su RNAm blanco inhibiendo su expresión por degradación o inhibición de la traducción (Tomado de Meza-Sosa et al., 2012).

Los miRNAs presentan patrones de expresión espacio-temporal específicos; siendo reguladores claves en procesos de proliferación, determinación y diferenciación celular en las diferentes etapas del desarrollo del SNC (Sempere et al., 2004). En este sentido, la importancia de los miRNAs ha sido observada en modelos *in vitro* carentes de expresión en DGCR8. Las células progenitoras de la glía deficientes en DGCR8 pierden la capacidad de diferenciarse a astrocitos y presentan una disminución en la sobrevivencia celular (Shenoy et al., 2015). En el mismo contexto, en modelos murinos embrionarios deficientes de Dicer se ha observado una reducción en el tamaño del cerebro anterior ocasionado por la diferenciación prematura de las CPN a neuronas y por un aumento en la apoptosis (Makeyev et al., 2011). Además, la eliminación génica de Dicer en la corteza y el hipocampo conduce a microcefalia (Davis et al., 2008).

Los miRNA-134, miRNA-137, miRNA-25, let-7, miRNA-124 y miRNA-9 participan en las distintas etapas de la diferenciación celular durante el desarrollo del SNC (Meza-Sosa et al., 2014). Además, su expresión varía durante el desarrollo dependiendo del día embrionario (E) (Sempere et al., 2004). El miRNA-302a se expresa en células neurales indiferenciadas (línea celular NT2) y bajo diferenciación por ácido retinoico (AR) disminuye su expresión (Smith et al., 2010). El

miRNA-134 promueve la diferenciación de las células troncales embrionarias a células del ectodermo mediante la regulación negativa del FT *Nanog*, que mantiene a las células troncales embrionarias en pluripotencia (Niu et al., 2013). En CPN, el miRNA-134 promueve la proliferación, disminución de la apoptosis y diferenciación celular por un mecanismo dependiente de la inhibición de la expresión del RNAm que codifica para la proteína parecida a cordina 1 y doblecortina (Gaughwin et al., 2011). En CTN, la expresión del miRNA-137 marca el inicio de la diferenciación a neuronas y células de la glía (Sun et al., 2011). Por otro lado, la co-expresión de los miRNA-369-3p, miRNA-496 y miRNA-543 en CRG conduce a la diferenciación neural mediante la regulación negativa de una caderina (*Ncad*) específica de cerebro, mientras que, la represión de la expresión de estos miRNAs mantiene a las CRG en proliferación (Rago et al., 2014). La expresión de los miRNAs-324 y miRNA-326 induce la salida del ciclo celular en las células progenitoras de la glía y marca el inicio de la diferenciación celular mediante la inhibición de la expresión de los RNAm de *Smo* y *Gli1* que son parte de la vía de Hedgehog (Ferretti et al., 2008).

El miRNA-124 es abundante en neuronas y regula negativamente el RNAm que codifica para el FT RE1 (Factor silenciador restrictivo de las neuronas), cuya función es inhibir la diferenciación neural (Visvanathan et al., 2007). En consecuencia, la expresión del miRNA-124 correlaciona con el aumento de genes pro-neurales (Kutsche et al., 2018); debido a que se une a la región 3'UTR de PTBP1 e inhibe su expresión (Makeyev et al., 2011). PTBP1 (Polypyrimidine tract binding protein) se une a secuencias ricas en pirimidinas de los pre-RNAm y regula la expresión de isoformas de RNAm específicos de la diferenciación neural mediante el corte y empalme alternativo (Linares et al., 2015). Además, la activación del transductor de señales y activador de la transcripción 3 (STAT3) y su translocación nuclear por fosforilación (Tyr705) es importante en el desarrollo del SNC, en particular, en la inhibición de la diferenciación neuronal, debido a que favorece la diferenciación de las CPNs a astrocitos (Gu et al., 2005). En células que sobreexpresan (mediante la transfección de siRNA dúplex con una cadena sentido idéntica al miRNA maduro) los miRNA-124a y miRNA-9 aumenta la fosforilación de STAT3 promoviendo la diferenciación a astrocitos; mientras que, la inhibición de la expresión de los miRNAs con el uso de oligonucleótidos 2'-O-metilados complementarios a miRNA-124 y miRNA-9 se reduce la diferenciación neuronal. Por lo antes mencionado, se conoce que los miRNA-124 y miRNA-9 actúan en la vía de señalización de STAT3, sin embargo, no se ha determinado el RNAm blanco de los miRNAs responsable de la fosforilación del FT STAT3 (Krichevsky et al., 2008; Sempere et al., 2004). En cambio, el aumento en la expresión del miRNA-9 ocasiona una reducción en el tamaño de la corteza cerebral, inhibiendo la expresión del RNAm de GDNF (glial cell-derived neurotrophic factor), el cual es un factor de sobrevivencia tanto para las CPN como para neuronas inmaduras (Zhang et al., 2018). Por el contrario, la represión de la expresión del miRNA-9 provoca la pérdida de marcadores neurales como *Tuj1* (Krichevsky et al., 2003), mientras que los miRNAs-369-3p, miRNA-496 y miRNA-543 promueven la migración neuronal a través de regular el RNAm de *Ncad* (Rago et al., 2014).



**Figura 7.-Expresión de miRNAs durante el desarrollo neural embrionario de ratón.** La expresión de miRNAs correlaciona con los diferentes estadios de compromiso/diferenciación durante la neurogénesis. Los miRNA-137, miRNA-214 y miRNA-302b están involucrados en mantener a las células troncales neurales en proliferación. El miRNA-543 participa en la transición de una célula troncal neural hacia una célula radial de la glía; mientras que la expresión de los miRNAs-124 y miRNA-9 participan en la diferenciación a neuronas. E, día embrionario.

Lo anterior demuestra la importancia de los miRNAs en la neurogénesis; sin embargo, es conocido que en respuesta a algunos estímulos tanto intracelulares como extracelulares se altera la expresión de los miRNAs, resultando en problemas del neurodesarrollo como la anencefalia (Zhang et al., 2017). En este contexto, se sabe que los virus inducen cambios en la expresión de los miRNAs (Pan et al., 2015; Xu et al., 2017; Song et al., 2018).

### 1.5.-miRNAs y virus neurotrópicos

Los virus como rubéola, citomegalovirus (CMV), virus del herpes simple (VHS), retrovirus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y ZIKV ocasionan malformaciones congénitas del SNC como discapacidad auditiva, macroftalmia, microcefalia, entre otras (Nu et al., 2015; Ostrander y Bale, 2019). Además, promueven cambios en la expresión de miRNAs a nivel de SNC, alterando la respuesta antiviral de la célula hospedera y promoviendo la patogénesis de los virus (Pan et al., 2015; Xu et al., 2017; Song et al., 2018).

Los miRNA-200 y miRNA-182 modulan la expresión del RNAm de proteoglicano de heparán sulfato, sindecan 2, que es importante en el pegado de VHS1 a la membrana celular, por tanto, los miRNAs-200 y miRNA-182 reducen la entrada de VHS1 a las células infectadas y no infectadas (Majer et al., 2017). En cambio, el miRNA-138 se une a los RNAm que expresan los genes líticos de VHS1, por lo anterior el miRNA contribuye a la latencia del virus en las neuronas infectadas (Pan et al., 2015). Durante la infección de células de la glía con citomegalovirus se sobregula el miRNA-182 que reprime la expresión del RNAm de *FOXO3*, resultando en la inducción de IFN-I y la supresión de la replicación viral (He et al., 2018). El virus Chandipura, contiene un genoma de RNA de cadena sencilla con polaridad negativa y es el agente causal de encefalitis en niños, principalmente en India. Chandipura infecta a células de la microglía ocasionando una disminución en la expresión de miRNAs involucrados en la señalización de NF- $\kappa$ B e interleucinas, por lo que disminuye la respuesta celular frente al virus (Agrawal et al., 2019).

El virus Coxsackie A16 con genoma de RNA y polaridad positiva, produce neuroinflamación que causa daños a la barrera hematoencefálica. El mecanismo es a través de inhibir la expresión del miRNA-1303 y aumentar los niveles proteicos de la metaloproteína 9. En consecuencia, las uniones estrechas y adherentes que mantienen a la barrera hematoencefálica se pierden (Song et al., 2018). Por otra parte, en cerebros de personas con trastornos neurocognitivos asociados al VIH se sobregulan los miRNAs-500a-5p, miRNA-34c-3p, miRNA-93-3p y miRNA-381-3p que regulan RNAm implicados en la biogénesis de peroxisomas provocando la disminución de la respuesta antiviral (Xu et al., 2017). En células T CD4<sup>+</sup> infectadas con VIH se sobregula el miRNA-125b que se une al genoma viral e inhibe su replicación (Huang et al., 2007).

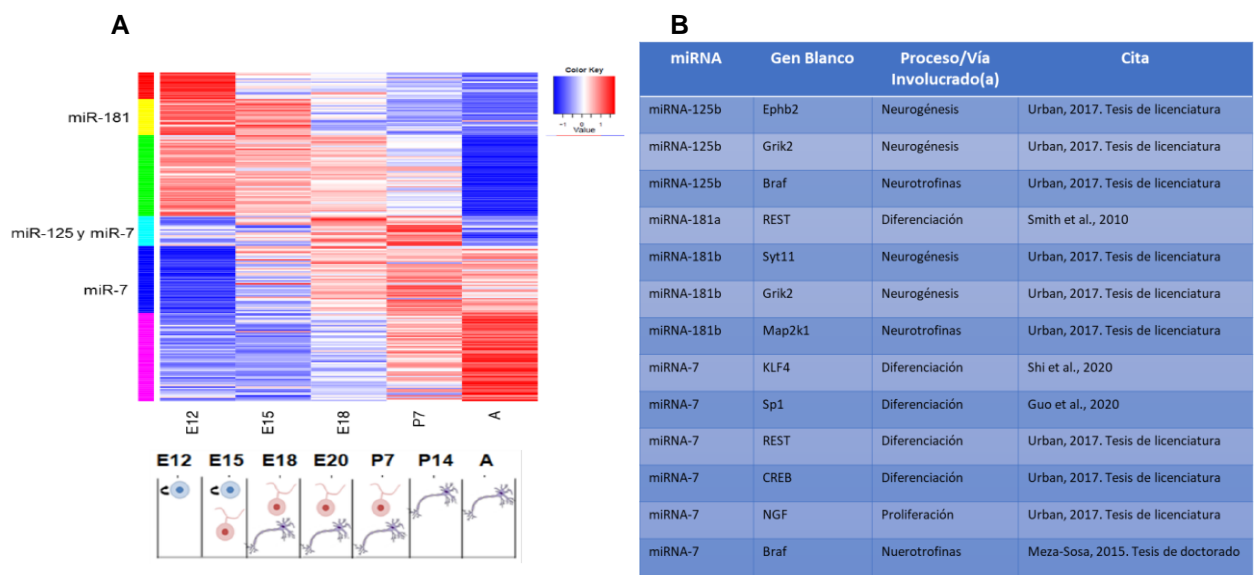
Los arbovirus causan encefalitis en adultos, principalmente por el aumento en la expresión de los miRNA-146 y miRNA-30e (Pequeno et al., 2019). El virus de la encefalitis japonesa (VEJ) infecta células de la microglía y neuronas, la infección contribuye a la translocación nuclear de NF-κB, en consecuencia, aumenta la expresión del miRNA-146a que regula negativamente a STAT1 favoreciendo la replicación del VEJ (Sharma et al., 2015). En modelos *in vivo*, el miRNA-146a promueve la neuroinflamación mediante la expresión de citocinas proinflamatorias como IL-1β, IL-6, TNF e IFN-β (Deng et al., 2017; Sharma et al., 2016). Además, en astrocitos y células de la microglía de ratones infectados con VEJ se sobregula el miRNA-19b-3p que inhibe la expresión del RNAm de RNF1; en consecuencia, NF-κB se transloca al núcleo y activa la transcripción de citocinas. La represión de la expresión del miR-19b-3p reduce la neuroinflamación y mejora la sobrevivencia neuronal (Ashraf et al., 2016). Además, VEJ infecta CTN/CPN provocando la disminución de los miRNA-9 y miRNA-124 (Mukherjee et al., 2019) que son importantes en la neurogénesis (Visvanathan et al., 2007; Krichevsky et al., 2003).

Dentro de las principales arbovirosis que afectan al humano a nivel mundial se encuentra DENV (Bhatt et al., 2013). En células HeLa infectadas con DENV aumenta la expresión del miRNA-30e, promoviendo la degradación del RNAm de IκBα, por lo cual, aumenta la translocación nuclear de NF-κB y la activación de IFN-β que en conjunto disminuyen la replicación viral (Zhu et al., 2014). El ZIKV, un miembro de los arbovirus (Chang et al., 2016), se ha asociado con el aumento en los casos de microcefalia congénita y diversos estudios han reportado cambios en la expresión de miRNAs asociados a la infección con ZIKV durante el desarrollo del SNC (de Oliveira, 2017). En embriones murinos infectados con ZIKV se sobregula el miRNA-9 en CPN y en neuronas inmaduras. El miRNA-9 regula negativamente al RNAm de GDNF aumentando la apoptosis de las CPN (Zhang et al., 2018). Además, en neuroesferas infectadas con ZIKV aumentan los niveles del miRNA-124, reduciendo el tamaño de las neuroesferas debido a que el miRNA-124 se une al RNAm del receptor de transferrina e induce una disminución en la expresión del FT FOXM1 y genes de ciclo celular (Dang et al., 2019). En cambio, en cultivos de neuronas corticales provenientes de ratones C57BL/6J la expresión de miRNA-124 es reprimida, lo que resulta en un aumento de la expresión de IL 7, CCL2, LITAF, IRF1, supresor de la señalización de citocinas 5 (SOCS5), TLR6, STAT3, TNF y NF-κB que conduce a neuroinflamación (Azouz et al., 2019). En CTN humanas, la transfección del gen que codifica para la proteína viral E induce el aumento de los miRNA-1273g-3p y miRNA-204-3p que reprimen la expresión de PAX3 y NOTCH (Bhagat et al., 2018). La vía de NOTCH es importante para expandir los progenitores corticales humanos, a través de promover la proliferación de las CRG y retrasar la diferenciación celular (Suzuki et al., 2018; Fiddes et al., 2018). En astrocitos embrionarios humanos infectados con ZIKV, se sobregulan los miRNA-30e-5p, miRNA-19b-3p y miRNA-17-5p ocasionando la inducción de

UPR (Chavali et al., 2018; Klein, 2017). En el modelo celular de neuroblastoma (SH-SY5Y) y en cerebros post-mortem con SCAZ, la infección con ZIKV induce la sobreexpresión del miRNA-145; sin embargo, su función en la patogénesis de ZIKV en el contexto del desarrollo del SNC no ha sido estudiada (Castro et al., 2019).

## 2.- ANTECEDENTES

Como se mencionó anteriormente se han identificado miRNAs con funciones importantes durante el proceso de neurogénesis (Krichevsky et al., 2008; Kutsche et al., 2018; Zhang et al., 2018). En este sentido, en nuestro grupo de trabajo mediante análisis transcriptómicos se encontraron miRNAs que se expresan durante la ontogenia del hipotálamo de ratón. Específicamente, se identificaron a los miRNA-181a, miRNA-181b, miRNA-125a, miRNA-125b y miRNA-7, cuya expresión cambia durante el período de neurogénesis (Figura 8A). De manera interesante, a través del uso de distintas plataformas bioinformáticas se determinó que estos miRNAs tienen como blancos putativos genes implicados en procesos de proliferación y diferenciación celular (Figura 8B) (Tesis de Doctorado. Meza-Sosa, 2015).



**Figura 8.-Análisis transcriptómico de miRNAs durante el desarrollo embrionario hipotalámico murino.** A).- Se observa que la expresión de los miRNA-181a, miRNA-125a, miRNA-125b y miRNA-7 es coincidente con el inicio de la diferenciación neural, esto es alrededor del E15. B).- Análisis *in silico* de los RNAm blancos de los miRNAs, se observa que los RNAm blancos están involucrados en procesos de diferenciación celular y neurogénesis. E, día embrionario y P, día postnatal (Tomado de tesis de doctorado. Meza-Sosa, 2015 y tesis de licenciatura. José Antonio Urban, 2017).

El miRNA-7 se expresa abundantemente en cerebro (Horsham et al., 2015), siendo importante en el desarrollo de la corteza cerebral (Zhang et al., 2018). La función del miRNA-7 se ha estudiado por pérdida de función mediante el uso esponjas de miRNAs que son transcritos señuelo de RNA que contienen múltiples sitios de unión (en la región no codificante o en el extremo 3'UTR de un gen reportero) de alta afinidad para miRNAs específicos; por lo tanto, los miRNAs son secuestrados, evitando que interactúen con sus RNAm blanco. El enfoque de esponjas de miRNA ha permitido generar fenotipos de pérdida de función en cultivos celulares,

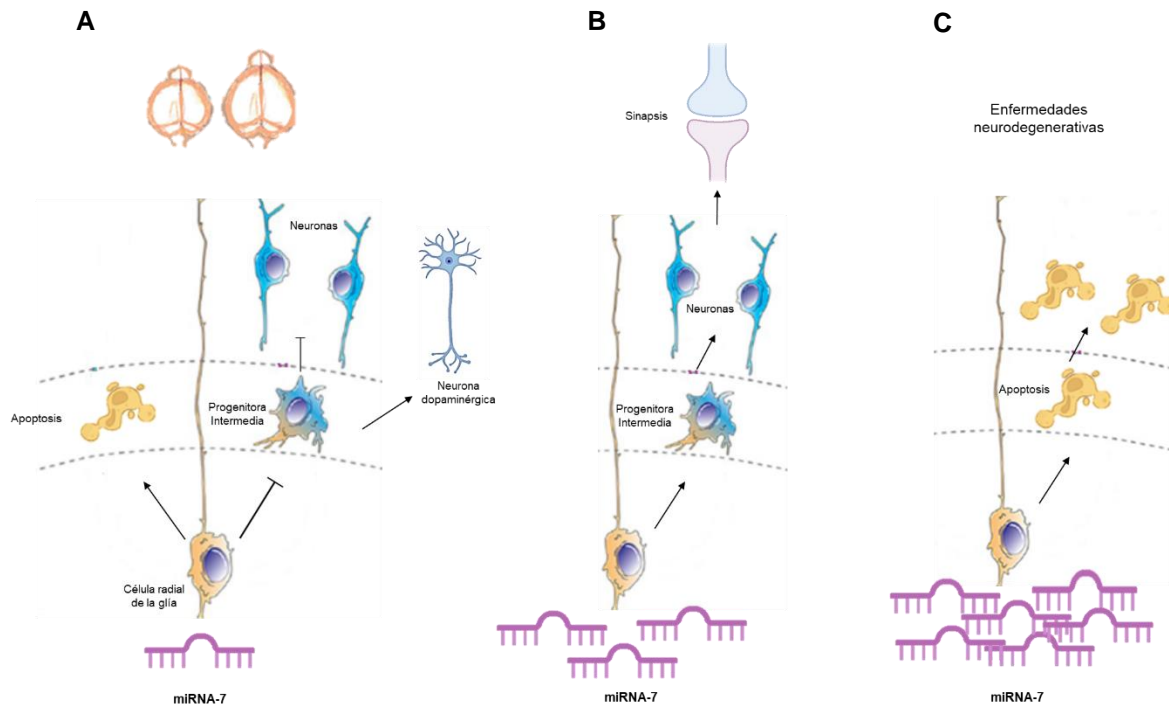
en tejidos infectados y en animales para diversas familias de miRNAs. El silenciamiento del miRNA-7 durante la neurogénesis de ratones C57BL/6J mediante el uso de una esponja, resulta en un fenotipo parecido a microcefalia debido a una disminución en la transición de CRG a PI, además, se reduce la sobrevivencia celular por un incremento en los RNAm de la vía de p53 como AK1, Noxa, p21, KLF4 y CCag1, que son blancos del miRNA-7 (Pollock et al., 2014). En embriones murinos deficientes del FT Gli3 se presenta un fenotipo parecido a macrocefalia; sin embargo, en los embriones mutantes tanto para Gli3 como para miRNA-7 se restablece el tamaño del cerebro (Zhang et al., 2018).

Interesantemente, el miRNA-7 regula vías de señalización implicadas en el desarrollo del SNC (Caygill y Brand, 2017). En este sentido, la vía de sonic hedgehog (SHH) se requiere para la diferenciación de las CPN a neuronas (Dessaud et al., 2008) y la pérdida de función de los receptores *ihog* y *boi* de la vía de SHH inhibe la diferenciación hacia neuronas fotorreceptoras en *Drosophila* (Camp et al., 2010). En modelos *in vitro* e *in vivo* se observa que el miRNA-7 regula la proliferación y el mantenimiento de las CPN mediante su unión al RNAm de iHog (Da Rosa et al., 2013). En cambio, la vía de Notch es esencial para mantener a las CNE en proliferación y su inhibición conduce a diferenciación neuronal. La proteína E(spl)m-gamma es un efector de la vía de Notch (Siebel y Lendahl, 2017) y su expresión es regulada por el miRNA-7. En *Drosophila* mutantes para el miRNA-7 la transición de las CNE a neuroblastos se interrumpe (Caygill y Brand, 2017). Además, en embriones de *Drosophila*, en respuesta al factor de crecimiento epidérmico se expresa el miRNA-7 (Caygill y Brand, 2017), a su vez, miRNA-7 regula su expresión al unirse al RNAm del receptor del factor de crecimiento epidérmico (Midgley et al., 2014). Por otra parte, el FT Pointed-P promueve la diferenciación de las CPN a neuronas fotorreceptoras mediante la represión del RNAm del FT Yan (Li y Carthew, 2005). Yan es un regulador negativo de la diferenciación celular en *Drosophila* (Price y Lai, 1999) debido a que reprime la transcripción del miRNA-7 al unirse a elementos de secuencia conservados en el promotor del miRNA (Li y Carthew, 2005).

El miRNA-7 disminuye la generación de neuronas dopaminérgicas mediante la inhibición de la expresión del RNAm de Pax6 (Needhamsen et al., 2014). En modelos *in vivo* con disminución en la expresión de miRNA-7, mediante el uso de una esponja, se observa que se aumenta la expresión de Pax6 y la generación de neuronas dopaminérgicas (Chevigny et al., 2012). Pax6 codifica para un FT necesario en la formación de las neuronas dopaminérgicas, polarización del tubo neural, la regionalización del cerebro y el desarrollo de la retina (Kohwi et al., 2005). Además, miRNA-7 es importante en la sinapsis debido a que su expresión correlaciona con el aumento de sinapsina presente en las vesículas sinápticas (Liu et al., 2012).

Los cambios en la expresión del miRNA-7 están relacionados con enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson (Horsham et al., 2015; Zhao et al., 2020). En modelos *in vitro* e *in vivo* de la enfermedad de Parkinson se encontró una disminución en la expresión del miRNA-7 que promueve el aumento de BDNF, activando mecanismos protectores en las neuronas (Li et al., 2019). Los experimentos *in vitro* muestran que BDNF acelera la proliferación de CPNs e induce la diferenciación neuronal (Trzaska et al., 2009). De manera contraria, la expresión de miRNA-7 en modelos de neuronas corticales tratadas con el agente tóxico 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP+) recupera la viabilidad celular a través de la activación de la vía de mTOR (Fragkouli y Doxakis, 2014) y suprime la apoptosis neuronal inducida por MPP+ al

inhibir la expresión del RNAm de la proteína pro-apotótica Bax (Xuecheng et al., 2016). La sobrerregulación del miRNA-7 en glioblastomas suprime el crecimiento celular e induce apoptosis mediante DR5 (receptor de muerte 5) y su ligando TRAIL (Bhere et al., 2017). También, promueve la apoptosis al unirse al RNAm de XIAP (Liu et al., 2013) que es una proteína con función anti-apoptótica (Zhang et al., 2017) (Figura 9).



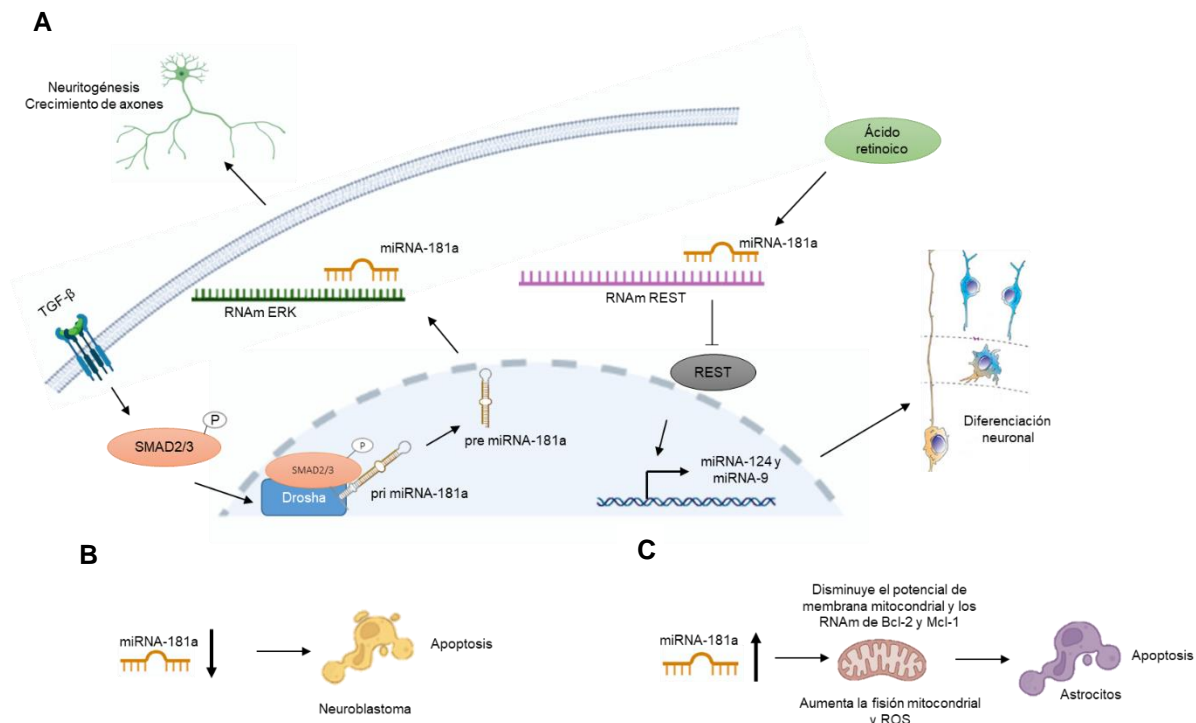
**Figura 9.- Función del miRNA-7 en el sistema nervioso central.** A).-La disminución en la expresión del miRNA-7 correlaciona con un fenotipo parecido a microcefalia debido a que aumenta la apoptosis y se inhibe la neurogénesis. B).- Los niveles normales de expresión del miRNA-7 son importantes en la correcta neurogénesis y en la función sináptica de las nuevas neuronas. C).- La sobreexpresión del miRNA-7 correlaciona con el aumento en la apoptosis y en enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer.

El microRNA-181a se expresa en cerebro, siendo detectado desde etapas embrionarias y postnatales; sin embargo, es más abundante en el cerebro adulto (Miska et al., 2004). Durante la diferenciación neural de las células NT2 con ácido retinoico (AR) el miRNA-181a incrementa su expresión en comparación con células NT2 no tratadas (Smith et al., 2010) lo que resulta en la disminución de la proliferación de las CTN y el aumento en la diferenciación neuronal (Stappert et al., 2013). El miRNA-181a presenta sitios putativos de unión al RNAm del FT REST (Smith et al., 2010) que es un represor de la transcripción de miRNAs con funciones pro-neurales como el miRNA-124 y el miRNA-9 (Conaco et al., 2006).

Además, el miRNA-181a se expresa en los nodos de los axones (Sasaki et al., 2014) de las neuronas post-mitóticas corticales (Smith et al., 2010), aumentando la longitud de las dendritas (Stappert et al., 2013). El miRNA-181a es importante en la formación de circuitos neuronales del sistema visual, en la neuritogénesis y el crecimiento axonal de las células amacrinas y de las células ganglionares de la retina, como consecuencia de regular negativamente el RNAm de Erk. La inhibición del miRNA-181a mediante el uso de morfolinolinos altera la función visual (Carella et al., 2015a). Durante la neuritogénesis, el miRNA-181a es regulado a nivel postranscripcional por la vía de señalización TGF- $\beta$  y por las proteínas Smad 2/3 que aumentan el procesamiento del

pre miRNA-181a en el núcleo (Carella et al., 2015b). Por el contrario, en las neuronas del mesencéfalo la inhibición del miRNA-181a propicia el crecimiento de las neuritas, debido a que se acumula su RNAm blanco Smad 1 (vía de BMP/GDF) (Hegarty et al., 2018). En neuronas del hipocampo, la sobreexpresión del miRNA-181a disminuye la ramificación dendrítica a través de su unión al RNAm de CREB1 (Liu et al., 2013) que es un FT que promueve la elongación de las neuritas (Chiola et al., 2019).

En células de neuroblastoma (SK-N-SH) tratadas con el agente tóxico MPP+ aumenta la apoptosis que correlaciona con la disminución en la expresión del miRNA-181a. En cambio, la sobreexpresión del miRNA-181a reduce la apoptosis mediante el aumento de autofagia y por inhibición de la vía p38 MAPK/JNK (Liu et al., 2017). De manera contraria, la sobreexpresión del miRNA-181a en astrocitos cultivados en ausencia de glucosa, favorece la apoptosis debido a la unión de este miRNA con los RNAm de la familia de proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Mcl-1, conduciendo a fisión mitocondrial, aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y disminución del potencial de membrana mitocondrial; en contraste, la pérdida de expresión del miRNA-181a revierte los eventos antes mencionados (Ouyang et al., 2013) (Figura 10). Además, la sobreexpresión del miRNA-181a en cerebros adultos de ratón se asocia con daños a la estructura e incremento de la permeabilidad de la BH, mediante su unión al RNAm del factor 6 tipo Kruppel (KLF6), por lo cual, disminuyen los niveles de ocludinas y claudinas que mantienen la BH (Ma et al., 2014).



**Figura 10.-Funciones del miRNA-181a en el sistema nervioso central.** A).- El miRNA-181a promueve la diferenciación neuronal mediante la represión de la expresión del RNAm del FT REST y promueve la neuritogénesis al reprimir la expresión del RNAm de ERK, por un mecanismo dependiente de la vía de señalización TGF-β/SMAD2/3. B).- La disminución en la expresión del miRNA-181a conduce al aumento en la apoptosis. C).- La sobreexpresión del miRNA-181a en astrocitos promueve apoptosis por un mecanismo dependiente de la mitocondria y especies reactivas de oxígeno. ROS, especies reactivas de oxígeno

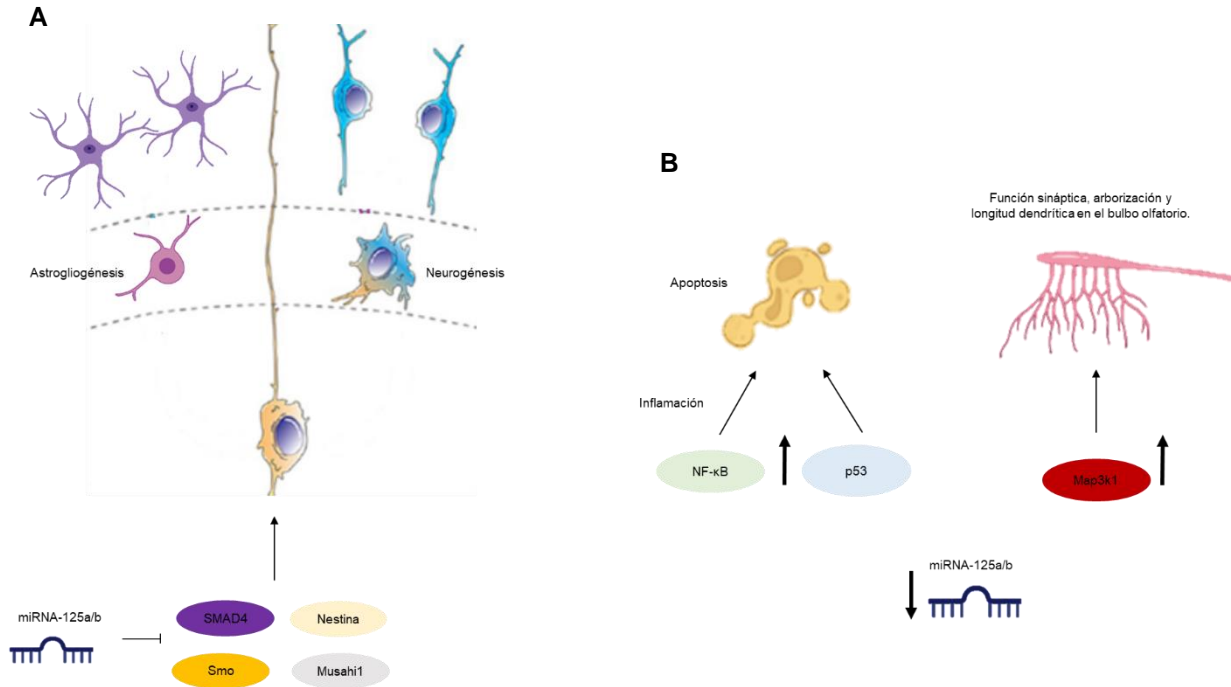


Los miRNA-125a y miRNA-125b se expresan en el SNC en desarrollo y en el cerebro adulto (Sempere et al., 2004; Akerblom et al., 2014) siendo importantes en la diferenciación neural (Ferretti et al., 2008; Le et al., 2009) debido a que inhiben la expresión de su RNAm blanco SMAD4 que forma parte de la vía de las TGF $\beta$  (Boissart et al., 2012). En interneuronas del bulbo olfatorio del cerebro adulto, la expresión de los miRNAs-125a y miRNA-125b se disminuye, favoreciendo la expresión del RNAm de Map3k1 que regula positivamente la función sináptica, arborización y longitud dendrítica (Akerblom et al., 2014). Por otra parte, en células progenitoras de la glía deficientes de DGCR8, la introducción de los miRNAs-125a, miRNA-125b y let-7 conduce al aumento de la astrogliogénesis debido a que inhiben la traducción de los RNAm de Igf2bp2 y Plagl2 que son activadores de la vía PI3K/Akt y Wnt/ $\beta$ -catenina, respectivamente (Shenoy et al., 2015).

En células de glioblastoma la transfección del miRNA-125a disminuye la expresión de CD133, un marcador de CPN; mientras que GFAP, un marcador de diferenciación celular, es inducido por la sobreexpresión del miRNA-125a (Yuan et al., 2015). En líneas celulares humanas (SH-SY5Y y ReNcell) diferenciadas en respuesta a AR y BDNF se sobreexpresa el miRNA-125b en comparación con células no tratadas, promoviendo la diferenciación neuronal mediante la unión del miRNA-125b a sus RNAm blanco implicados en las vías de JNK, ERK, MAPK, EGF, SMAD2, SMAD4 y STAT3 (Le et al., 2009b). De manera interesante, en cerebros adultos de *Drosophila*, el miRNA-125a es importante en el mantenimiento del fenotipo neural y en la sobrevivencia celular (Chawla et al., 2016). En cambio, en defectos congénitos como la anencefalia, el miRNA-125a se encuentra sobreexpresado en comparación con cerebros normales (Zhang et al., 2014). Por otro lado, en el modelo de pez cebra y en neuroblastoma humano se ha estudiado la función del miRNA-125b mediante pérdida y ganancia de función. Los embriones de pez cebra deficientes del miRNA-125b presentan acumulación de células muertas en el cerebro lo que origina cabezas distorsionadas, microftalmia y pérdida del límite entre el mesencéfalo y el rombencéfalo. Este fenotipo resulta del incremento en la expresión de p53 que induce apoptosis. Por el contrario, la sobreexpresión del miRNA-125b reprime la traducción del RNAm de p53 y la apoptosis (Le et al., 2009a). Al igual que el miRNA-125b, el miRNA-125a regula la traducción del RNAm de p53 y mejora la sobrevivencia celular (Zhang et al., 2009). En motoneuronas, la sobreexpresión del miRNA-125b promueve un ambiente pro-inflamatorio mediado por NF- $\kappa$ B y causa apoptosis (Parisi et al., 2016).

Se conoce que las CPNs se mantienen en proliferación por la vía de SHH (Ruiz y Altaba, 2006) a través de la inducción y represión de genes reguladores del ciclo celular (Vaillant y Monard, 2009). Por lo mencionado, antagonistas de la vía de SHH promueven que las CPN salgan de ciclo celular y comiencen el programa de diferenciación (Argenti et al., 2005). SHH se une a su receptor transmembranal Patched 1 (PTC), una vez unido, activa y se estabiliza al receptor transmembranal Smoothened (SMO). Smo activado inicia una cascada de señalización, permitiendo que el FT Gli1 active a sus genes blanco (Bragina et al., 2010). Los RNAm que codifican para Ptc y Smo se expresan ampliamente en el cerebro en desarrollo (Zhu et al., 1999). En este contexto, el miRNA-125b reduce los niveles del RNAm de Smo en las CPN, promoviendo la diferenciación hacia neuronas y astrogliá (Lattanzi et al., 2013). En progenitoras de células granulares del cerebelo aumenta la expresión del miRNA-125b en respuesta a AR, reduciendo los niveles del RNAm de Smo, con lo cual, las progenitoras de células granulares del cerebelo salen del ciclo celular y comienzan a diferenciarse a neuronas (Ferretti et al., 2008).

Adicionalmente, el miRNA-125b regula la diferenciación neuronal mediante la degradación del RNAm de nestina (Cui et al., 2012). La expresión de nestina es necesaria para la supervivencia, renovación y proliferación de las células progenitoras neurales (Bernal y Arranz, 2018). Además, el miRNA-125b induce la diferenciación de las CPN mediante su unión al RNAm de MSI1 (Gioia et al., 2014). MSI1 se expresa en las CPN, se une a los RNAm para regular su traducción y actúa como un inhibidor de la diferenciación neural (Okano et al., 2005) (Figura 11).



**Figura 11.- Funciones de los miRNAs-125a y miRNA-125b en el sistema nervioso central.** A).- Los miRNA-125a y miRNA-125b promueven la neurogénesis y la astrogliogénesis mediante la regulación negativa de los RNAm de SMAD4, Nestina, Smo y Musashi1. B).- La disminución en la expresión de los miRNAs-125a y miRNA-125b correlaciona con el aumento en apoptosis a través del aumento en la expresión de p53 y del FT proinflamatorio NF-κB. La disminución de la expresión de los miRNAs-125a y miRNA-125b aumenta la arborización y la longitud dendrítica de las neuronas del bulbo olfatorio.

Lo anterior demuestra la importancia de los miRNA-7a, miRNA-181a, miRNA-125a y miRNA-125b en el desarrollo del SNC, por lo cual la regulación de su expresión en tiempo y espacio es importante en la función y estructura del SNC.

## 2.1- Regulación de la expresión de miRNAs

Dado que los miRNAs juegan un papel importante en la neurogénesis y que cambios en su expresión conllevan defectos en el neurodesarrollo, es fundamental conocer las señales que regulan su expresión. En este sentido y como primera aproximación, previamente en nuestro grupo se realizó un análisis *in silico* de las regiones promotoras de los miRNA-181a, miRNA-125a, miRNA-125b y miRNA-7. De manera interesante, este análisis mostró que la región promotora de los miRNAs contiene sitios de unión para FT relacionados con vías inflamatorias y antivirales. Entre ellos, encontramos los FT IRF3, 4, 7, NF-κB y STAT (Tabla 2). Estos hallazgos proponen la regulación de la expresión de estos miRNAs en respuesta a señales inflamatorias y antivirales.

**Tabla 2.-Los miRNA-181b, miRNA-125a, miRNA-125b y miRNA-7 contienen en su región promotora sitios de unión a factores de transcripción relacionados con vías inflamatorias y antivirales.**

miRNA	Región promotora de los miRNA	Factor de transcripción	Cita
miRNA-125b	CTAAATCATTCCATTCTCTCTC	IRF7	Urban, 2017. Tesis de licenciatura
miRNA-125b	AGGTTGAGAAAGCGACTCTATCAG	IRF4	Urban, 2017. Tesis de licenciatura
miRNA-125b	AAATCAAATGATAAACAGAAAGATCTTAT	IRF3	Urban, 2017. Tesis de licenciatura
miRNA-125a	GCGGCTGGGACCTCCCGGCC	NF-κB	Urban, 2017. Tesis de licenciatura
miRNA-181b	CAACGCTGTCGGTGAGTTGGAATCAAA TAAAACCATCGACC	IRF7	Urban, 2017. Tesis de licenciatura
miRNA-181a	TGAGGGGTTCAGAGA	STAT	Urban, 2017. Tesis de licenciatura
miRNA-181a	ATTGGGCTTCTCT	NF-κB	Urban, 2017. Tesis de licenciatura
miRNA-7	CAATTACAGGAACACAG	STAT3	Tang et al., 2020

En color rojo se muestran los sitios de unión de los FT en las regiones promotoras de los miRNAs. Los análisis fueron hechos en ratón (*Mus musculus*).

La inmunidad innata es la primera línea de defensa contra los patógenos y es activada por productos microbianos o virales que se conocen como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), que son reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones (PRP), entre ellos los TLRs. Durante la activación del sistema inmune innato se producen moléculas antivirales y citocinas proinflamatorias que en conjunto son necesarios para contrarrestar a los patógenos. Sin embargo, la inflamación excesiva conduce a daño tisular (Gaudet et al., 2017). Dentro de las principales vías que conducen a inflamación se encuentra IFN-γ que activa la transcripción de sus genes efectores a través de la proteína STAT1 (Busse et al., 2007). También, se encuentra la vía de interleucina 6 (IL-6) que ejerce su actividad a través de su unión al receptor de IL-6 en la membrana celular. La unión de IL-6 a su receptor activa a la cinasa Janus (JAK), un miembro de la familia de las tirosina quinasas. La activación de JAK conduce a la fosforilación del FT STAT3 que promueve la transcripción de genes proinflamatorios (Frank, 2007). La vía de los TLRs activa a FTs como NF-κB e IRFs, a su vez NF-κB es un mediador de la respuesta inflamatoria e induce la transcripción de IL-6 y TNF (Meylan et al., 2004). Además, NF-κB está implicado en la regulación de la expresión de miRNAs en diversos contextos celulares (Markopoulus et al., 2018).

Estudios previos han mostrado que la estimulación con lipopolisacárido (LPS) aumenta la expresión del miRNA-125b, que correlaciona con el aumento de las citocinas proinflamatorias

como TNF, IL-6, IL-1 $\beta$  y NF- $\kappa$ B (Huang et al., 2012). En células de la microglía y en macrófagos estimulados con LPS y *Candida albicans* aumenta la expresión de los miRNA-125b y miRNA-125a, ambos tienen como blanco el RNAm de TNFAIP3, un regulador negativo de NF- $\kappa$ B, por lo que se promueve un ambiente proinflamatorio dependiente de ambos miRNAs (Parisi et al., 2016; Monk et al., 2010). En el caso del miRNA-125a se observó que existe un circuito de regulación positivo entre NF- $\kappa$ B y el miRNA, debido a que NF- $\kappa$ B se transloca al núcleo y promueve la transcripción del miRNA-125a de manera dependiente de la inhibición de la expresión del RNAm de TNFAIP3 (Kim et al., 2012; Potenza et al., 2017; de la Rica et al., 2015).

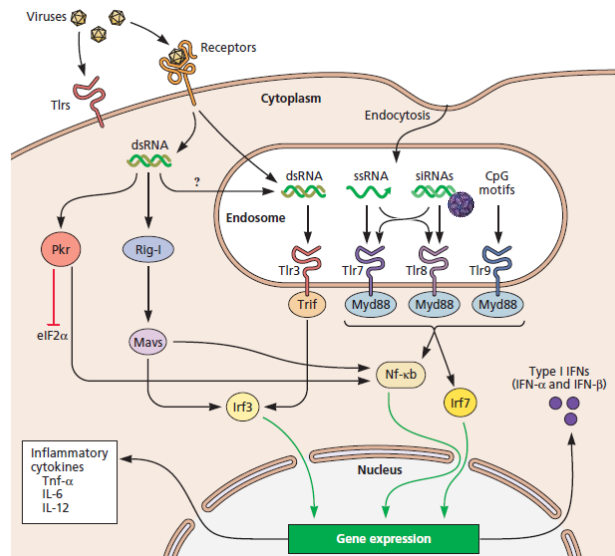
Además, en el contexto de la infección con el virus de la hepatitis B, aumenta la expresión de la proteína viral X que conduce al incremento en la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B que se une a la región promotora del miRNA-7 e induce su expresión (Chen et al., 2016). El promotor del miRNA-7 contiene elementos consenso de unión para el FT STAT1. En este sentido, el tratamiento con IFN- $\gamma$  aumenta los niveles de la forma fosforilada de STAT1 y la actividad transcripcional del miRNA-7 (Midgley et al., 2016). Además, por ensayos de inmunoprecipitación de cromatina se observó que la región promotora del miRNA-7 contiene sitios de unión para el FT STAT3. De acuerdo con esto, después del tratamiento con un inhibidor específico de STAT3 disminuye la expresión del miRNA-7 (Tang et al., 2020). También, el FT STAT3 promueve la expresión del miRNA-181b, lo anterior fue corroborado con experimentos de pérdida de función de STAT3 en los que se observó que los niveles del miRNA-181b disminuyen (Iliopoulos et al. 2010). Los trabajos anteriores muestran que la regulación de la expresión de los miRNA-7, miRNA-181a, miRNA-125a y miRNA-125b es dependiente del ambiente proinflamatorio y antiviral que se genera en la célula.

## 2.2.-Respuesta antiviral e inflamatoria inducida por ZIKV y su asociación con la proliferación celular

Durante la infección con ZIKV su genoma es detectado por receptores citosólicos como el del gen I inducible por el ácido retinoico I (RIG-I) y el antígeno de diferenciación asociado al melanoma 5 (MDA5) (Hamel et al., 2015), mientras que en los endosomas es reconocido por los TLR 3, 4, 7, 8, 9 (Mesci et al., 2017; Rolfe et al., 2016), la activación de estos receptores inducen la translocación nuclear de FTs como los IRFs (Liu et al., 2019) que activan vías antivirales (Chang et al., 2016; Reikine, Nguyen y Modis, 2014). Además, en CPNs infectadas con ZIKV se activan vías proinflamatorias mediante los FT NF- $\kappa$ B y la familia de las proteínas STAT que son clave en la inducción de citocinas y quimiocinas que contribuyen a la patogénesis de ZIKV (Rolfe et al., 2016). Se conoce que la sobreexpresión de TMEM2 (Type II transmembrane protein) disminuye la replicación de ZIKV mediante la producción de IFN- $\beta$  y la activación de la vía Jak/STAT (Duan et al., 2019). El IFN- $\beta$  es reconocido en la superficie celular por receptores IFN $\alpha/\beta$  (IFNAR) que tienen asociadas a las cinasas Jak que fosforilan a las proteínas STAT (Zhang et al., 2016), las cuales se translocan al núcleo y promueven la transcripción de genes estimulados por interferón (Figura 12) (Suthar, Aguirre y Fernández-Sesma, 2013).

La activación de genes estimulados por interferón durante la infección con ZIKV en las CPNs correlaciona con la disminución en la proliferación celular, debido a que se sobrerregula NF- $\kappa$ B e IRF3; lo anterior se corroboró en modelos de organoides con pérdida de expresión de NF- $\kappa$ B e IRF3 en los que se recupera la proliferación celular de las CPNs (Liu et al., 2019). También, el

ZIKV induce la expresión de IFN- $\gamma$  que activa al FT STAT1 que correlaciona una disminución de la proliferación de CPNs e inhibición de la diferenciación celular (Pereira et al., 2015). Además, las células de la microglía infectadas con ZIKV liberan al medio extracelular citocinas como TNF e IL-6 que inhiben la proliferación y diferenciación neural de las CPN (Wang et al., 2018). Por otro lado, la represión de la expresión de TLR3 resulta en un aumento en el número de copias de RNA de ZIKV (Hamel et al., 2015). Sin embargo, en modelos *in vitro* de neuroesferas infectadas con ZIKV la sobrerregulación de TLR3 induce una reducción en el tamaño de las neuroesferas, un aumento en la expresión de genes relacionados con apoptosis y una disminución en la expresión de genes del ciclo celular, diferenciación neural y migración de neuronas inmaduras. De manera interesante, al usar un inhibidor competitivo y de alta afinidad sobre TLR3 se revierten los efectos antes mencionados en las neuroesferas infectadas con ZIKV (Faizan et al., 2017; Dang et al., 2016). También, durante la infección con ZIKV se activa la vía de NF- $\kappa$ B que conduce al aumento de la expresión de citocinas inflamatorias como TNF, IL-1, IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-12 (Rolfe et al., 2016) (Figura 12). Lo anterior nos habla de los cambios en la acumulación y la translocación nuclear de FT con funciones antivirales y de inflamación que regulan la expresión de diversos genes dentro del contexto de desarrollo del SNC durante la infección con ZIKV.



**Figura 12.-Reconocimiento de arbovirus por TLRs y translocación nuclear de IRFs/NF- $\kappa$ B.** El ZIKV es reconocido en la superficie de la membrana plasmática o dentro de los endosomas por los TLRs, en el citoplasma es detectado por RIG-1 y MDA5. El reconocimiento de la partícula viral va a desencadenar la activación y translocación al núcleo de varios factores de transcripción que van a promover la expresión de genes involucrados en la respuesta antiviral e inflamatoria (Tomado de Flint, Racaniello, Rall y Skalka., 2015).

### 3.- JUSTIFICACIÓN

En el año 2015, a nivel mundial, surgió un virus emergente conocido como ZIKV. A diferencia de otros virus que se encuentran dentro de la misma familia *Flaviviridae*, ZIKV tomó gran importancia a nivel de salud pública debido a que en 2016 se registró un aumento en los casos de microcefalia asociados a la infección materna con ZIKV, por lo cual, fue declarado por la OMS como un problema emergente de salud pública. Diversos estudios se han llevado a cabo para conocer las causas de la patogénesis de ZIKV; sin embargo, hasta el momento no se entienden los mecanismos por el cual se induce el síndrome congénito asociado a ZIKV.

Actualmente, para el estudio de la patogénesis y virulencia de ZIKV se han empleado modelos *in vivo* e *in vitro*, lo cual ha servido para elucidar los posibles mecanismos que causan la microcefalia. Estos estudios han permitido determinar que la reducción en el tamaño de la corteza cerebral resulta de un aumento en la apoptosis de neuronas inmaduras y arresto del ciclo celular en las CPN. Sin embargo, los mecanismos moleculares que conducen a los efectos celulares observados no se conocen con claridad. Por lo tanto, el presente estudio fue diseñado para determinar si el ZIKV induce cambios en la expresión de miRNAs cuyos blancos putativos modulan el ciclo celular y la diferenciación durante el desarrollo del SNC. Consideramos que los hallazgos de esta investigación permitirán seguir avanzando en el conocimiento de la patogénesis del ZIKV.

### 4.-HIPÓTESIS

El ZIKV modula el neurodesarrollo a través de regular la expresión de miRNAs con funciones en el desarrollo del SNC.

### 5.-OBJETIVO GENERAL

Determinar si la expresión de los miRNA-125a, miRNA-125b, miRNA-7 y miRNA-181a es afectada como resultado de la infección por ZIKV.

#### 5.1.-Objetivos específicos

- Evaluar si durante la infección con ZIKV cambia la expresión de los miRNA-125a, miRNA-125b, miRNA-7 y miRNA-181a en un contexto neuronal *in vitro*.
- Determinar si durante la infección con ZIKV cambia la expresión de miRNA-125a, miRNA-125b, miRNA-7 y miRNA-181a durante el desarrollo del sistema nervioso central *in vivo*.
- Caracterizar las señales a través de las cuales el ZIKV modula la expresión de miRNA-125a, miRNA-125b, miRNA-7 y miRNA-181a.

## 6.-METODOLOGÍA

### 6.1.- Cultivo de líneas celulares

En el presente trabajo se cultivaron células Vero (células epiteliales de riñón de *Cercopithecus aethiops*), mHypoE-N1 (neuronas hipotalámicas de *Mus musculus*) y N2A (Nerublastoma de *Mus musculus*, tipo célula troncal) en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con SFB (Serum Fetal Bovine) al 10%, L-glutamina 2 mM y penicilina-estreptomicina 1X. La línea celular de C6/36 (células de larvas de *Ae. albopictus*) se cultivó en medio L-15 suplementado con SFB 10%, triptosa 10% y penicilina-estreptomicina 1X.

### 6.2.-Propagación de ZIKV

La propagación del ZIKV linaje africano cepa MR766 se realizó en la línea celular C6/36 de *Ae. albopictus*. Se inocularon 200 µl de virus en una monocapa de células por 1 h en medio L-15 sin suplementos; posteriormente, se retiró el inóculo y se agregó medio completo a las cajas que se guardaron a 28 °C sin CO<sub>2</sub> y se esperó hasta observar efecto citopático. En la línea celular C6/36 ZIKV induce desprendimiento de la monocapa y se forman agregados celulares que flotan en el medio de cultivo después de 5 días post-infección (dpi) (Figura S1). Después de los 5 dpi se cosechó el sobrenadante de las células infectadas y se centrifugó a 4,300 rpm para quitar los residuos celulares, usando la centrifuga eppendorf modelo 5702R con el rotor A-4-38 por 1 h a 4 °C, se recuperó el sobrenadante, se pasó por un filtro de 0.22 µm y se almacenó a -70 °C. Finalmente, se corroboró que fuera ZIKV mediante la purificación de las partículas virales del sobrenadante y corriendo un gel de proteínas que se tiñó con plata, con el objetivo de observar las proteínas virales (ver materiales y métodos suplementarios). Por último, se realizó un PCR punto final con oligonucleótidos específicos para NS4B, así como ensayos tipo western-blot para detectar las proteínas virales E y NS3 (Figura S1). La propagación del virus se realizó en el cuarto de virología con nivel de bioseguridad 2, en el Instituto de Biotecnología de la UNAM.

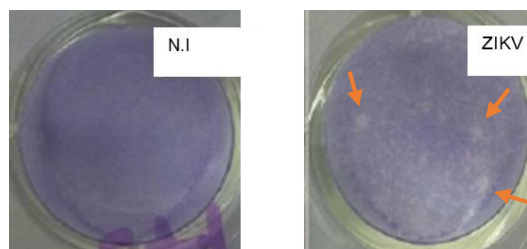
### 6.3.-Titulación del virus Zika

#### Método de placas líticas

Para conocer la concentración de virus que obtuvimos del sobrenadante de células C6/36 infectadas con ZIKV se usó el método de placas líticas. Se sembraron células Vero en placas de cultivo de 24 pozos (80,000 células por pozo) con 500 µl de medio DMEM completo y se dejaron por 18 h. Se realizaron 8 diluciones seriadas con base 10 del sobrenadante con virus en medio DMEM sin suplementos, a cada pozo se agregaron 200 µl de las diluciones con virus y se incubó por 1 h a 37°C. Posteriormente, se retiraron las diluciones y se agregó carboximetilcelulosa al 2% en DMEM, con SFB 3% y L-glutamina 2 mM (1ml por pozo). La placa de cultivo se incubó por 6 días; después se retiró la carboximetilcelulosa y se lavaron los pozos con PBS (Phosphate Buffered Saline) estéril. Por último, se agregó solución de tinción (cristal violeta 0.1%, formaldehído 10%, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 33 mM y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 45 mM) y se dejó agitando durante 30 min; el colorante se decantó, se retiró el exceso haciendo lavados con agua corriente y se contaron las placas líticas a simple vista.

El título viral se determinó con la siguiente fórmula (Figura 13):

$$\text{UFF (P)/mL} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de focos/placas} * \text{Inverso de la dilución}}{\text{Volumen del inóculo (mL)}}$$



**Figura 13.-Titulación de ZIKV por el método de placas líticas.** Se observan dos pozos con la monocapa de células Vero teñidas con cristal violeta, del lado izquierdo células sin infectar que muestran una coloración homogénea y del lado derecho células infectadas donde se pueden apreciar las placas líticas que están señaladas con flechas rojas.

#### 6.4.-Ensayos de inmunofluorescencia

Después de 36 hpi, las células se fijaron en paraformaldehído 4% por 30 min a TA, se permeabilizaron con PBS-T (PBS 1X y tritón 0.1%) por 30 min y se bloquearon por 1 h a TA con PBS-albumina (PBS 1X, BSA 10%). Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo anti-E (GeneTex) diluido (1:400) en PBS-albúmina (PBS1X, albúmina 5%, tritón 0.1%) toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se realizó la tinción con DAPI (1:10000) por 15 min a TA, después con faloidina 1:600 acoplada a Alexa 488 por 1 h a TA. Por último, se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo 1:400 acoplado a Alexa 647 a TA por 1 h.

Las muestras se montaron en portaobjetos, se cubrieron con resina y se observaron en el microscopio confocal olympus FluoView 1000. Finalmente, con el programa Fiji (ImageJ2) se realizó la composición de las imágenes y el análisis de las mismas.

#### 6.5.- Extracción de RNA

La extracción del RNA se realizó con tiocinato de guanidina. Las cajas de 6 pozos con células infectadas y no infectadas se descongelaron en hielo, se les agregó tiocinato de guanidina y con el émbolo de una jeringa de 1 mL se rasparon los pozos (una jeringa para cada condición). El contenido de dos pozos de la misma condición se pasó a un tubo eppendorf de 1.5mL. Posteriormente, se agregó a cada tubo acetato de sodio 2 M pH 4, se dio vortex y se agregó 400 µl de fenol saturado. Después, se agregaron 200 µl de cloroformo-isoamílico (relación 49:1), se mantuvo en hielo por 15 min y se centrifugaron por 17 min a 13,000 rpm. Después de la centrifugación, la parte superior (RNA) se transfirió a un tubo nuevo, se agregó isopropanol a cada tubo y se incubaron en hielo seco por 30 min. Posterior al tiempo de incubación se centrifugaron las muestras por 22 min a 13,000 rpm a 4°C; después se retiró el sobrenadante por decantación, se volvieron a agregar 300 µl de isopropanol a cada tubo, se dio vortex y se dejó incubando durante toda la noche a -20°C. Al día siguiente se realizaron lavados con etanol al 70% preparado en agua tratada con DEPC (dietilpirocarbonato), se centrifugaron las muestras y el pellet se diluyó en agua libre de nucleasas (tratada con DEPC).



La extracción de RNA de tejidos se realizó de igual manera con tiocinato de guanidina y se precipitaron con fenol-cloroformo. Sin embargo, a diferencia de las células, el tejido cerebral embebido en tiocinato de guanidina se sonicó a una amplitud de 60Hz por 10 seg. La calidad y concentración del RNA se determinó utilizando Nanodrop, mientras que su integridad se verificó corriendo la muestra en un gel de agarosa que se preparó bajo las siguientes condiciones: agarosa al 0.8% en MOPS 1X y formaldehído al 1.8%. Una vez que se corroboró la integridad del RNA se procedió a hacer la reacción de transcripción reversa (RT, por sus siglas en inglés).

## 6.6.- RT y PCRs

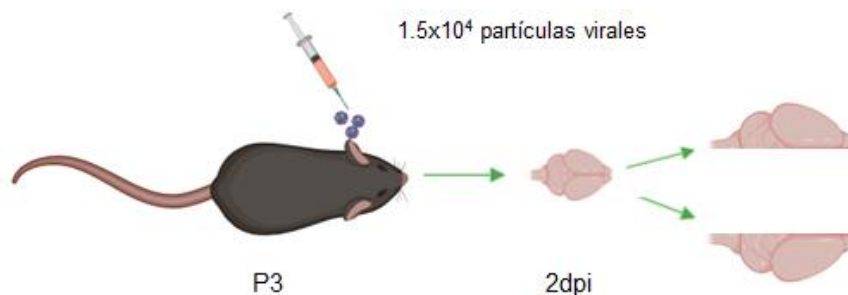
La reacción de transcripción inversa (RT, por sus siglas en inglés) se realizó con 1 µg de RNA total de células o de tejido embrionario. Primero, el RNA junto con los *random hexamer primers* (0.2 µg/µl) se calentaron a 65°C por 5 min; después, se agregó 4 µl de Buffer RT 5X, 3 µl de DTT (0.1 M), 0.6 µl de dNTPs (10 mM), y 0.5 µl de la enzima M-MLV RT (200 U/µl). La reacción se dejó incubando por 1 h a 37 °C. Una vez que se obtuvo la primera cadena de cDNA se realizaron los PCRs punto final utilizando oligonucleótidos específicos con los que se amplifica una región de 100 pb para el gen NS4B de ZIKV, de 491 pb para el gen MAPK8 y de 250 pb para el gen de actina (Tabla S1).

## 6.7.-Infección de líneas celulares

Todas las líneas celulares se sembraron 18 h antes de realizar las infecciones. Una vez que se sembró el número requerido de células por ensayo se infectaron a MOI (Multiplicidad de infección) de 10, se dejó el inóculo por 1 h en medio sin suplementos para permitir la absorción viral, al terminar este tiempo se retiró el inóculo, se realizó un lavado con PBS 1X y se agregó medio completo. Las células se incubaron a 37 °C en 5% de CO<sub>2</sub> y se cosecharon a diferentes horas post-infección (hpi) de acuerdo al experimento.

## 6.8.-Infección en ratones neonatos C57BL/6

Ratones neonatos (P3) de la cepa C57BL/6 fueron inoculados con  $1.5 \times 10^4$  partículas virales por vía intracraneal usando una jeringa para insulina (BD Ultra Fine 6 mm U 100 calibre 31 G 0.5 mL). Como control se inocularon ratones de la misma edad con medio DMEM. Después de 2 dpi los ratones fueron decapitados con tijeras de disección, se obtuvo el cerebro para la extracción de RNA y para hacer tinción de nissl (Figura 14).



**Figura 14.-Diseño experimental de la inoculación de ZIKV en neonatos del día postnatal 3. P, día postnatal; dpi, día post-infección**

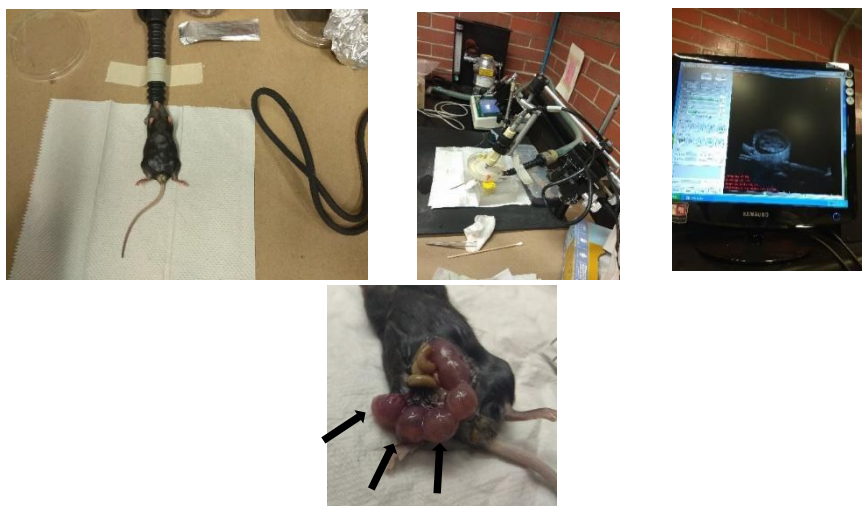
## 6.9.- Tinción de Nissl

La tinción de los cerebros de neonatos se realizó con violeta de cresilo. En primer lugar, los cerebros fueron fijados con paraformaldehído 4% por 24 h y se almacenaron a 4 °C en una solución de sacarosa al 30% hasta su uso. Posteriormente, a los cerebros de neonatos se les realizó cortes sagitales de 30 µm de espesor en un crióstato. Una vez obtenidos los cortes se deshidrataron en etanol 70 %, 80 % y 96% cada uno por 1 min, posteriormente se agregó violeta de cresilo por 1 min y el tejido se hidrató utilizando etanol al 100, 96, 80 y 70%. Los tejidos se lavaron con agua destilada y se montaron en cubreobjetos de vidrio recubiertos de poli-D-lisina. La visualización de los tejidos se realizó en el microscopio invertido Eclipse TS100 y la toma de imágenes con la cámara SONY DSC-HX1.

## 6.10.- Protocolo de infección en embriones de E12.5 de la cepa C57BL/6

Ratonas de la cepa C57BL/6 de E12.5 de gestación se anestesiaron (inducción profunda) con 6% de sevoflurano en 20% de oxígeno. Una vez que las ratonas estuvieron completamente anestesiadas (no presentaban reflejo podal) se mantuvieron bajo anestesia durante todo el procedimiento usando sevoflurano al 4% para iniciar con la minilaparotomía (Figura 15). Primero, se retiró el pelo de la zona de la cirugía; posteriormente, se realizó un corte a la altura del abdomen, cortando la piel, la capa de grasa y músculo hasta descubrir los cuernos uterinos. Después, se identificaron los embriones del lado derecho y del lado izquierdo, cada embrión se mantuvo en PBS estéril a 37 °C y con ayuda de una sonda de ultrasonido se monitoreó la inoculación de ZIKV en líquido amniótico (LA) a una dosis  $1.5 \times 10^4$  UFP/embrión usando un capilar de borosilicato. Los embriones controles fueron inoculados con medio DMEM. Una vez inyectados los embriones, los cuernos uterinos fueron devueltos a la cavidad abdominal y se procedió a suturar el músculo y la piel. Después de 2, 4 y 6 dpi las hembras gestantes se sacrificaron mediante la inyección de pentobarbital de manera intracardiaca y se extrajeron los embriones.

El protocolo de infección con ZIKV en embriones murinos cuenta con la aprobación del comité de bioética. Este procedimiento se realizó en el cuarto de patógenos del Instituto de Biotecnología de la UNAM junto con la Dra. Itzel Escobedo del laboratorio del Dr. Iván Velazco del Instituto de Fisiología Celular (Escobedo-Ávila I. et al., 2014 PMID: 25112718).



**Figura 15.-Técnica de inoculación en embriones C57BL/6.** En la parte superior se observa una ratona gestante anestesiada con sevoflurano al 4%, el aislado del embrión y el monitoreo de las zonas de inoculación mediante el uso de una sonda de ultrasonido. En la figura inferior, señalados en flechas negras se observan los embriones inoculados con un vector que contiene el gen que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP).

### 6.11.- Ensayos tipo Western-blot

La extracción de proteínas se realizó con el buffer de lisis TLB (Tris 20 mM pH 7.4, NaCl 137 mM,  $\beta$ -glicerolfosfato 25 mM, pirofosfato de sodio 2 mM, EDTA 2 mM pH 7.4, tritón X-100 1%, glicerol 10%) al cual se le agregó NaCl 113 mM, inhibidores de proteasas (leptina 5  $\mu$ g/mL, peptatina 5  $\mu$ g/mL, antipaina 5  $\mu$ g/mL, aprotinina 5  $\mu$ g/mL y PMSF 1 mM), inhibidor de fosfatasa  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1  $\mu$ M y 5  $\mu$ l de DTT (0.1 M). La cuantificación de las proteínas se realizó con el método de Bradford, utilizando una curva estándar de BSA (Bovine Serum Albumin) de 0, 0.5, 1, 2 y 4  $\mu$ g/mL. Las lecturas se realizaron a 570nm en el lector de microplacas de Biorad, iMark. Posteriormente, se corrió un gel de electroforesis SDS-poliacrilamida al 15% con 40  $\mu$ g de proteína, la transferencia se hizo a membranas de nitrocelulosa que se bloquearon usando TBS-T con leche o BSA al 5%. Finalmente, la detección de las proteínas virales E y NS3 se realizó usando anticuerpos específicos de la marca GeneTex. La detección de los FT celulares NF- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B/p65, STAT3, STAT3 fosforilado (pSTAT3), IRF3 fosforilado (pIRF3) y SOCS3 de la marca cell signaling; IRF3 de la marca Millipore y como control de carga se usó GAPDH y actina de la marca cell signalling (Tabla S2). Para el revelado del western blot se usó la actividad de la peroxidasa acoplada a anti-ratón o anti-conejo, las cuales fueron visualizadas en el equipo C-Digit (LI-COR) y el análisis de densitometría se realizó en el programa del equipo.

Las formas fosforiladas que se detectaron con anticuerpos (materiales y métodos suplementarios) específicos fueron p65 de NF- $\kappa$ B, Y706 para pSTAT3 y S396 para pIRF3.

### 6.12.- Determinación de la carga viral

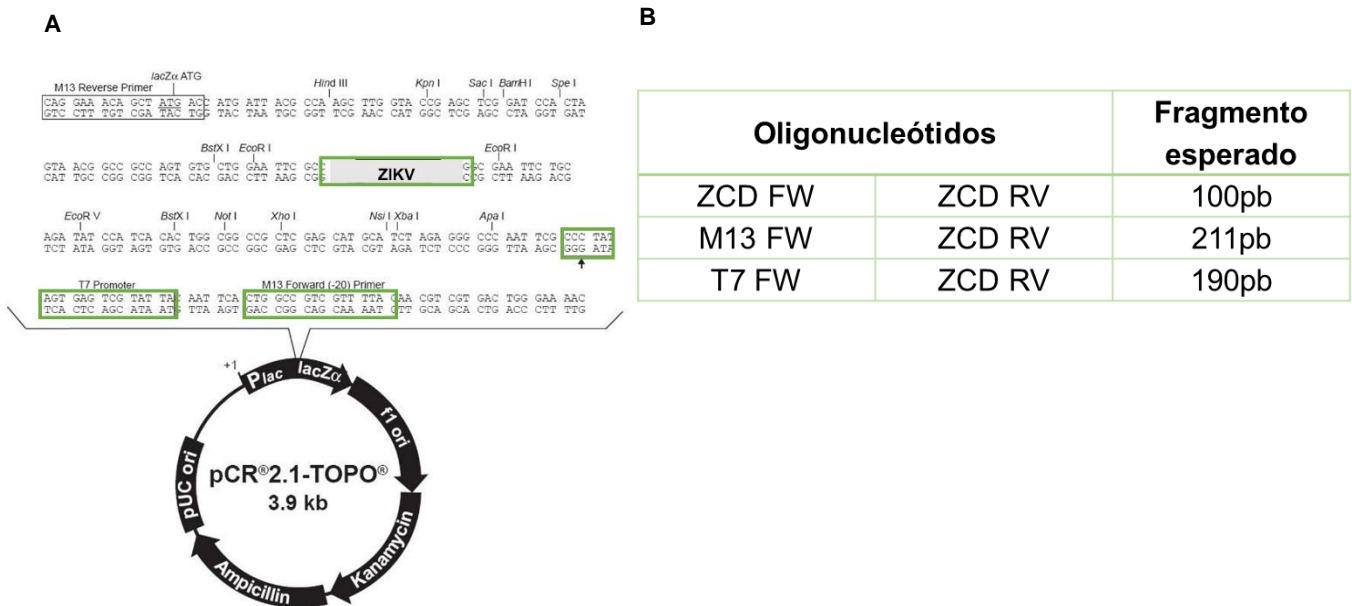
Para los ensayos de carga viral se realizó una curva estándar para determinar el número de copias de genoma de ZIKV en cada muestra. La curva estándar se realizó con el inserto de 100 pb del gen NS4B que está clonado en el vector pCR2.1 TOPO (Figura 16A). La estrategia que se utilizó fue la siguiente: se realizó un PCR punto final para amplificar una región de 211 pb utilizando los oligonucleótidos nombrados como ZIKV RV y M13 FW, dentro de esta secuencia

se encuentra el promotor de la T7 RNA polimerasa (Figura 16B). Una vez amplificada la región de 211 pb se realizaron dos PCR punto final utilizando ZIKV RV con ZIKV FW y ZIKV RV con T7 FW, una vez que se corroboró que el fragmento amplificado contenía la región de ZIKV y del promotor de T7 se realizó la purificación en gel del fragmento de 211 pb utilizando el kit GeneJET Gel Extraction (Thermo #K0692). Finalmente, la transcripción *in vitro* se realizó con la T7 polimerasa de la marca Thermo, utilizando 1 µg de ssDNA, T7 polimerasa a 30 U, buffer de reacción 1X y nucleótidos 2 mM en un volumen final de 50 µl, se incubó durante 2 h a 37 °C, se agregó DNAasa por 30 min y la reacción se detuvo con 0.5 M de EDTA a 65 °C por 10 min. Una vez obtenido el RNA se cuantificó en el Nanodrop y se calculó el número de copias con la siguiente fórmula:

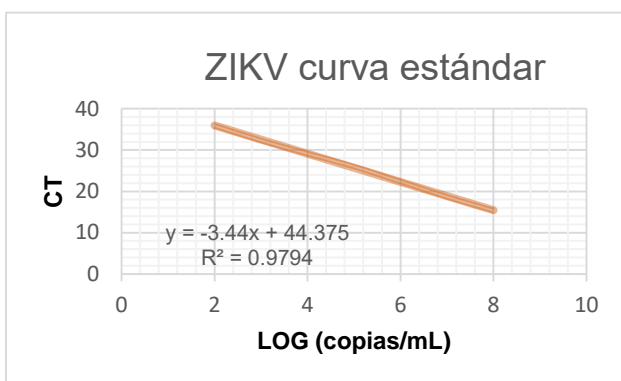
$$\#copias = \frac{X_{ng} * 6.022 \times 10^{23} \text{ moléculas/moles}}{X_{longitud} * 321 \text{ g/mole (ssRNA)} * 1 \times 10^9 \text{ ng/g}}$$

Posteriormente, se realizó la reacción de RT con 1µg de RNA (Fragmento de 211 pb) utilizando *random primers*. Después, se realizaron ocho diluciones en base 10 y se corrió una curva estándar desde  $1.8 \times 10^8$  hasta 18 copias de genoma/mL (Figura 16C). Para la qPCR de la curva estándar y de las muestras se utilizaron los oligonucleótidos ZIKV-RV y ZIKV-FW mencionados anteriormente y la sonda 5’-/56-FAM/CYGTGG/ZEN/ATGGAATAGTGG/3IABkFQ/-3’.

A las muestras problema se les hizo una dilución 1:2 del cDNA generado a partir de 1 µg de RNA obtenido de células y tejido cerebral. La mezcla de reacción para la qPCR se llevó a cabo de la siguiente manera: 3.08 µl H<sub>2</sub>O, 5 µl buffer, 0.36 µl ZIKV-RV (10 µM), 0.36 µl ZIKV-FW (10 µM), 0.2 µl sonda (10 pmol), 1 µl cDNA. Se corrió con el programa de 15 seg a 95 °C, 1 min 60 °C por 40 ciclos, en el equipo de PCR en tiempo real Step one de Applied Biosystems.



c



ZIKV cDNA	Ct
$1.8 \times 10^8$	$15.37 \pm 0.1089$
$1.8 \times 10^7$	$18.69 \pm 0.0385$
$1.8 \times 10^6$	$22.37 \pm 0.0272$
$1.8 \times 10^5$	$26.02 \pm 0.2616$
$1.8 \times 10^4$	$29.14 \pm 0.1374$
$1.8 \times 10^3$	$32.35 \pm 0.0635$
$1.8 \times 10^2$	$35.90 \pm 0.1132$
18	39.58

**Figura 16.-Estrategia experimental para la determinación de la carga viral.** A).- El vector de clonación PCR 2.1-TOPO: con cuadrados verdes se resalta la región donde se localiza el inserto de 100 pb de ZIKV, la región promotora de la T7 RNA polimerasa y el sitio de M13. B).-Combinaciones de oligonucleótidos utilizados para amplificar el fragmento de 211 pb que se purificó a partir de un gel. C).- Curva estándar de ZIKV de  $1.8^8$  a 18 para la determinación de la carga viral, donde se observa que el límite de detección es de 18 copias de genoma viral.

### 6.13.-Ensayos de RT-qPCR para miRNAs

La acumulación de los miRNA-125a, miRNA-125b, miRNA-181a y miRNA-7 se midió por ensayos de RT-qPCR. Para ello, se realizó una reacción de RT con oligonucleótidos que forman una estructura tallo-asa, estos oligonucleótidos contienen una secuencia de 44 nt: 5'- GTC TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AC -3' (Chen et al., 2005) que es igual para todos los miRNAs del presente estudio, excepto en la región 3', para los miRNA-125a, miRNA-125b y miRNA-181a el extremo 3' tiene 6 nt que son complementarios a 6 nt del extremo 3' de los miRNA maduros, el oligonucleótido tallo-asa RT del miRNA-7 contiene 5 nt específicos y complementarios del miRNA-7 en el extremo 3'; por lo que cada molécula del miRNA hibrida con su oligonucleótido de RT tallo-asa específico para posteriormente realizar la reacción de transcripción inversa.

La reacción de RT con los oligonucleótidos tallo-asa para cada miRNA que se requirió analizar (Tabla S3) se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 0.75  $\mu$ l de oligonucleótidos tallo-asa RT para cada miRNA (1  $\mu$ M), 0.75  $\mu$ l de oligonucleótido U6 (1  $\mu$ M), 0.5  $\mu$ l de dNTP mix (10 mM) y 11.5  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas; después, la reacción se calentó a 65°C por 5 min y se incubó en hielo por 2 min. Posteriormente, se añadió 4  $\mu$ l de buffer 5X, 0.1  $\mu$ l de RNAasa y 0.5  $\mu$ l de la enzima M-MLV RT (200 U/ $\mu$ l) esta mezcla de reacción se añadió a la anterior y se agregó 100 ng de RNA obtenido de células o tejido cerebral. Después, la reacción se incubó por 30min a 16°C y se realizaron 60 ciclos a 30°C por 30 seg, 42°C por 30 seg y 50°C por 1 seg. La enzima RT se inactivó incubando la muestra a 85°C por 5 min. Los controles negativos que se incluyeron en la reacción de RT fueron una reacción sin enzima y otra sin RNA (Varkonyi-Gasic y Hellens, 2011).

Una vez obtenido el cDNA se procedió a realizar la reacción de qPCR bajo las siguientes condiciones: 5  $\mu$ l de SYBR Green (Thermo Scientific), 1  $\mu$ l de los oligonucleótidos FW (forward)

(10  $\mu$ M) específico de cada miRNA (Tabla 3), 1  $\mu$ l del oligonucleótido RV (reverse) universal (10  $\mu$ M) y 1  $\mu$ l de cDNA. La reacción de qPCR se corrió a 95°C por 3 min y 40 ciclos de 95° C por 5 seg y 60°C por 35 seg. El control interno que se utilizó fue el RNA pequeño nuclear U6 (U6).

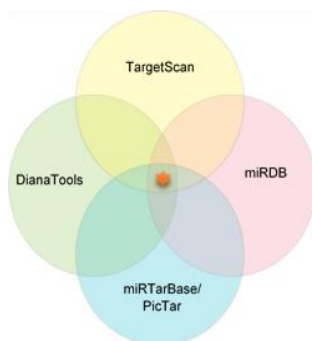
**Tabla 3.-Lista de oligonucleótidos usados para la qPCR de los miRNAs y el control interno U6.**

miRNA	FW	RV
miRNA-125a	<b>GCGGCGGCTCCCTGAGACCCTTTAAC</b>	GTGCAGGGTCCGAGGT
miRNA-125b	<b>GCGGCGGCTCCCTGAGACCCTAAC</b>	
miRNA-181a	<b>GCGGCGGCAACATTCAACGCTGTCTG</b>	
miRNA-7	<b>GCGCACCTTCTGATCACTAAAA</b>	
snRNA U6	CTCGCTTCGGCAGCACA	AACGCTTCACGAATTTGCGT

En negritas se muestran las secuencias que son específicas para cada miRNA maduro y en color negro se observa las bases que se añadieron a los oligonucleótidos FW para aumentar la temperatura de fusión. También, se observa la secuencia del oligonucleótido RV universal que es complementario a una secuencia que está dentro del tallo-asa del oligonucleótido RT.

#### 6.14.-Análisis de las vías de señalización de miRNAs

Con el objetivo de conocer los procesos celulares en los cuales están implicados los miRNA-125a y miRNA-7 se realizó una búsqueda de sus blancos utilizando las bases de datos TargetScan, miRDB, miRTarBase y DianaTools. En el caso del miRNA-7 se utilizó la base de datos PicTar en lugar de miRTarBase debido a que miRTarBase presenta pocos blancos putativos agregados en su base de datos. Los blancos que fueron compartidos entre las bases de datos se tomaron para futuros análisis (Figura 15); además, se incluyeron los RNAm blancos que fueron predichos en modelos *in vitro* por la técnica HITS-CLIP. Después, los RNAm blancos de los miRNA-125a y miRNA-7 se analizaron con el programa en línea GENEONTOLOGY (GO, <http://geneontology.org/>) para el análisis de enriquecimiento de "función molecular", "procesos biológicos" y "componentes celulares", así como "vías". Los resultados con un valor P <0.05 se consideraron significativos.



**Figura 17.-Diagrama de Venn.** Los RNAm blancos de los miRNAs compartidos entre las bases de datos TargetScan, miRDB, miRTarBase y DianaTools se seleccionaron para el análisis en GO.

## 6.15.- Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con GraphPad Prism 8.0.1 utilizando anova de una vía, anova de dos vías y t de student según el grupo de datos y las condiciones experimentales. Los análisis post-test que se realizaron fueron Bonferroni, Dunnett y Tukey para comparaciones múltiples. La significancia estadística fue establecida con los valores de p, donde \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  y n.s, no significativo.

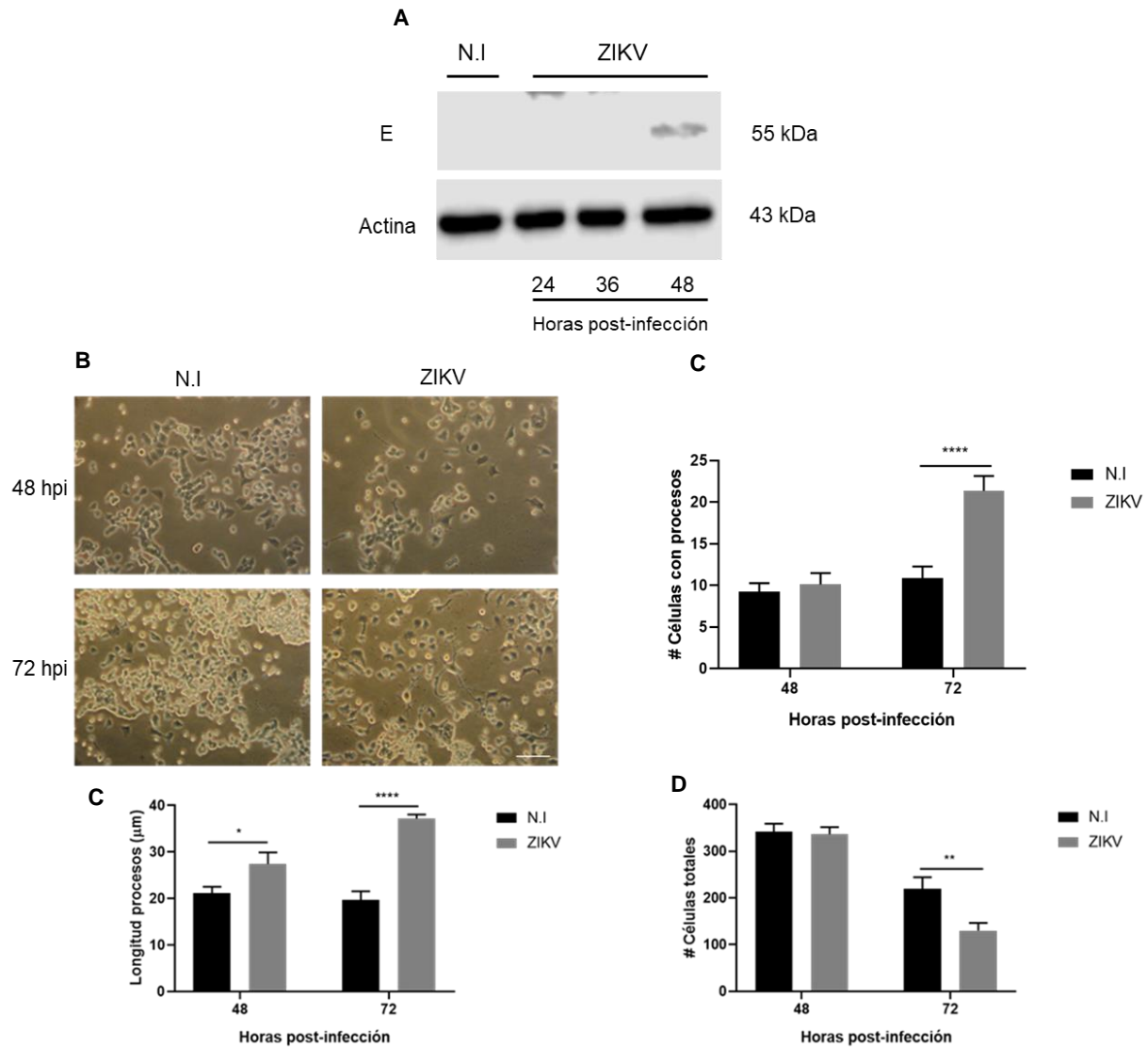
## 7.0.- RESULTADOS

### 7.1.-ZIKV infecta a las células N2A e induce su diferenciación

Para responder a las preguntas de investigación planteadas sobre la expresión de miRNAs en la infección con ZIKV durante el desarrollo del SNC se utilizó como modelo *in vitro* la línea celular N2A. Las células N2A provienen de un neuroblastoma y se han utilizado como modelos de estudio del neurodesarrollo ya que poseen un fenotipo pluripotente. Además, estas células son susceptibles y permisivas a la infección con virus de DNA y RNA como VHS (dcDNA), virus de la estomatitis vesicular (ssRNA -) y polio virus humano (ssRNA +). Por otra parte, ZIKV infecta células no diferenciadas de manera eficiente (Tang et al., 2017), lo que hace a las células N2A un buen candidato como modelo de estudio.

Dado que no existen reportes sobre la infección de células N2A con ZIKV, inicialmente se realizó una cinética de infección con el objetivo de conocer la susceptibilidad de las células al virus. El curso de la infección se siguió midiendo los niveles de la proteína viral E por ensayos tipo western-blot a diferentes horas post-infección. La presencia de la proteína E en las células N2A se observó hasta las 48 hpi (Figura 18A); en cambio, en las células Vero, esta proteína es detectada desde las 24 hpi (Figura S1D), lo cual sugiere que las células N2A se infectan con ZIKV (es decir, son susceptibles a este virus). Además, se observó que las células N2A infectadas con ZIKV comenzaron a diferenciarse (Figura 18B). Es decir, a pesar de que no observamos una elevada producción de la proteína viral E, las células N2A infectadas comenzaron a desarrollar neuritas (Figura 18C, D) en comparación con células no infectadas. Este comportamiento ha sido reportado en hCPN infectadas con ZIKV (McGrath et al., 2017). Además, el fenotipo es similar al de las células N2A inducidas a diferenciación por reducción en el porcentaje de SFB en cultivo (Jaworski y Pérez-Martínez, 2010). El incremento en el número de células con crecimiento de neuritas fue evidente a las 72 hpi ( $p < 0.001$ ) y el aumento en la longitud de las neuritas fue significativo desde las 48 hpi ( $p < 0.05$ ). Además, el número celular por campo disminuyó a las 72 hpi en las células infectadas con respecto a las no infectadas (Figura 18E), lo cual podría indicar que hay una reducción en la proliferación celular dependiente de la infección con ZIKV o un aumento en la muerte celular.



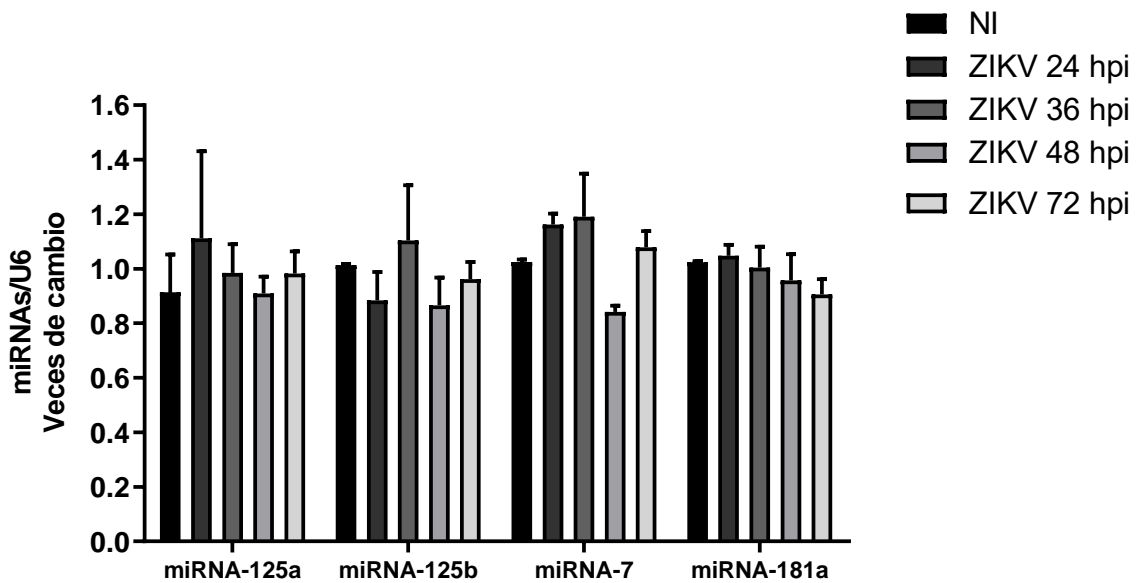


**Figura 18.-El ZIKV induce la diferenciación de las N2A.** A).-Se observa la cinética de infección de las N2A a 24, 36 y 48 hpi, como control de carga se utilizó actina; las células no infectadas se colectaron a las 48 h. B).- Se tomaron fotos de las células N2A a 48 y 72 hpi se muestran fotos representativas de tres experimentos independientes (Barra de escala, 20  $\mu$ m). C).- Para el análisis de las imágenes se utilizó el programa fiji y el conteo celular se realizó con el plugin “cell counter”; se contaron el total de células por foto (considerado como el 100%) y después se contabilizaron las células con neuritas para sacar el % de las mismas. D).- La longitud de las neuritas se midió utilizando el plugin “Neuro J” tanto en células no infectadas como en células infectadas con ZIKV. La gráfica muestra la longitud de las neuritas en micrómetros ( $\mu$ m). E).- El número total de células se obtuvo con el plugin “cell counter” a las 48 y 72 hpi. Las gráficas de barras muestran la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes El análisis estadístico se realizó utilizando anova de dos vías y Sidaks para comparaciones, donde \*P < 0.05; \*\*\*P<0.001 y \*\*\*\* P<0.0001. N.I: No infectadas, ZIKV: Virus Zika y hpi: horas post-infección.

Estudios previos han mostrado que ZIKV induce la diferenciación prematura de CPN hacia un fenotipo neural (Bhagat et al., 2016). Dado que los miRNA-125a, miRNA-125b, miRNA-181a y miRNA-7 son de interés en este estudio por su papel en el desarrollo del SNC (Stappert et al., 2013; Caygill y Brand, 2017; Sempere et al., 2004), se procedió a analizar su expresión por ensayos de RT-qPCR en células N2A infectadas con el ZIKV a MOI de 10 a diferentes horas post-

infección (24, 36, 48 y 72 hpi) y en células no infectadas para conocer los niveles basales de los miRNAs.

Los datos obtenidos de la RT-qPCR no mostraron diferencias estadísticamente significativas en la abundancia de los miRNAs de interés en las células infectadas respecto a las no infectadas (Figura 19). Sin embargo, se observaron tendencias al aumento en la acumulación de miRNA-7 a 24 hpi y una disminución a las 48 hpi. Los datos anteriores sugieren que la diferenciación celular observada en las células N2A infectadas con ZIKV (Figura 18) no depende de cambios en la expresión de los miRNAs-125a, miRNA-125b, miRNA-181a y miRNA-7.

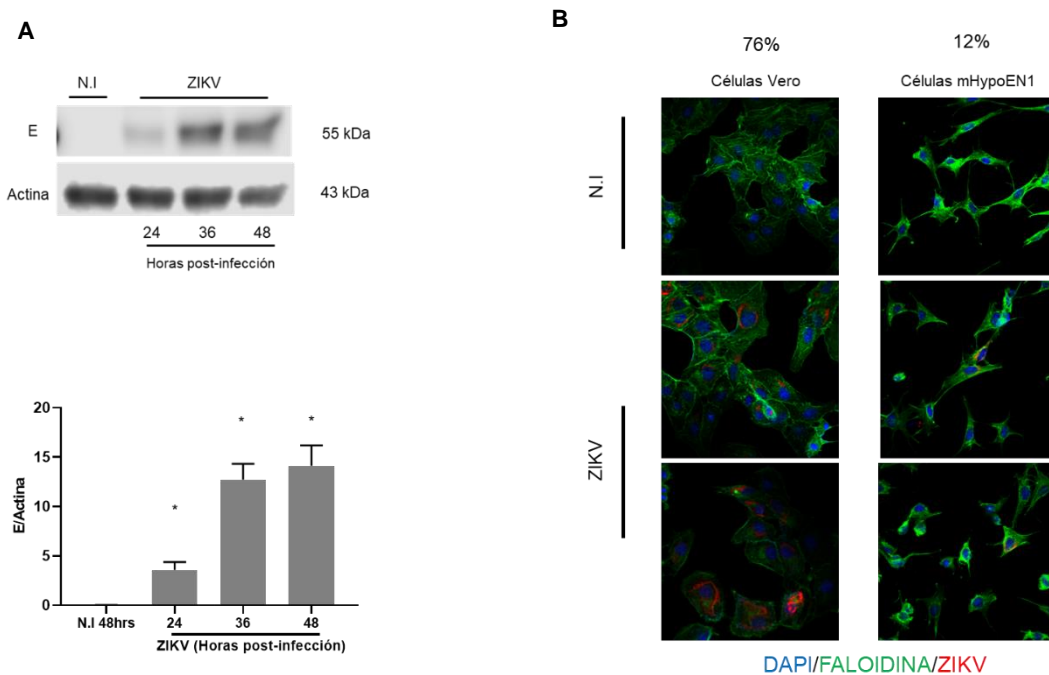


**Figura 19.-La infección de las células N2A con ZIKV no afecta la abundancia de los miRNA-125a, miRNA-125b, miRNA-7 y miRNA-181a.** Se observa la cinética de expresión de los miRNA-125a, miRNA-125b, miRNA-7, y miRNA-181a a 24, 36, 48 y 72 horas post-infección. La normalización de la acumulación de los miRNAs se realizó con el RNA nuclear pequeño no codificante U6 y las veces de cambio se determinaron con respecto a las células no infectadas. La gráfica muestra la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó utilizando anova de una vía y Bonferroni's para comparaciones múltiples. N.I.: No infectado y ZIKV: Virus Zika.

## 7.2.-La línea celular mHypoE-N1 es susceptible a la infección con ZIKV

En estudios anteriores se ha determinado que el cerebro es uno de los principales órganos blanco durante la infección con ZIKV, siendo las zonas replicativas principales la corteza, el tálamo, el hipocampo, la retina y el hipotálamo (Cugola et al., 2016; Li et al., 2018). Dado que los miRNAs en estudio fueron inicialmente identificados en el hipotálamo en desarrollo (Tesis de doctorado. Meza-Sosa, 2015), en el presente trabajo se usó como modelo de estudio la línea celular mHypoE-N1 que son neuronas hipotalámicas (obtenidas de E15, 17 y 18) de origen murino. Además, cabe señalar que las neuronas son un blanco en la infección con ZIKV (Van den Pol et al., 2017) y se conoce muy poco sobre los mecanismos que participan durante la infección neuronal.

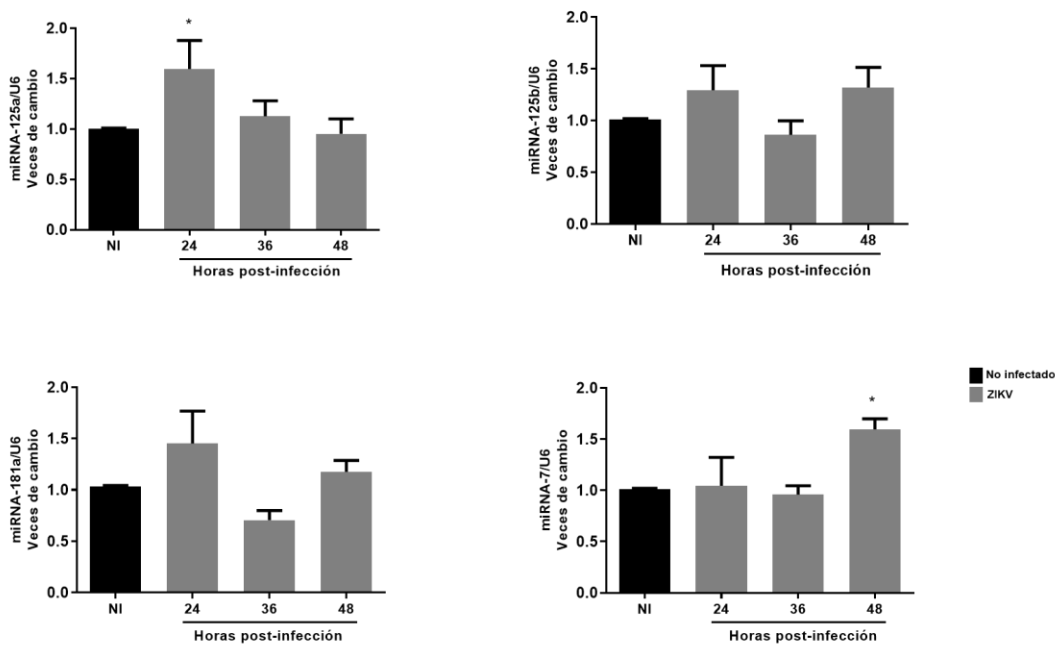
Para determinar la susceptibilidad de las células mHypoE-N1 a infectarse con ZIKV se realizó una cinética de infección y se analizaron los niveles de la proteína viral E por ensayos de tipo western-blot a 24, 36 y 48 hpi. La proteína viral E se detectó en las células mHypoE-N1 desde las 24 hpi (Figura 20) con una mayor acumulación a las 48 hpi ( $p < 0.001$ ). Las células mHypoE-N1 muestran una mayor permisividad a la infección con ZIKV respecto a las células N2A (Figura 18A) debido a que detectamos la presencia de la proteína viral E desde las 24 hpi. También, determinamos el porcentaje de células infectadas en nuestros cultivos celulares. Para ello, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia usando un anticuerpo específico contra la proteína E y como control positivo incluimos a las células Vero, las cuales son susceptibles y permisivas a la infección con ZIKV (Osada et al., 2014). Con base en los ensayos de western-blot (Figura 20A), los experimentos de inmunofluorescencia se realizaron a las 36 hpi cuando la acumulación de la proteína E alcanza su máximo nivel; indicativo del pico de infección en las células mHypoE-N1. En la figura 20B se observa que solo el 12% de las células mHypoE-N1 son positivas a ZIKV comparado con el 76% en las células Vero. Estos datos sugieren que las células mHypoE-N1 son susceptibles a infectarse con ZIKV; sin embargo, el porcentaje de infección en esta línea celular es bajo con respecto a las células Vero (Figura 20B).



**Figura 20.-Las células mHypoE-N1 son susceptibles a la infección con ZIKV.** A).-Las células mHypoE-N1 fueron infectadas con ZIKV a una MOI de 10 a distintos periodos de tiempo (24, 36 y 48 hpi). La acumulación de la proteína E se determinó por ensayos tipo western-blot. El panel A muestra un gel representativo de tres experimentos independientes y el panel de abajo muestra los niveles de la proteína E normalizados con respecto a actina. Se muestra el promedio  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. El análisis estadístico que se realizó fue anova de una vía y Dunnett's para comparaciones con respecto a células no infectadas donde  $*p < 0.05$ . B).- Se muestra la detección de la proteína E por ensayos de inmunofluorescencia en células Vero (panel izquierdo) y en mHypoE-N1 (panel derecho) no infectadas o infectadas con ZIKV por 36 hpi. Se muestran los filamentos de actina (tinción con faloidina), la tinción de los núcleos (DAPI) y se incluye el porcentaje de infección con respecto al número total de células por campo. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal olympus Fluoview 1000 (Barra de escala, 30  $\mu$ m) E: proteína de envoltura; N.I: No infectado y ZIKV: virus Zika.

### 7.3.- La infección con ZIKV aumenta la expresión de los miRNA-125a y miRNA-7 en células mHypoE-N1

Después de determinar que el ZIKV infecta a las células mHypoE-N1 se procedió a medir la abundancia de los miRNAs-125a, miRNA-125b, miRNA-181a y miRNA-7 mediante RT-qPCR a diferentes horas post-infección. En la figura 21 se observa que a 24 hpi aumenta la abundancia del miRNA-125a ( $p < 0.05$ ) con respecto a células no infectadas. De manera interesante también se observó un incremento significativo del miRNA-7 a las 48 hpi ( $p < 0.05$ ). En las células mHypoE-N1 infectadas con ZIKV aumenta la abundancia de los miRNA-125a y miRNA-7 con respecto a las células no infectadas, siendo estos cambios dependientes del tiempo de infección.



**Figura 21.-El ZIKV induce cambios en la expresión de los miRNAs-125a y miRNA7.** Las células mHypoE-N1 fueron infectadas con ZIKV a una MOI de 10 por distintos periodos de tiempo (24, 36 y 48 hpi). La abundancia de los miRNA-125a y miRNA-7 se determinó en células mHypoE-N1 infectadas y no infectadas mediante ensayos de RT-qPCR, los valores fueron normalizados con respecto a U6 y las veces de cambio se determinaron con las células no infectadas. Las gráficas muestran la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. Para el análisis de los datos se utilizó anova de una vía y Bonferroni para comparaciones múltiples. \* $p < 0.05$ . N.I: No infectado y ZIKV: Virus Zika.

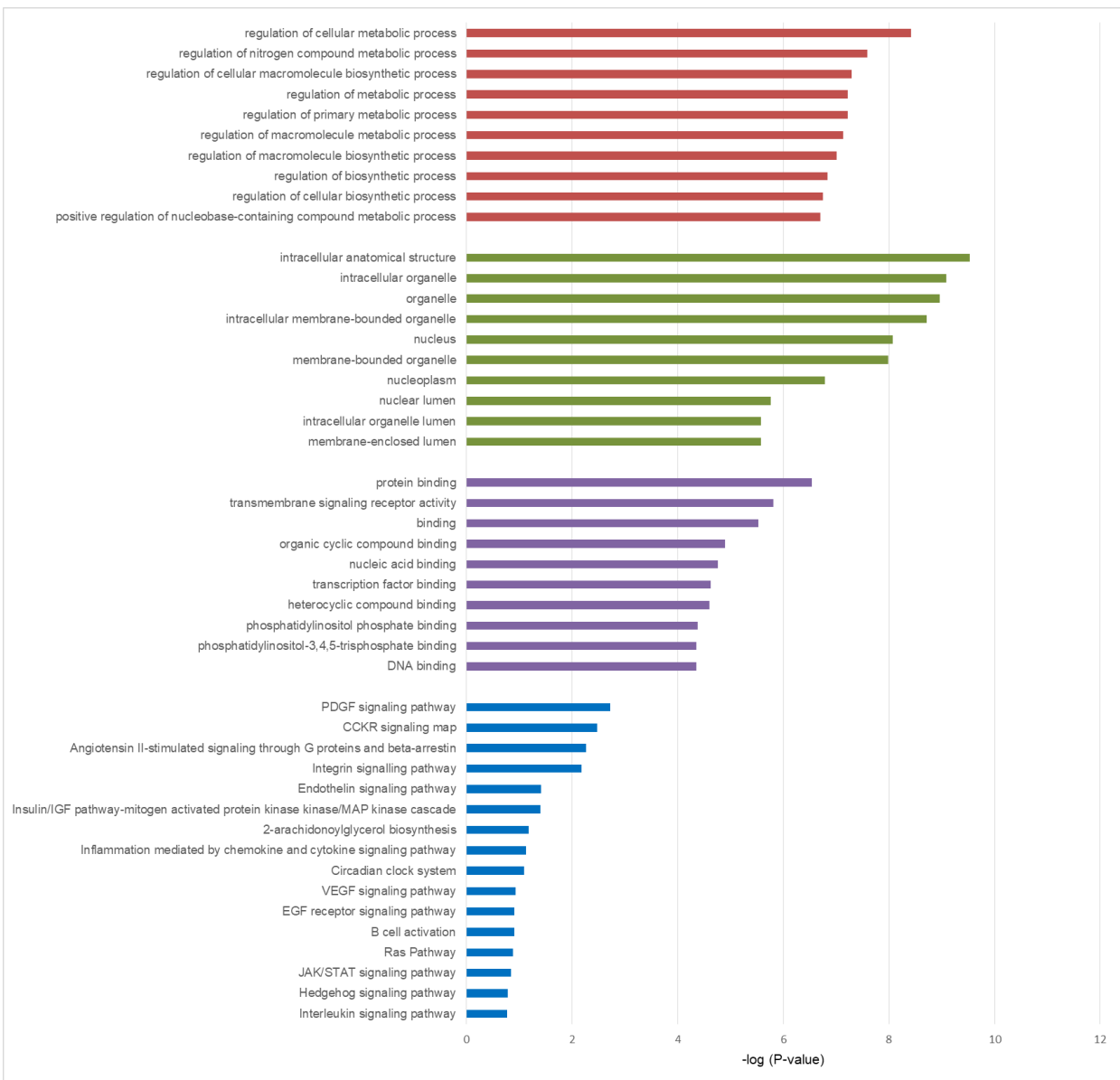
### 7.4.- Los miRNA-125a y miRNA-7 modulan vías celulares relacionadas con inflamación

Los experimentos de RT-qPCR en las células mHypoE-N1 infectadas con ZIKV mostraron un aumento en la abundancia de los miRNA-125a y miRNA-7 (Figura 21). Por consiguiente, para comprender mejor el impacto del aumento en la expresión de los miRNA-125a y miRNA-7 se procedió a hacer un análisis de los RNAm blancos de estos miRNAs con el objetivo de predecir las posibles vías de señalización y los procesos celulares que se ven alterados en la infección viral. La búsqueda de los RNAm blancos se realizó con las bases de datos TargetScan, miRDB, miRTarBase, DianaTools y PicTar (materiales y métodos) donde se incluyeron para el análisis

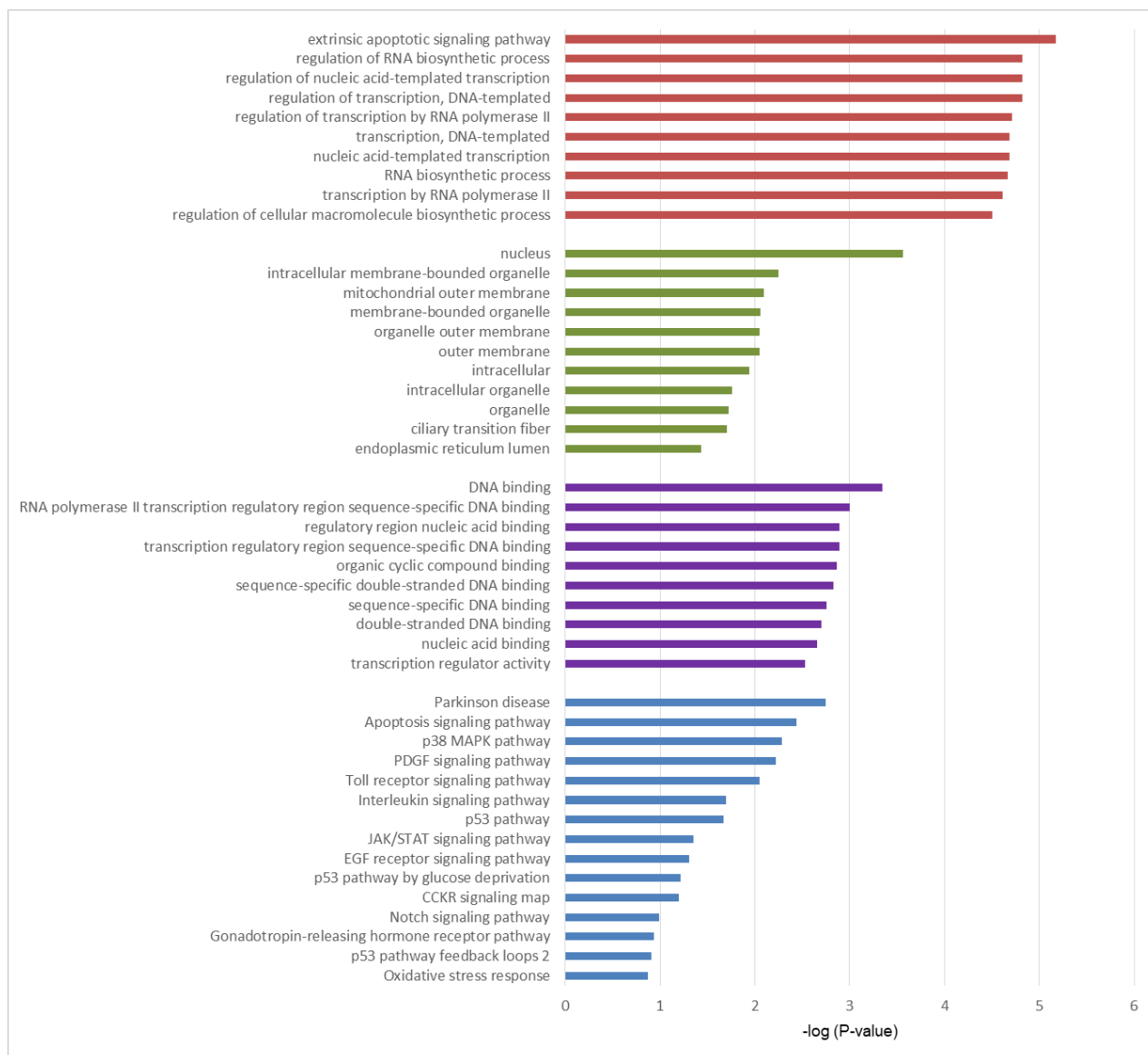
los RNAm blancos compartidos entre las bases de datos. El análisis se realizó en GENEONTOLOGY para conocer la "función molecular", "procesos biológicos", "componentes celulares" y "vías" en las cuales están implicados los RNAm blancos. Se analizaron 187 RNAm blanco del miRNA-7 y 54 RNAm blanco del miRNA-125a. Los resultados se graficaron sacando el -log del valor de P value. Los 10 y 15 resultados de "función molecular", "procesos biológicos", "componentes celulares" y "vías" se pueden observar en las figuras 22 y 23 para los miRNAs-7 y miRNA-125a, respectivamente.

En el análisis de "procesos biológicos" de los RNAm blancos del miRNA-7 se encontraron el metabolismo celular, metabolismo de compuestos nitrogenados, biosíntesis de macromoléculas y regulación del metabolismo; en el término "componentes celulares" se encuentra la estructura intracelular, organelos intracelulares, organelos y organelos de doble membrana; en "función molecular" están proteínas de unión, actividad de receptores transmembranales de señalización, unión y unión a compuestos orgánicos cíclicos. Por último, en la categoría de "vías" se observó la vía de señalización de PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), CCXR (receptor de quimiocinas), la vía de integrinas y la de angiotensina II estimulada por proteína G.

En el análisis de "procesos biológicos" de los RNAm blancos del miRNA-125a se encontró la vía de señalización extrínseca de apoptosis, regulación de la transcripción, regulación de la biosíntesis de RNA y regulación de la transcripción por la RNA polimerasa II; en "componentes celulares" se encuentra núcleo, organelos intracelulares de doble membrana, membrana externa de la mitocondria y organelos rodeados por membrana; en "función molecular" se encontró unión a DNA, regulación de unión al DNA por la RNA polimerasa II y regulación de la transcripción; por último, en la categoría de "vías" se observaron aquellas relacionadas con la enfermedad de Parkinson, vía de apoptosis, P38 MAPK y la vía de PDGF. Además, se observó que el miRNA-7 regula vías implicadas en SNC y en respuesta antiviral como es SHH y la cascada de señalización de Jak/STAT. Por otro lado, el miRNA-125a está implicado en la vía de NOTCH, TLRs, interleucinas y Jak/STAT.



**Figura 22.-El miRNA-7 modula vías implicadas en metabolismo celular, respuesta inmune y neurodesarrollo.** Se observan los 10 resultados con mejor puntaje obtenidos en el análisis en GO; "procesos biológicos" en barras rojas, "componente celular" en barras verdes, "función molecular" en barras moradas y en barras azules se presentan las "vías" en las que están implicados los RNAm blancos. La gráfica muestra [-log (valor P)].



**Figura 23.-El miRNA-125a modula vías de respuesta inmune innata (TLR), MAP cinasas y estrés oxidativo.** Se observan los 10 resultados con mejor puntaje obtenidos por el análisis en GO son "proceso biológico" en barras rojas, "componente celular" en barras verdes, "función molecular" en barras moradas y en barras azules se presentan las "vías" en las que están implicados los RNAm blancos. La gráfica muestra [-log (valor P)].

Los análisis de enriquecimiento de "vías" muestran que tanto el miRNA-7 como el miRNA-125a modulan vías de señalización relacionadas con inflamación, activación de TLRs y neurodesarrollo (Figura 22 y 23). En la literatura se menciona que la inflamación puede afectar directamente la neurogénesis. En este sentido, se ha observado que la expresión de interleucina 1 $\beta$  reduce la neurogénesis en el hipocampo de ratones adultos, además de que promueve la diferenciación de las CPN al linaje de astrocitos (Wu et al., 2012). En las CPN tratadas con LPS disminuye la diferenciación hacia neuronas y aumenta la muerte celular en un mecanismo dependiente de la activación de TNF e IL-18 (Liu et al., 2005), mientras que la sobreexpresión de IL-6 promueve la diferenciación de las CPN hacia oligodendrocitos (Islam et al., 2009). Además, la activación de la

microglía (modelos *in vitro*) por LPS conlleva al incremento en TNF, aumento en la muerte celular de las CPN y una disminución en la neurogénesis hipocampal (Cacci et al., 2005).

Debido a que los miRNAs están sujetos a regulación por FT con actividad antiviral e inflamatoria y que los miRNAs presentan circuitos de retroalimentación negativa y positiva con las vías inmunes (Zhao et al., 2015; Zhang et al., 2017) se planteó medir la acumulación de los FT STAT3, NF- $\kappa$ B e IRF3 mediante western blot para determinar su posible papel como reguladores de expresión de los miRNAs.

### 7.5.- La infección con ZIKV de células mHypoE-N1 no cambia la acumulación de las formas fosforiladas de FT relacionados con inflamación y respuesta antiviral.

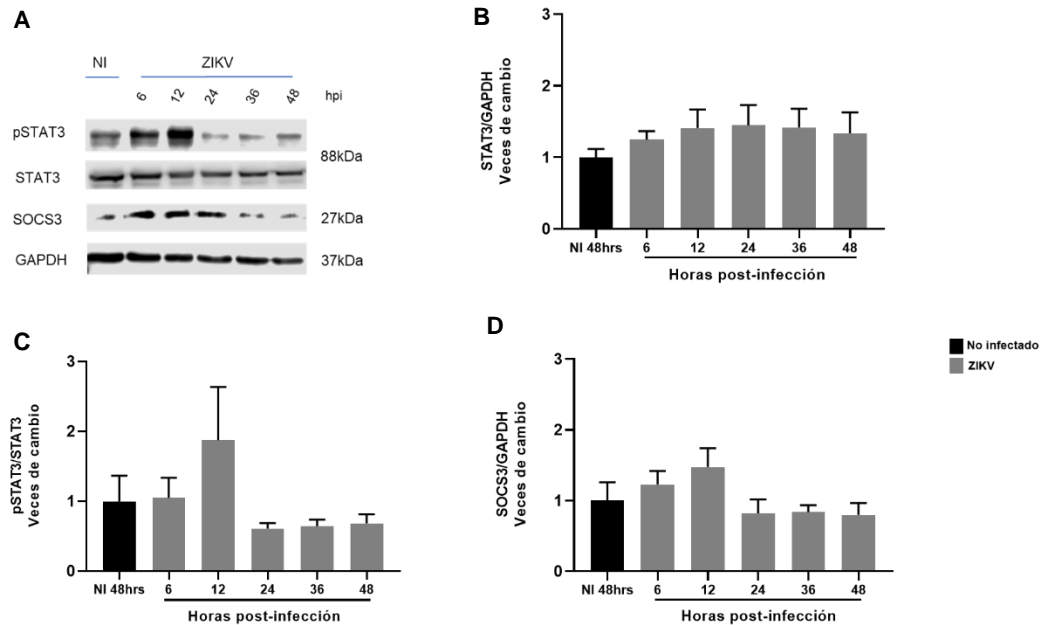
El análisis de la abundancia de miRNAs por RT-qPCR mostró un aumento en la expresión de los miRNA-125a y miRNA-7 en respuesta a la infección con ZIKV (Figura 19). En estudios anteriores se ha observado que los miRNA-125a y miRNA-7 son sujetos a regulación por FT de vías inflamatorias y antivirales (Zhao et al., 2015; Zhang et al., 2017; Markopoulos et al., 2017, Kiko et al., 2013). Así mismo, en nuestro grupo de trabajo se ha observado por análisis *in silico* que los FT STAT3, NF- $\kappa$ B/p65 e IRF3 reconocen secuencias consenso en los promotores de los miRNAs antes mencionados (Tesis de licenciatura. José Antonio Urban, 2017), por lo cual se hicieron experimentos de tipo western-blot para determinar la acumulación de las formas fosforiladas de STAT3, NF- $\kappa$ B/p65 e IRF3.

#### Vía JAK/STAT

Algunas infecciones virales activan la vía de Jak/STAT y la expresión de genes efectores relacionados con la inmunidad celular (Carow y Rottenberg, 2014); en el caso concreto de ZIKV, se ha observado que en células neurales infectadas aumenta la expresión de IL-6 (Azous et al., 2019). IL-6 es reconocida por receptores de citocinas acoplados a JAK que fosforilan a STAT3 (pSTAT3) con la subsecuente formación de dímeros que se translocan al núcleo uniéndose a los promotores de sus genes blancos (Poli et al., 2017). De manera interesante, la activación de STAT3 está sujeta a regulación por la proteína supresora de la señalización de citocinas 3 (SOCS3). SOCS3 se une tanto a la cinasa Jak como al receptor de citocinas e inhibe la fosforilación de STAT3 (Carow y Rottenberg, 2014; Gao et al., 2018).

Los niveles de pSTAT3 y de su regulador negativo SOCS3 se determinaron en células mHypoE-N1 infectadas con ZIKV a MOI 10 mediante ensayos de tipo western-blot a 6, 12, 24, 36 y 48 hpi. Las células no infectadas de 48 h de cultivo muestran los niveles basales de SOCS3 y STAT3/pSTAT3; como control de carga se usó GAPDH. En el western-blot de STAT3 no se observaron cambios significativos en los niveles proteicos en las células infectadas con respecto a las no infectadas (Figura 24A). Sin embargo, se observó una tendencia al aumento de pSTAT3 a 12 hpi (Figura 24C). Los datos anteriores sugieren que en respuesta a la infección con ZIKV no aumenta de manera significativa pSTAT3 (disminución de pSTAT3 después de las 12 h).





**Figura.-24.-La infección con ZIKV no induce el aumento en los niveles de pSTAT3.** A).- Las células mHypoE-N1 fueron infectadas con ZIKV a una MOI de 10 por distintos periodos de tiempo (6, 12, 24, 36 y 48 hpi). Los niveles de las proteínas pSTAT3, STAT3 y SOCS3 se determinaron por ensayos tipo western-blot, como control de carga se usó GAPDH; la figura muestra un gel representativo de tres experimentos independientes. B).- Los niveles de pSTAT3 se normalizaron con STAT3. C).- La normalización de STAT3 se realizó con GAPDH. Las veces de cambios se obtuvieron con respecto a células no infectadas. D).- Se muestra la gráfica de SOCS3 que se normalizó con GAPDH, las veces de cambio se obtuvieron de células no infectadas. Las gráficas muestran la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. Para el análisis se utilizó anova de una vía, las diferencias se evaluaron respecto a células no infectadas utilizando el test de Dunnett's. N.I.: No infectado; ZIKV: Virus Zika y hpi: horas post-infección.

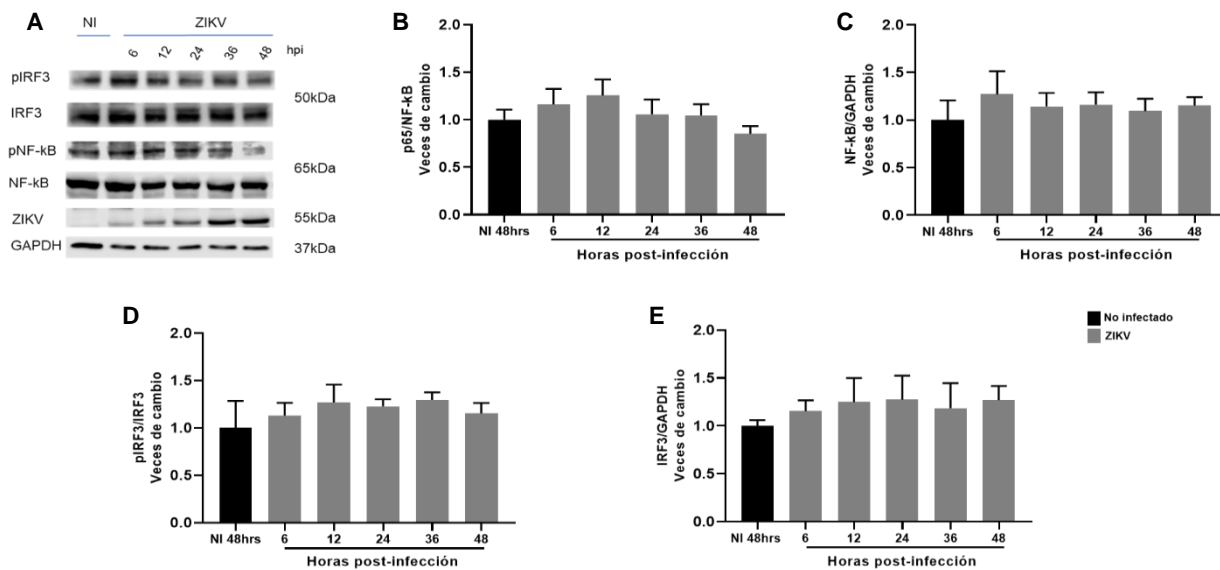
## Vía de TLR3

Los receptores tipo toll son una familia de proteínas de membrana con funciones en la inmunidad innata que reconocen PAMPs, dentro de esta familia se incluye el TLR3 que reconoce RNA viral de doble cadena (Takeda y Akira, 2004). La señalización por TLR3 activa FTs importantes en la respuesta inmune innata al inducir genes antivirales como IFN (Akira, 2006). Además, la activación de TLR3 transmite señales a proteínas cinasas inhibitoras (IKKs) que resultan en la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  (Represor de NF- $\kappa$ B) con la subsecuente translocación al núcleo de NF- $\kappa$ B (p65) (Deng et al., 2018). De igual manera, con la señalización de TLR3 se fosforila el FT IRF3 que en el núcleo se une a los promotores de sus genes blanco, entre ellos el IFN $\beta$  (Takeda y Akira, 2004).

En el desarrollo embrionario TLR3 se expresa en CPN (E13.5) (Lathia et al., 2008) y en neuronas corticales de ratón (Cameron et al., 2007). Además, La activación del receptor TLR3 disminuye el crecimiento axonal (Cameron et al., 2007). En las CPNs la activación de TLR3 reduce la proliferación celular a través de IRF3, disminuyendo la cantidad de neuronas que llegan a las capas superiores de la corteza cerebral (Lathia et al., 2008; Yaddanapudi et al., 2011). Por otra parte, la infección con ZIKV aumenta la expresión de TLR3 en astrocitos, fibroblastos y

neuroesferas de ratón (Hamel et al., 2015; Ojha et al., 2019) y el aumento en los niveles de TLR3 por ZIKV se ha asociado negativamente con el desarrollo del SNC (Dang et al., 2016).

Por lo anterior, en los siguientes experimentos determinamos si en respuesta a la infección con ZIKV hay cambios en los niveles de NF- $\kappa$ B/p65 e pIRF3/IRF3 en células mHypoE-N1 infectadas con ZIKV a MOI 10 por 6, 12, 24, 36 y 48 hpi. Los niveles de proteínas se determinaron mediante ensayos tipo western-blot. Los análisis de densitometría (Figura 25A) no mostraron cambios significativos en los niveles de p65 y NF- $\kappa$ B en células infectadas con respecto a las no infectadas (Figura 25B). Sin embargo, se observó la tendencia a la disminución de p65 a partir de las 24 hpi. Los niveles de pIRF3 (S396) no presentaron cambios con respecto a las células no infectadas (Figura 25D). De manera contraria, IRF3 mostró una tendencia al aumento en sus niveles a partir de las 6 hpi comparado con células no infectadas (Figura 25E).



**Figura 25.-La infección de células mHypoE-N1 con ZIKV no cambia los niveles de p65 y pIRF3.** A).-Se observa un western-blot representativo de tres experimentos independientes, como control de carga se utilizó GAPDH; las células no infectadas corresponden al tiempo de 48 h que indican los niveles basales de las proteínas. El análisis de las densitometrías de los western-blot se realizó con el programa Licor. B).- Los niveles de p65 se normalizaron en relación a la proteína de NF- $\kappa$ B. C).- NF- $\kappa$ B se normalizó con respecto a GAPDH; las veces de cambio se calcularon con respecto a las células no infectadas D).- El pIRF3 se normalizó con respecto a la forma no fosforilada de IRF3. E).- IRF3 fue normalizado con GAPDH. Las gráficas muestran la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes; el análisis estadístico se realizó en GraphPad utilizando anova de una vía, las diferencias se evaluaron respecto a células no infectadas utilizando el test de Dunnett's. N.I.: No infectado; ZIKV: Virus Zika y hpi: horas post-infección.

## 7.6.- Los neonatos murinos de la cepa C57BL/6 recapitulan la patogénesis durante la infección con ZIKV

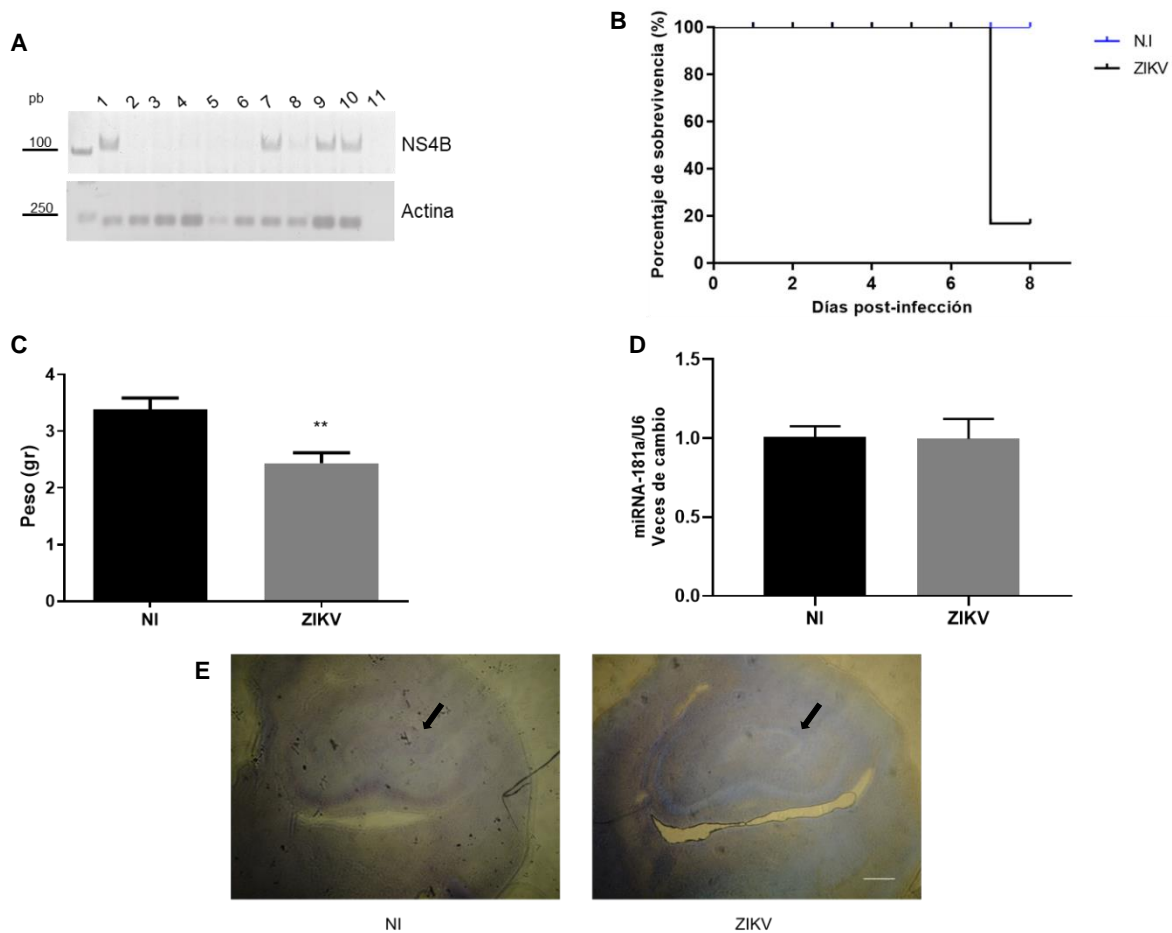
Los resultados obtenidos con los modelos *in vitro* en células mHypoE-N1 nos permitieron conocer que durante la infección con ZIKV hay cambios en la expresión de miRNAs. Por lo tanto, con la idea de tener un modelo de estudio que reproduzca la patogénesis observada en humanos durante la infección con ZIKV, se estableció en el laboratorio un protocolo de infección *in vivo* en

neonatos y embriones murinos de la cepa C57BL/6. Los datos en la literatura mencionan que ZIKV se replica eficientemente en cerebros de neonatos murinos, con lo cual, es posible recapitular los fenotipos de neurodegeneración ocasionados por la infección (Lazear et al., 2016; Rossi et al., 2016). Las vías de inoculación principales son intracerebroventricular, intraperitoneal y en las almohadillas de las patas (Rossi et al., 2016; Li et al., 2018).

En el laboratorio, los ratones neonatos de la cepa C57BL/6 fueron inoculados con ZIKV de manera intracraneal al P3 con  $3 \times 10^4$  UFP/neonato, después de 2, 4 y 6 dpi se sacrificaron, se extrajo el cerebro y se determinaron los positivos a ZIKV por ensayos de PCR punto final (Figura 26A). Los neonatos infectados con ZIKV mostraron una mortalidad del 85% a los 7 dpi (Figura 26B). En el curso de los días se observó que los infectados presentaron características típicas de la enfermedad como es pérdida de peso ( $p < 0.001$ ) (Figura 26C), parálisis en uno o dos miembros posteriores y retraso en el crecimiento corporal con respecto a los no infectados. Estos datos corroboran lo previamente publicado en cuanto al retraso en el crecimiento (Wu et al., 2018).

Además, ha sido reportado que durante la infección con ZIKV se presenta una disminución en las CPN (Tang et al., 2017) y otras anomalías morfológicas diferentes a microcefalia como son atrofia parenquimatosa cerebral con ventriculomegalia, calcificaciones, malformaciones en la corteza cerebral, tales como polimicrogiria y lisencefalia, agenesia, hipoplasia del cuerpo caloso, hipoplasia cerebelosa y artrogriposis (Mlakar et al., 2016; Song et al., 2017). Por lo anterior, se realizó un análisis del tejido cerebral de los neonatos infectados con ZIKV con la idea de corroborar la infección y recapitular el daño al SNC que ya ha sido reportado. Se realizaron cortes en el micrótopo de  $30 \mu\text{m}$  de los cerebros de ratones infectados y no infectados con ZIKV y se realizó la tinción de Nissl, donde se observó una menor intensidad en la coloración en los cerebros de neonatos infectados con respecto a los no infectados, lo cual es un indicio de la pérdida celular en la región del hipocampo, lo que sugiere una disminución en la población celular de esa región (Figura 26E). Sin embargo, es necesario la implementación de otra técnica histológica para corroborar las observaciones anteriores.

Una vez que se determinó la infección en los neonatos y el daño al SNC, se midió la abundancia del miRNA-181a mediante RT-qPCR. El miRNA-181a se expresa abundantemente en cerebro, siendo detectado en etapas embrionarias y postnatales (Miska et al., 2004; Tesis de doctorado. Meza-Sosa, 2015). La expresión del miRNA-181a en los cerebros de neonatos infectados con ZIKV ( $3 \times 10^4$  UFP/neonato) no presentó cambios significativos a los 2 dpi con respecto a los cerebros de ratones no infectados (Figura 26D), por lo cual se podría explorar su expresión en tiempos post-infección más largos.



**Figura 26.-Los neonatos C57BL/6 son susceptibles a la infección con ZIKV.** A).- PCR punto final de los cerebros positivos y negativos a la infección con ZIKV. Los embriones del 1 al 9 fueron inoculados de manera intracraneal con ZIKV o con medio DMEM como simulación de la infección. En el carril 10 se observa el control positivo de PCR y en el carril 11 el control negativo sin templado para la PCR punto final. B).-Gráfica de sobrevivencia de los neonatos inoculados con ZIKV o con medio DMEM, se observa que al día 7 post-infección se reduce notablemente la viabilidad. C).- Gráfica de peso corporal de los neonatos infectados con ZIKV o con medio DMEM, se observa una reducción en el peso de los neonatos infectados comparado con los no infectados. D).- Se midieron los niveles de miRNA-181a que se normalizaron con respecto a U6 en cerebros de neonatos infectados y no infectados. Las gráficas muestran la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes y los datos se analizaron mediante una prueba t de student.  $***p < 0.001$  E).- En flechas negras se señala la región del hipocampo con la tinción de Nissl en neonatos no infectados e infectados con ZIKV (Barra de escala 1mm). N.I: No infectado; ZIKV: Virus Zika y dpi: días post-infección.

## 7.7.- Los embriones de la cepa C57BL/6 son susceptibles la infección con ZIKV

Los experimentos *in vitro* de infección con ZIKV mostraron cambios en la expresión de los miRNA-125a y miRNA-7. Por lo mencionado, se estableció un modelo de infección *in vivo* en el contexto embrionario con el objetivo de corroborar los resultados de los experimentos realizados en células mHypoE-N1. Como se ha mencionado en la literatura, los embriones inmunocompetentes de la cepa C57BL/6 son susceptibles a la infección con ZIKV (Cui et al., 2016). Por tanto, se estandarizó el protocolo de infección intrauterina en embriones C57BL/6 para recapitular la patogénesis neural asociada a ZIKV y se evaluó la expresión de los miRNAs a nivel de SNC (Wu et al., 2016).

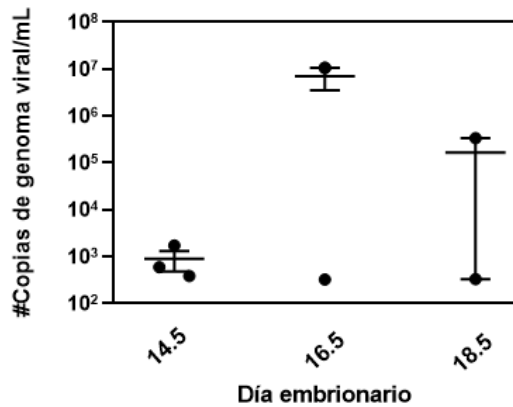
Para la estandarización del protocolo de inyección de embriones C57BL/6 se inoculó primero un vector que contiene el gen que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP) tanto en líquido amniótico (LA) como de manera intraceroventricular a E10.5, 12.5 y 13.5 (Figura S2); en estas pruebas se establecieron los parámetros de anestesia y saturación de oxígeno para las hembras gestantes C57BL/6. Después, se realizaron inoculaciones de ZIKV a diferentes concentraciones tanto en LA como intraceroventricular (Figura S2); con lo anterior, se determinó inocular el ZIKV en LA a una cantidad de  $1.5 \times 10^4$  UFP/embrión a E12.5 para los subsecuentes experimentos. Por datos en la literatura se conoce que a E9.5 el neuroepitelio comienza a originar las CNEs que se albergan en la ZV; durante E10.5 y E11.5 las CNEs están bajo divisiones simétricas promoviendo la expansión de su nicho y a E12.5 se encuentran CPN en divisiones simétricas y asimétricas (Mukhtar y Taylor, 2018).

Una vez que se establecieron los parámetros de infección, los embriones C57BL/6 fueron infectados con ZIKV en LA a E12.5 y se extrajeron los cerebros embrionarios a los 2 (E14.5), 4 (E16.5) y 6 dpi (E18.5). Posteriormente, se realizó la cuantificación del genoma viral por embrión (Tabla 4) con el uso de una curva estándar de la secuencia de 100 pb del gen NS4B que estaba clonada en el vector pCR2.1. Los resultados de las infecciones en embriones mostraron que la carga viral es dependiente del tiempo post-infección; a 2 dpi (E14.4) se detectó una carga viral de  $10^3$  copias de genoma viral/mL, a los 4 dpi (E16.5) se observó el pico máximo de infección ( $10^7$  copias de genoma viral/mL) y a los 6 dpi la carga viral cae detectándose un valor de  $10^5$  copias de genoma viral/mL (E18.5) (Figura 27).

**Tabla 4.-Carga viral de los embriones infectados con ZIKV.**

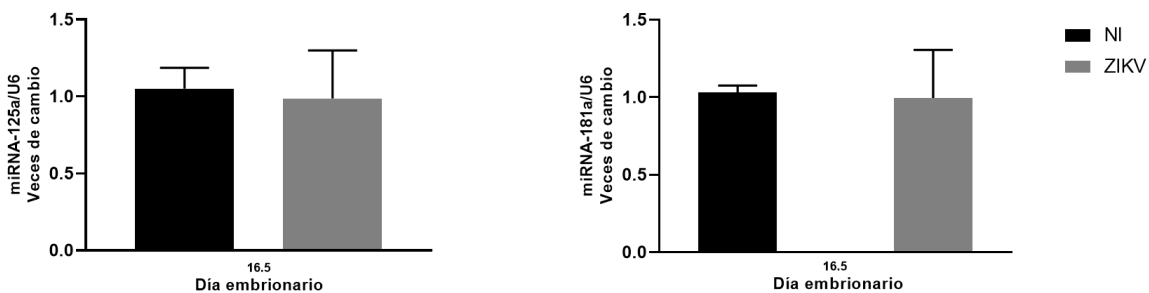
Posición del embrión	Día embrionario	Ct	ZIKV	#Copias/mL	Lote
4 IZQ	14.5	ND	-	ND	1
7 IZQ	14.5	ND	-	ND	1
10 IZQ	14.5	35.80	+	600.02	1
3 IZQ	16.5	ND	-	ND	1
1 DER	16.5	20.36	+	10472610.35	1
2 DER	16.5	20.32	+	10740981.19	1
4 IZQ	16.5	36.77	+	324.94	1
4 DER	18.5	ND	-	ND	1
5 IZQ	18.5	25.80	+	335389.49	1
1 IZQ	18.5	36.73	+	333.27	1
4 IZQ	14.5	36.8	+	384.73	2
3 DER	14.5	34.42	+	1733.84	2
3 DER	14.5	ND	-	ND	2
6 DER	16.5	ND	-	ND	2
5 DER	16.5	ND	-	ND	2
3 DER	18.5	ND	-	ND	2

IZQ, izquierdo; DER, derecho, ND, no determinado



**Figura 27.-Los embriones de la cepa C57BL/6 son susceptibles a la infección con ZIKV.** Los embriones de la cepa C57BL/6 fueron inoculados con ZIKV a  $1.5 \times 10^4$  UFP/embrión en líquido amniótico; mientras que los embriones sin infectar se inocularon con medio DMEM; después de 2, 4 y 6 dpi las ratonas fueron sacrificadas y se extrajeron los cerebros de cada embrión. La presencia de ZIKV se determinó por RT-qPCR calculando el número de las copias de genoma viral por embrión. La gráfica muestra la media  $\pm$  SEM de tres embriones.

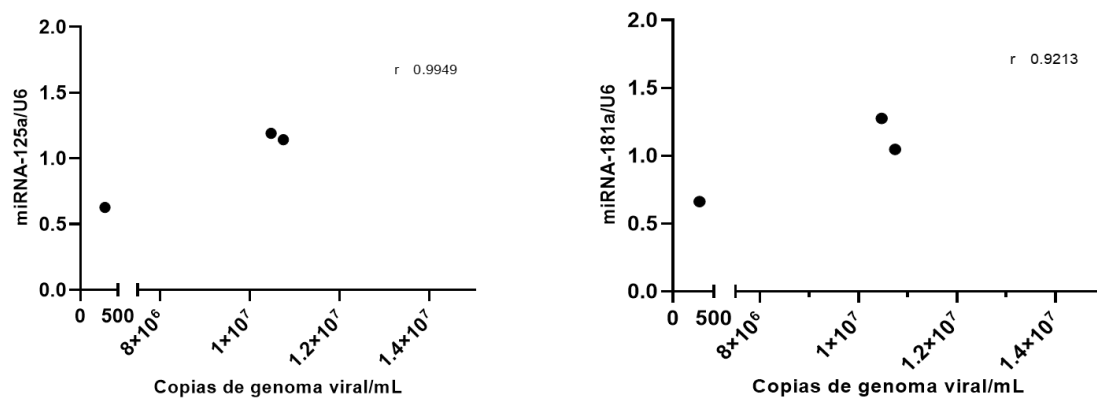
Los experimentos con células mHypoE-N1 demostraron que el miRNA-125a aumenta su expresión en respuesta a ZIKV, mientras que miRNA-181a se mantiene sin cambios significativos durante la cinética de infección (Figura 21). Por tanto, con la idea de corroborar los datos *in vitro* y una vez identificados los embriones positivos para ZIKV se realizaron las mediciones de los miRNA-125a y miRNA-181a mediante RT-qPCR a 4 dpi (E16.5) que es el punto donde detectamos la mayor carga viral (Figura 27). En la figura 28 podemos observar que la acumulación de los miRNA-125a y miRNA-181a no cambia en embriones infectados con respecto a los no infectados. Sin embargo, hace falta aumentar el número de embriones analizados a este tiempo ya que solo se cuenta con tres embriones infectados y no infectados en el presente análisis.



**Figura 28.-La infección con ZIKV en embriones C57BL/6 no induce cambios en la expresión de los miRNA-125a y miRNA-181a.** Las gráficas muestran la abundancia de ambos miRNAs en embriones infectados con ZIKV en líquido amniótico a E12.5 y colectados a 4 dpi (E16.5); la normalización de la abundancia de los miRNAs se realizó con respecto a U6 y las veces de cambio se determinaron con respecto a los embriones no infectados. Las gráficas muestran la media  $\pm$  DE de tres embriones. El análisis estadístico utilizado fue t de student. N.I: No infectado; ZIKV: Virus Zika y hpi: horas post-infección.

Debido a que observamos una mayor variabilidad en los niveles de expresión de los miRNAs en embriones infectados respecto a los no infectados se realizó un análisis de correlación de Pearson. En la figura 27 se muestra la correlación entre la carga viral y la expresión de los miRNAs. Se observó que a los 4 dpi (E16.6) una carga viral baja (500 copias de genoma viral)

corresponde con una menor expresión de miRNA-125a y miRNA-181a; mientras que los embriones con una carga viral elevada ( $10^7$  copias de genoma viral) presentan un aumento en la expresión de los miRNAs. Lo anterior sugiere que existe una correlación positiva entre la carga viral y los niveles de expresión de los miRNA-125a ( $r=0.9949$ ) y miRNA-181a ( $r=0.9213$ ) (Figura 29); sin embargo, hace falta aumentar el número de embriones en el estudio.



**Figura 29.-La abundancia de los miRNA-125a y miRNA-181a cambia con respecto a la carga viral del embrión.** Los embriones fueron infectados con ZIKV a E12.5 y analizados a E16.5, se muestra la correlación entre la carga viral de los embriones y la expresión de los miRNAs. La correlación de Pearson muestra una  $r$ : 0.9949 para el miRNA-125a y  $r$ : 0.9213 para el miRNA-181a.

## 8.-DISCUSIÓN

Para conocer si el ZIKV es capaz de regular la expresión de los miRNAs-125a, miRNA-125b, miRNA-181a y miRNA-7 se realizaron infecciones en modelos *in vitro* e *in vivo*. En los estudios *in vitro* se utilizaron las líneas celulares N2A y mHypoE-N1 y se observó que en ambas líneas celulares la permisividad a la infección es baja, siendo más evidente en las N2A. Además, en las células mHypoE-N1 infectadas con ZIKV se detectaron cambios en la expresión de miRNA-125a a 24 hpi y de miRNA-7 a 48 hpi. Por último, se realizaron ensayos de tipo western-blot con el objeto de conocer los niveles proteicos de los FT NF- $\kappa$ B/p65, pSTAT3 y pIRF3 y su asociación con el aumento en la expresión de los miRNA-125a y miRNA-7; sin embargo, no observamos cambios estadísticamente significativos en los niveles de las formas fosforiladas de los FT que pudieran explicar la sobreexpresión de los miRNAs. En la parte *in vivo*, se lograron establecer dos modelos de infección con ZIKV que fue en neonatos y en embriones de la cepa C57BL/6. En el modelo de infección en embriones murinos se observó que la expresión de los miRNAs es dependiente de la carga viral.

Durante la infección de las células N2A observamos una baja permisividad a la replicación de ZIKV. En cambio, en estudios realizados en neuroblastomas humanos el porcentaje de infección es del 77% al 90% (Hughes et al., 2016; Castro et al., 2019); sin embargo, en hCPN infectadas con ZIKV del linaje asiático el porcentaje de infección es del 1.5% (McGrath et al., 2017). Las diferencias en los porcentajes de infección que observamos con respecto a otros trabajos se deben en parte al tipo celular, debido a que utilizamos líneas celulares de origen murino, mientras que los porcentajes de infección que han sido reportados por Hughes et al (2016) son en células humanas. En el modelo de células mHypoE-N1 infectadas con ZIKV registramos un 12% de infección, mientras que en neuronas inmaduras de origen humano el porcentaje de infección que se ha reportado va del 1 al 3% (Hughes et al., 2016), en cambio, en neuronas corticales de ratón de la cepa C57BL/6J el porcentaje de infección es del 60% (Azouz et al., 2019).

Las diferencias observadas en los porcentajes de infección pueden deberse al genotipo viral utilizado. En este trabajo las infecciones se realizaron con la cepa de referencia MR766 que es de origen africano; mientras que en los trabajos arriba mencionados se utilizó ZIKV PVRABC59 de origen asiático (Azouz et al., 2019). De manera interesante, observamos que las células N2A en respuesta a la infección por ZIKV extienden procesos neuríticos dependientes del tiempo de infección, siendo más evidente a las 72 hpi. Datos similares han sido reportados en la infección de neuroblastomas humanos con ZIKV (Hughes et al., 2016). Esto parece ser un evento común en líneas celulares poco diferenciadas, en las cuales el ZIKV promueve la diferenciación celular hacia el linaje neural o de astrocitos (Bhagat et al., 2016; Lossia et al., 2017).

Se evaluó la expresión de los miRNAs-125a, miRNA-125b, miRNA-181a y miRNA-7 en células mHypoE-N1 y en células N2A durante la infección por ZIKV. En el caso de las células N2A únicamente observamos tendencias al cambio en la expresión del miRNA-7; mientras que en las células mHypoE-N1 registramos un aumento en la expresión de miRNA-125a y miRNA-7. Los pocos cambios que observamos en la expresión de los miRNAs se pueden explicar por el contexto celular, el porcentaje de infección y el genotipo viral. En células troncales infectadas con ZIKV MR766 o Parabia se obtienen porcentajes de infección del 70% y del 30%, respectivamente, lo que conlleva un mayor cambio en la expresión de genes en células infectadas con ZIKV MR766



(10 veces) comparado con la infección de ZIKV Parabia (Dang et al., 2019). Además, en nuestro estudio se analizó una población celular heterogénea, en la que hay células infectadas, células que responden a señales parácrinas de las células infectadas y células no infectadas. Sin embargo, podrían emplearse técnicas como VSIC-RNA-seq y FACS para analizar únicamente células infectadas. La técnica de FACS distingue entre células infectadas y no infectadas; mientras que la técnica de VSIC-RNA-seq mide cambios en la expresión de genes y su correlación con la abundancia viral por célula (Liang et al., 2016).

Adicionalmente, en este estudio se observó que las células mHypoE-N1 y N2A infectadas con ZIKV presentan una reducción en la densidad poblacional. En la literatura se describió que la infección con ZIKV induce arresto del ciclo celular en CPN (Tang et al., 2017; Bhagat et al., 2016). Además, en las células mHypoE-N1 infectadas con ZIKV encontramos aumento en la abundancia del miRNA-125a. Previamente se ha descrito que la sobreexpresión del miRNA-125a en células cancerosas induce arresto del ciclo celular en la fase G2/M (Fan et al., 2015). Por lo cual, plantear experimentos para conocer la participación del miRNA-125a en la proliferación celular en células mHypoE-N1 durante la infección con ZIKV podría ayudar a comprender la patogénesis asociada al virus. También, la disminución en la densidad celular podría deberse a procesos de muerte celular. En células pancreáticas la sobreexpresión del miRNA-125a promueve la apoptosis a través de inducir fisión mitocondrial ya que tiene como blanco al RNAm de MFN2, induciendo despolarización mitocondrial, salida de citocromo C, sobreproducción de ROS y activación de caspasa 3 (Pan et al., 2017).

El aumento en la abundancia de los miRNAs-125a y miRNA-7 se ha observado en otros contextos celulares. En neuronas corticales humanas infectadas con ZIKV aumenta la expresión del miRNA-125a, que tiene como blanco al RNAm del regulador negativo de la proteína antiviral MAVS (Dang et al., 2019). MAVS es una proteína anclada a la membrana de las mitocondrias, una vez que se activa por los receptores citosólicos RIG-I y MDA5 se induce la transcripción de genes relacionados con la inflamación e inmunidad mediante NF- $\kappa$ B e IRF3 (Mills et al., 2017). De igual manera, el miRNA-7 se encuentra sobrerregulado en neuronas y regula negativamente al RNAm de SIN3A (Dang et al., 2019) que codifica para un represor que interactúa con STAT3, siendo importante en la respuesta antiviral mediada por IFN (Icardi et al., 2012). El miRNA-125a responde a señales inflamatorias, se secreta dentro de exosomas y señala de manera paracrina en las células adyacentes (Liang et al., 2016). Además, se ha reportado que el miRNA-125a se encuentra sobrerregulado en defectos congénitos del cierre del tubo neural como la anencefalia (Zhang et al., 2017) y ha sido propuesto como un marcador de severidad en el contexto de cáncer (Hou et al., 2019). Por tanto, se podría medirse si en las células mHypoE-N1 infectadas con ZIKV el miRNA-125a es liberado dentro de exosomas al medio extracelular; para usar a este miRNA como un marcador de severidad en mujeres embarazadas positivas para ZIKV.

Los miRNA-125a y miRNA-7 pueden modular la replicación de distintos virus, el mecanismo es mediante la unión de los miRNAs al RNA viral o mediante la unión de los miRNAs a RNAm celulares implicados en la replicación viral (Huang et al., 2007; Sharma et al., 2015). Durante la infección con papilomavirus, las proteínas virales E6/E7 inhiben la translocación al núcleo del FT p53 induciendo disminución en la abundancia del miRNA-125a (Fan et al., 2015). Por el contrario, en la infección con el virus influenza aumenta la abundancia del miRNA-125a, la cual se une a sus RNAm blancos A20 y MAVS favoreciendo la replicación viral (Hsu et al., 2017). En el contexto

de la infección con virus de hepatitis B se activa la transcripción del miRNA-125a mediante la proteína viral X transactivadora que se une al promotor del miRNA, por consiguiente, el miRNA-125a se une al RNAm del antígeno de superficie HBsAg e inhibe la replicación viral (Potenza et al., 2011; Mosca et al., 2014). En este mismo sentido, realizamos un análisis *in silico* en el programa miRanda para buscar posibles sitios de unión de los miRNA-7 y miRNA-125a en el genoma de ZIKV. Se observó que el miRNA-125a no presenta sitios de unión al genoma de ZIKV; mientras que el miRNA-7 presenta cuatro sitios de unión. Interesantemente, los sitios de unión del miRNA-7 en el genoma viral se encuentran dentro de las regiones de las proteínas no estructurales como NS5, NS3 y NS1 y todos los sitios parecen ser probables debido al  $\Delta\Delta G$  que presentan. Las proteínas NS3 y NS5 forman un complejo y actúan en la replicación viral; NS5 es una RNA polimerasa dependiente de RNA (Perera y Kuhn, 2008), NS3 es la helicasa viral y también presenta funciones de proteasa cuando se une a su cofactor NS2B (Luo et al., 2015). En CTN infectadas con ZIKV, se identificó que en la región del RNA viral que codifica para la proteína NS3 se unen proteínas de la familia Argonauta, sugiriendo que el RNA de ZIKV está sujeto a regulación postranscripcional por miRNAs de la célula hospedera (Dang et al., 2019). Por lo anterior, resultaría interesante hacer experimentos de transfección del miRNA-7 y evaluar la producción de la progenie viral mediante ensayos de placas líticas.

Con respecto al miRNA-7, observamos que aumenta su acumulación en células mHypoE-N1 infectadas con ZIKV a las 48 hpi. La sobreexpresión del miRNA-7 ha sido reportada en neuronas corticales humanas infectadas con ZIKV (Dang et al., 2019). Además, el miRNA-7 tiene RNAm blancos que son importantes en la proliferación y diferenciación neural como Pfn, Raf1, Pax6, Sept1, Adipor1, Casp9, Klf4, Sp1, Rest, Ngf, Skp2, Lef1, Crhbp, Fos, Sept8, Timp2, Cntfr, Bace y MECP2 (Tesis de doctorado. Meza-Sosa, 2015). También, el miRNA-7 ha sido propuesto como un regulador del estrés oxidativo ya que se une al RNAm Keap1, que es un represor del FT Nrf2, con lo cual ejerce funciones neuroprotectoras por disminución del estrés oxidativo (Kabaria et al., 2015). Existe evidencia sobre la participación de las ROS en la activación de miRNAs, como es el caso de miRNA-200c y miRNA-141 (Magenta et al., 2011). Asimismo, se conoce que diversos virus inducen estrés oxidativo durante las infecciones virales. El adenovirus bovino 3 induce concentraciones elevadas de ROS en células infectadas, promoviendo la liberación de la progenie viral (Anand et al., 2014). El virus de la influenza A eleva la producción de ROS mitocondriales que activan vías antivirales como la de IFN (Kim et al., 2015). El citomegalovirus humano induce un incremento en los niveles de ROS que favorece la replicación viral mediante la activación de p38-MAPK y la actividad del promotor MEI de citomegalovirus (Xiao et al., 2015). En nuestro análisis de vías moduladas por los miRNA-125a y miRNA-7 se observó que el estrés oxidativo es una vía común regulada por ambos miRNAs. Por lo tanto, se podrían medir los niveles de ROS en las células mHypoE-N1 infectadas con ZIKV y evaluar la existencia de un eje de retroalimentación positiva entre el estrés oxidativo y la expresión del miRNA-7. Adicionalmente, existen múltiples mecanismos reguladores en la expresión del miRNA-7, se ha encontrado que los RNA largos no codificantes circR-7 y Cyrano (linc-oip5, 1700020114Rik) regulan negativamente al miRNA-7 (Zhao et al., 2020). Por lo mencionado, ampliar el estudio hacia otros RNAs no codificantes podría contribuir al entendimiento sobre la patogénesis de ZIKV.

En el presente estudio no observamos cambios en la expresión del miRNA-181a tanto en células mHypoE-N1 como en las N2A con respecto a células no infectadas. Sin embargo, otros miembros de la familia de los miRNAs-181 presentan funciones dentro del SNC. Los miRNAs-181b/c

regulan el RNAm de la proteína inhibidora de la apoptosis XIAP y el mensajero de la proteína 2 de unión a metil CpG (MeCP2) (Hutchison et al., 2015). MeCP2 es una proteína necesaria en el desarrollo cerebral en etapas postnatales (Gonzales y LaSalle, 2010). Interesantemente, el balance entre los miRNAs-181a-5p y miRNA-181a-3p define el destino neural; el miRNA-181a-5p contribuye a la diferenciación de neuronas dopaminérgicas, mientras que miRNA-181a-3p suprime el destino celular dopaminérgico (Stappert et al 2013). Por tanto, resulta de interés medir los niveles de abundancia de otros miembros de la familia de los miRNAs-181 durante la infección con ZIKV.

En este estudio se realizó un análisis para la búsqueda de RNAm blancos para miRNA-125a y miRNA-7. Este identificó por primera vez a ataxina-1 (ATXN1) como un blanco putativo para ambos miRNAs. Las mutaciones en ATXN1 causan pérdida progresiva de las neuronas cerebelosas, particularmente de las neuronas de Purkinje (Ortiz et al., 2018), debido a la incorrecta maduración de éstas (Lu et al., 2017). Interesantemente, ATXN1 es regulado negativamente por el miRNA-144 (Persengiev et al., 2011). Por lo anterior, resulta de interés conocer si los miRNA-125a y miRNA-7 se unen al RNAm blanco que codifica para la proteína ATXN1, contribuyendo de esta manera al fenotipo de microcefalia durante el desarrollo del SNC.

Se realizaron ensayos tipo western-blot para medir los niveles de pIRF3, NF- $\kappa$ B/p65, pSTAT3 y SOCS3 en las células infectadas con ZIKV. Los datos obtenidos de este estudio no muestran cambios significativos en los niveles de pSTAT3. Sin embargo, otros FT relacionados con la vía JAK-STAT podrían ser evaluados, debido a que se ha reportado que los virus modulan la expresión de varios miRNAs para suprimir la señalización antiviral y evadir la respuesta inmunitaria. En este sentido, la infección de células de la microglía con ZIKV MR766 promueve la activación del FT STAT1 (Magoro et al., 2019). Además, el promotor del miRNA-7 contiene sitios consenso de unión a STAT1 y el tratamiento con IFN- $\gamma$  aumenta los niveles de la forma fosforilada de STAT1, con lo cual aumenta la actividad transcripcional del miRNA-7 (Midgley et al., 2016). También, observamos que los niveles de SOCS3 no cambian en células infectadas con respecto a células no infectadas. En neuronas corticales de ratones C57BL/6J infectadas con ZIKV se ha observado un incremento en la expresión de SOCS3 que correlaciona con un aumento en la infección (Azouz et al., 2019). En células dendríticas la inhibición de SOCS3 disminuye la replicación de ZIKV, debido a que se produce un aumento en IFN- $\alpha/\beta$  (Sun et al., 2019). Interesantemente, SOCS3 es sujeto a regulación por miRNAs; la infección con el virus sincicial respiratorio humano induce la expresión de let-7f que es un regulador negativo del RNAm de SOCS3 (Bakre et al., 2012). Además, la infección por el VEJ en células de la microglía baja la expresión del miRNA-432 y aumentan los niveles de SOCS5, debido a que el RNAm de SOCS5 es un blanco del miRNA-432, aumentando la replicación viral debido a una disminución en STAT1, TNF e IL-6 (Sharma et al., 2016).

En el presente estudio observamos que la acumulación de IRF3 fosforilado no cambia en las células infectadas con respecto a las no infectadas, mientras que la forma no fosforilada de IRF3 presenta una tendencia a aumentar sus niveles dependientes del tiempo post-infección, lo que sugiere que IRF3 podría estar modulando durante la infección con ZIKV. En este sentido, se ha observado que las proteínas no estructurales de ZIKV como NS4A y NS5 evitan la fosforilación y translocación al núcleo de IRF3 (Wu et al., 2016). Interesantemente, se ha identificado una mutación en NS1 que promueve su unión a TBK1, lo que resulta en la disminución de la fosforilación de IRF3 (Xia et al., 2018). En fibroblastos infectados con ZIKV se ha observado que

la producción de IFN es independiente de la vía IRF3 y son dependientes de la activación por fosforilación de IRF7 (Hamel et al. al., 2015). En embriones murinos, el TLR8 se detecta a partir de E12 hasta el día postnatal 21, su expresión correlaciona con el periodo de diferenciación neuronal y de axonogénesis (Mallar et al., 2009). Por lo anterior, el IRF7 que se activa por TLR8 podría evaluarse en futuros experimentos tanto en células mHypoE-N1 como en embriones de la cepa C57BL/6 infectados con ZIKV. También, se podrían buscar otros FT fuera del contexto de inflamación que regulen la actividad de los promotores de los miRNA-125a y miRNA-7. El factor inhibidor de la telomerasa 1 se une al promotor del miR125a activando su transcripción (Hou et al., 2019). En el caso de miRNA-7, el factor neuroD/Beta2 es un regulador positivo de su transcripción (Kredo-Russo et al., 2012).

En las células mHypoE-N1 infectadas con ZIKV no se observaron cambios significativos en los niveles de fosforilación de p65 con respecto a células no infectadas. En este sentido, durante la infección con el virus de la influenza A se sobregula el miRNA-302 que inhibe la fosforilación y translocación al núcleo de NF- $\kappa$ B mediante una vía no canónica (Gui et al., 2015). De manera contraria a lo que observamos, durante la infección con VEJ se sobregula el miRNA-19b-3p que tiene como blanco al RNAm de RNF11 que es un regulador negativo de la señalización de NF- $\kappa$ B, por lo cual hay una mayor translocación al núcleo de NF- $\kappa$ B y aumenta la producción de citocinas inflamatorias como TNF, IL-6, IL1 $\beta$  y CCL5 (Ashraf et al., 2016) La infección con virus de RNA segmentados como H1N1 aumenta la translocación de NF- $\kappa$ B/p65 y la activación de IFN I y III (Hsu et al 2017).

Por último, en el presente estudio se estandarizó la infección con ZIKV en embriones y neonatos de la cepa C57BL/6; la infección de los embriones se realizó inoculando el ZIKV en LA a E12.5 y la infección de neonatos se realizó de manera intracraneal al P3. Los resultados de expresión de miRNAs en embriones infectados mostraron cambios en la expresión de los miRNAs dependiente de la carga viral. En la literatura se menciona que la infección por VEJ induce al miR-19b-3p dependiente de la MOI (Ashraf et al., 2016), lo mismo ha sido observado con miR146a, que aumenta su expresión conforme avanza el tiempo post-infección y la carga viral (Deng et al., 2017). En los experimentos de infección con neonatos se observó que presentaban pérdida de peso, parálisis y retraso en el crecimiento corporal con respecto a los no infectados. En este sentido, se ha publicado que las células hipotalámicas productoras de TRH (productoras de la hormona liberadora de tirotrópina) pueden ser blancos de ZIKV, una vez infectadas se reduce su capacidad de liberar GH y TSH; como consecuencia, los ratones infectados con ZIKV presentan hipopituitarismo, retraso en el crecimiento, deterioro del aprendizaje y la memoria (Wu et al., 2018). También observamos que la expresión del miRNA-181a no presentó cambios significativos en los cerebros de neonatos infectados respecto a los no infectados. Sin embargo, en cerebros de ratones con hipotiroidismo el miRNA-125b se encuentra disminuido (Liu et al., 2018). Por tanto, el miRNA-125b sería un candidato a medirse en los neonatos infectados con ZIKV.

La activación de la microglía fetal a través de la activación inmune materna disminuye el número de células precursoras neurales que se generan (Cunningham et al., 2013). Durante la infección con ZIKV la microglía favorece la viabilidad de las CPN al fagocitar a las CPN infectadas (Mesci et al., 2017), así como a las partículas virales (Abreu et al., 2018). De manera contraria, la microglía infectada con ZIKV contribuye a la muerte celular de las neuronas (Lum et al., 2017) por un aumento en la inflamación mediada por citocinas como CCR5, IL-12, IL1b, AIF1, IL-6

(Mesci et al., 2017; Gim et al., 2019), TNF, CCL2 (Abreu et al., 2018), SOCS3, MMP9 e IFI27, IFIT1 / 3, IL-6 y caspasa 1 (Azouz et al., 2019) y la activación de vías de señalización inflamatorias como ERK, p38MAPK, NF- $\kappa$ B y JAK/STAT. Interesantemente, la inhibición de p38MAPK disminuye la inflamación durante la infección con ZIKV (Zhu et al., 2017). Por lo tanto, sería importante realizar estudios de expresión de miRNAs con funciones en inflamación en células de la microglía.

## 9.-CONCLUSIÓN

En el presente trabajo se estableció un modelo de infección *in vitro* de neuronas de la línea celular mHypoE-N1, en el cual, se observó el cambio en la abundancia de los miRNA-125a y miRNA-7 durante la infección con ZIKV. Así mismo, observamos que ZIKV induce la diferenciación de las células N2A sin afectar la expresión de los miRNA-125a, miRNA-181b y miRNA-7. También, se establecieron dos modelos de infección *in vivo*, el modelo en neonatos y en embriones murinos de la cepa C57BL/6 para caracterizar el papel de los miRNA-125a y miRNA-7 en respuesta a la infección con ZIKV. Sin embargo, en los embriones murinos no observamos cambios en la abundancia de los miRNA-181a y miRNA-125a durante la infección con ZIKV, aún falta aumentar el número de experimentos y evaluar la expresión de los miRNA-7 y miRNA-125b en respuesta a la infección con ZIKV en etapa embrionaria; así como determinar la vía a través de la cual se activan los miRNAs en respuesta a ZIKV.

## 10.-PERSPECTIVAS

- Separar la población de células infectadas de las no infectadas para el análisis de los miRNAs.
- Evaluar la translocación al núcleo de NF- $\kappa$ B/p65 y pIRF3 mediante inmunofluorescencia o ensayos tipo western-blot de extractos nucleares.
- Determinar la expresión de los miRNA-181b, c y d en las células mHypoE-N1 y en embriones murinos de la cepa C57BL/6.
- Evaluar la abundancia de los miRNA-125a y miRNA-7 en líquido amniótico de mujeres embarazadas e infectadas con ZIKV, para usarlos como posibles marcadores de severidad.
- Determinar las posibles funciones antivirales del miRNA-7.
- Evaluar la tasa de proliferación, diferenciación y viabilidad celular en las mHypoE-N1 infectadas con ZIKV y la correlación con la expresión de los miRNA-125a y miRNA-7.
- Usar un modelo de estudio de células troncales neurales humanas, como las células H9, para evaluar el cambio en la expresión de miRNAs involucrados en el desarrollo del SNC humano en respuesta a la infección con el ZIKV.

## 11.- MATERIALES Y MÉTODOS SUPLEMENTARIOS

### 11.1.-Purificación de partículas virales y tinción con plata

Una vez que se obtuvo el sobrenadante de C6/36 infectadas con ZIKV se centrifugó a 4,300 rpm en la centrífuga eppendorf modelo 5702 R con el rotor A-4-38 por 1 h a 4 °C, para quitar los restos celulares. Después, del sobrenadante clarificado (sin restos celulares) se tomaron 3mL que se pusieron sobre 1mL de colchón de sacarosa al 20% en tubos ultraclear y se centrifugaron a 36,000 rpm por 3 h a 4 °C en el rotor SW 55Ti (centrifuga Beckman Coulter optimal XPN-100 ultracentrifuge). A continuación, el sobrenadante se removió por inversión y el pellet que se formó se dejó secar por 15 min a TA. El pellet se resuspendió en buffer TNE (10mM Tris-HCl, 120mM NaCl y 1mM de EDTA) a 4 °C y se centrifugó en la microcentrífuga 5424R con el rotor FA-45-24-11 a 13,000 rpm por 10 min a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en buffer TNE y se almacenó a -70 °C.

El virus purificado se corrió en un gel de poliacrilamida al 15%, se tiñó con coomassie R-250 y plata.

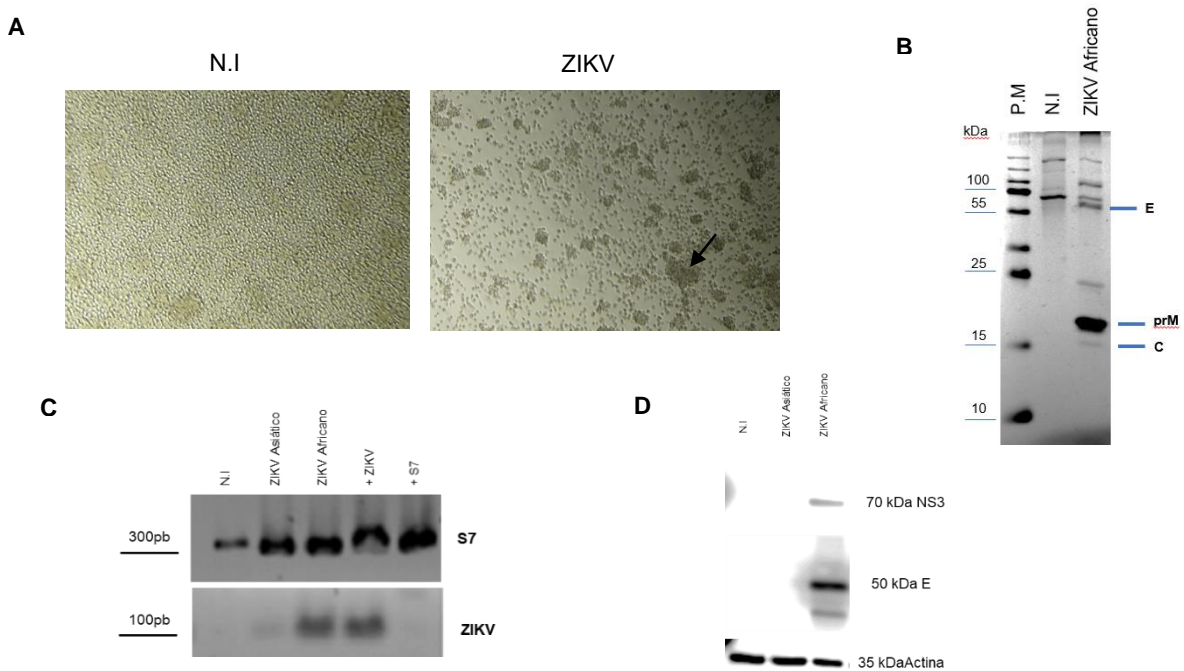
#### Tinción de plata

Para la tinción de plata se prepararon las siguientes soluciones:

1. Solución fijadora: metanol al 40%, ácido acético al 10% y paraformaldehído al 1%
2. Solución de lavado: etanol al 30% en H<sub>2</sub>O
3. Solución activadora: 0.01g de tiosulfato de sodio en 50mL de H<sub>2</sub>O
4. Solución plata: 0.1gr AgNO<sub>3</sub>, en 50mL de H<sub>2</sub>O y formaldehído al 0.7%
5. Solución reveladora: 3gr de carbonato de sodio, 1mL de la solución activadora, 49mL H<sub>2</sub>O y formaldehído al 0.5%.
6. Solución de paro: Es la solución fijadora Incubar de 1 a 2 h el gel con la solución fijadora, después del tiempo de incubación la solución se recupera y se guarda para usarla como solución de paro. Posteriormente, incubar 20 min con solución de lavado y tirar. Incubar 1 min con solución activadora descartar y lavar dos veces con agua. En seguida, incubar 20 min con solución de plata, después lavar con agua, e incubar con solución reveladora hasta ver bandas, una vez que se visualicen las bandas se descarta la solución reveladora y se añade la solución de paro, después se retirar la solución de paro y se deja el gel en H<sub>2</sub>O.

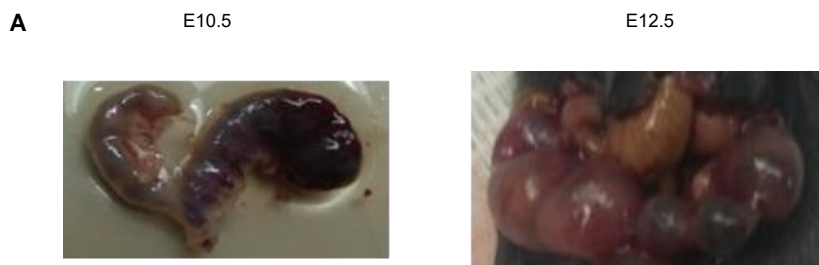
## 12. - FIGURAS SUPLEMENTARIAS

### 12.1.-Producción y caracterización de ZIKV



**Figura S1.-Cultivo de C6/36 no infectadas e infectadas con ZIKV MR766 linaje africano. A).-** Se observa de lado izquierdo la monocapa de células sin infectar y del lado derecho se observan C6/36 infectadas con ZIKV MR766. Después de 5 dpi es evidente que la integridad de la monocapa se pierde debido al efecto citopático que induce ZIKV en las células C6/36. **B).-** Se observa un gel de proteínas en el cual se corrió el virus purificado y se tiñó con plata para visualizar las proteínas estructurales de ZIKV. **C).-** Productos de PCR del gen ribosomal de *A. aegypti* S7 y NS4B con un tamaño esperado de 300 pb y 100 pb, respectivamente donde N.I, células no infectadas; células infectadas con ZIKV asiático; células infectadas con ZIKV africano. **D).-** Western-blot de células Vero no infectadas e infectadas con ZIKV por 24 hpi, donde se utilizaron anticuerpos específicos para las proteínas virales NS3 y E, como control de carga se utilizó actina.

### 12.2.-Estandarización de la infección con ZIKV en embriones murinos de la cepa C57BL/6



**B**



**Figura S2.-Estandarización de la técnica de inoculación con ZIKV en embriones murinos de la cepa C57/BL6.**

A).- Se observa del lado izquierdo un rosario de embriones inoculados a E10.5 donde tanto los embriones control como los infectados son reabsorbidos. Del lado derecho se observan embriones inoculados a E12.5, tanto los embriones control como los infectados no son reabsorbidos. B).- Embriones inoculados a E12.5 y colectados a los 2 dpi se observa que en la inoculación intracerebroventricular la viabilidad de los embriones es nula, mientras que la inoculación en líquido amniótico es menos invasivo y mejora la sobrevivencia.

### 13.- Tablas suplementarias

**Tabla S1.-Análisis de los sitios de unión de los miRNA-125a y miRNA-7 al genoma de ZIKV con el programa miRanda.**

miRNA	Posición en el genoma de ZIKV	Proteína	kCal/mol	Miranda Score	miRNA-mRNA
125a-5p	-----	-----	-----	-----	-----
7a-5p	8034 – 8055	NS5	-17.6	145	mRNA: 3' ugUUGUUUUU - GUGAUCAGAAGGu 5' miRNA: 5' agAGTGGAGTG GAC --GTCTTCCa 3'
	8593 – 8615	NS5	-18.13	153	mRNA: 3' uguUGUUU - UUAGUGAUCAGAAGGu 5' miRNA: 5' cacGCAA GGATC A - GCGTCTTCCc 3'
	2946 – 2967	NS1	-18.57	150	mRNA: 3' uguUGUUUUUAGUGAUCAGAAGGu 5' miRNA: 5' atc ACGGGTTT G -GAGTCTTCCa 3'
	4720 - 4740	NS3	-19.48	149	mRNA: 3' uguUGUUUUUAGUGAUCAGAAGGu 5' miRNA: 5' catGCAAGA - - GGGAGTCTTCCa 3'

El análisis se realizó con ayuda del M.C. Edgar Rodríguez García

**Tabla S2.-Oligonucleótidos utilizados para los PCRs punto final.**

Oligonucleótidos	Secuencia	Organismo	Gen blanco
MAPK8 FW	5' GCTGGGGCAGACACCGGAA 3'	Zika	E
MAPK8 RV	5' G TCCACCGCCATCTGGA CTG 3'		
ZDCZ FW	5' CAGCTGGCATCATGAAGAAYC 3'	Zika	NS4B
ZDCZ RV	5' CACYGTCCCATCTTYTTCTCC 3'		
S7 FW	5' GGGACAAATCGGCCAGGCTATC 3'	<i>Aedes aegypti</i>	Proteína ribosomal S7
S7 RV	5' TCGTGGACGCTTCTGCTTGTTG 3'		



<b>Actina FW</b>	5' GGGTCAGAAGGACTCCTATG 3'	Ratón	Actina
<b>Actina RV</b>	5' GGTCTCAAACATGATCTGGG 3'	Ratón	Actina

**Tabla S3.-Oligonucleótidos utilizados para la reacción de RT de los miRNAs-125a, miRNA-125b, miRNA-7, miRNA-181a y el control interno U6.**

<b>Oligonucleótido RT</b>	<b>miRNA</b>
5'GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACT <b>CACAG</b> 3'	125a
5'GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACT <b>CACAA</b> 3'	125b
5'GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGAC <b>ACTCAC</b> 3'	181a
5'GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACT <b>TCTC</b> 3'	7
5'CTCGCTTCGGCAGCACA 3'	U6

En negritas se observan 6/5 nt en el extremo 3' de los oligonucleótidos tallo-asa que son complementarios al extremo 3' de los miRNAs maduros. Los restantes 44 nt forman el tallo asa del oligonucleótido.

**Tabla S4.-Anticuerpos utilizados para los ensayos tipo western-blot.**

<b>Anticuerpos</b>	<b>Marca</b>	<b>kDa</b>	<b>Dilución</b>	<b>Uso</b>	<b>Anticuerpo secundario</b>
p65	Cell signalling	65	1:1000	WB	Rabbit
pSTAT3	Cell signaling	80	1:1000	WB	Mouse
GAPDH	Cell signalling	37	1:8000	WB	Rabbit
pIRF3	Cell signalling	50	1:2000	WB	Rabbit
STAT3	Cell signaling	80	1:1000	WB	Mouse
IRF3	Milipore	50	1:1000	WB	Rabbit
SOCS3	Cell signalling	27	1:1000	WB	Rabbit
Actina	Cell signalling	25	1:10000	WB	Rabbit
E	GeneTex	55	1:1000	WB/IF	Rabbit
NS3	GeneTex	70	1:500	WB	Rabbit

## BIBLIOGRAFÍA

1. Agirman, G., Broix, L., Nguyen, L. (2017). Cerebral cortex development: an outside-in perspective, *591*, 3978–3992. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12924>
2. Agrawal, M. (2019). Chandipura virus changes cellular miRNome in human microglial cells, (March). <https://doi.org/10.1002/jmv.25491>
3. Agrelli, A., Moura, R. R. De, Crovella, S., André, L., & Brandão, C. (2019). Infection, Genetics and Evolution ZIKA virus entry mechanisms in human cells. *Infection, Genetics and Evolution*, *69*(November 2018), 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.01.018>
4. Alfano, C., Gladwyn-ng, I., Couderc, T., & Lecuit, M. (2019). The Unfolded Protein Response: A Key Player in Zika Virus-Associated Congenital Microcephaly, *13*(March), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00094>
5. Ashraf, U., Zhu, B., Ye, J., Wan, S., Nie, Y., Chen, Z., & Cui, M. (2016). MicroRNA-19b-3p Modulates Japanese Encephalitis Virus-Mediated Inflammation via Targeting RNF11, *90*(9), 4780–4795. <https://doi.org/10.1128/JVI.02586-15>. Editor
6. Barkovich, A. J., Guerrini, R., Kuzniecky, R. I., Jackson, G. D., & Dobyns, W. B. (2012). REVIEW ARTICLE. Developmental and genetic classification for malformations of cortical development: update 2012, 1348–1369.
7. Beaufrère, A., Bessières, B., Bonnière, M., Driessen, M., Alfano, C., Couderc, T., Encha-razavi, F. (2019). RESEARCH ARTICLE A clinical and histopathological study of malformations observed in fetuses infected by the Zika virus, *1947*(2007), 114–125. <https://doi.org/10.1111/bpa.12644>
8. Bernal, A., & Arranz, L. (2018). Nestin - expressing progenitor cells: function, identity and therapeutic implications. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *75*(12), 2177–2195. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2794-z>
9. Bhagat, R., Prajapati, B., Narwal, S., Agnihotri, N., Adlakha, Y. K., & Sen, J. (2018). Zika virus E protein alters the properties of human fetal neural stem cells by modulating microRNA circuitry. *Cell Death & Differentiation*, (C). <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0163>
10. Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., Moyes, C. L., William, G. R. (2013). The global distribution and burden of dengue, *496*(7446), 504–507
11. Brault, J., Khou, C., Basset, J., Coquand, L., Fraissier, V., Frenkiel, M., Baffet, A. D. (2016). EBioMedicine Comparative Analysis Between Flaviviruses Reveals Specific Neural Stem Cell Tropism for Zika Virus in the Mouse Developing Neocortex, *10*, 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.07.01>.
12. Cai, Y., Yu, X., Hu, S., & Yu, J. (2009). A Brief Review on the Mechanisms of miRNA Regulation the Interplay of miRNAs with. *Genomics Proteomics & Bioinformatics*, *7*(4), 147–154. [https://doi.org/10.1016/S1672-0229\(08\)60044-3](https://doi.org/10.1016/S1672-0229(08)60044-3)
13. Caine, E. A., Jagger, B. W., & Diamond, M. S. (2018). Animal Models of Zika Virus Infection during Pregnancy, 1–21. <https://doi.org/10.3390/v10110598>
14. Caires-Junior, Carlos, L. (2018). Discordant congenital Zika syndrome twins show differential in vitro viral susceptibility of neural. 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02790-9>
15. Chang, C., Ortiz, K., Ansari, A., & Gershwin, M. E. (2016). The Zika outbreak of the 21st century. *Journal of Autoimmunity*. Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., Moyes, C. L., ... William, G. R. (2013). The global distribution and burden of dengue, *496*(7446), 504–507.
16. Chavali, P. L., Stojic, L., Meredith, L. W., Joseph, N., Michael, S., Sanford, T. J., Gergely, F. (2018). Europe PMC Funders Group Neurodevelopmental protein Musashi 1 interacts with the Zika genome and promotes viral replication, *357*(6346), 83–88. <https://doi.org/10.1126/science.aam9243>. Neurodevelopmental
17. Chen, C., Ridzon, D. A., Broomer, A. J., Zhou, Z., Lee, D. H., Nguyen, J. T., City, F. (2005). Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR, *33*(20), 1–9. <https://doi.org/10.1093/nar/gni178>
18. Chen, H., Shalom-feuerstein, R., Riley, J., Zhang, S., Tucci, P., Agostini, M., Vasa-nicotera, M. (2010). Biochemical and Biophysical Research Communications miR-7 and miR-214 are specifically expressed during neuroblastoma differentiation, cortical development and embryonic stem cells differentiation, and control neurite outgrowth in vitro, *394*, 921–927. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.03.076>
19. Cloetta, D; Thomanetz, V., Baranek, C., Lustenberger, R. M., Lin, S., Oliveri, F., Atanasoski, S., & Ru, M. A. (2013). Inactivation of mTORC1 in the Developing Brain Causes Microcephaly and Affects Gliogenesis, *33*(18), 7799–7810. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3294-12.2013>
20. Coffey, L. L., Keesler, R. I., Pesavento, P. A., Woolard, K., Singapuri, A., Watanabe, J., ... Van Rompay, K. K. A. (2018). Intraamniotic Zika virus inoculation of pregnant rhesus macaques produces fetal neurologic disease. *Nature Communications*, *9*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04777-6>
21. Cugola, F. R., Fernandes, I. R., Russo, F. B., Freitas, B. C., Dias, J. L. M., Guimarães, K. P., Beltrão-braga, P. C. B. (2016). The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature*, 1–15.
22. Dang Lichinchi, G., Qin, Y., Rana, T. M., Dang, J., Tiwari, S. K., Lichinchi, G., Eroshkin, A. M. (2016). Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Receptor TLR3. *Stem Cell*, *19*(2), 258–265. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.04.014>
23. Dang, J., Lichinchi, G., Qin, Y., Rana, T. M., Tiwari, S. K., Eroshkin, A. M. (2016). Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3. *Stem Cell*, *19*(2), 258–265.
24. Delatorre, E., Mir, D., & Bello, G. (2017). Tracing the origin of the NS1 A188V substitution responsible for recent enhancement of Zika virus Asian genotype infectivity, *112*(November), 793–795.

25. Deng, M., Du, G., Zhao, J., & Du, X. (2017). miR-146a negatively regulates the induction of proinflammatory cytokines in response to Japanese encephalitis virus infection in microglial cells, 1495–1505. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3226-3>
26. Díaz, N. F., Cruz-Reséndiz M. F., García, G., & Molina-Hernández, A. (2014). MicroRNAs in central nervous system development, 25(5), 675–686. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2014-0014>
27. Duan, X., Liao, X., Li, S., Li, Y., Xu, M., & Wang, Y. (2019). Transmembrane protein 2 inhibits Zika virus replication through activation of the Janus kinase / signal transducers and activators of transcription signaling pathway, 14, 9–19.
28. Faizan, I., & Naqvi, I. H. (2017). Zika Virus-Induced Microcephaly and Its, 152–158. <https://doi.org/10.1159/000452950>
29. Ferretti, E., Smaele, E. De, Miele, E., Laneve, P., Po, A., Pelloni, M.,... Gulino, A. (2008). Concerted microRNA control of Hedgehog signalling in cerebellar neuronal progenitor and tumour cells, 27(19), 2616–2627. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.172>
30. Florio, M., & Huttner, W. B. (2014). Neural progenitors, neurogenesis and the evolution of the neocortex. *Development*, 141(11), 2182–2194.
31. Freire, D. M., Iamarino, A., Ferreira, D., Neto, D. L., Sall, A., Marinho, P., & Zanotto, D. A. (2015). Spread of the pandemic Zika virus lineage is associated with NS1 codon usage adaptation in humans, 2015(August), 1–8.
32. Gabrielli, L., Paola, M., Lazzarotto, T., Lega, S., Santini, D., Pia, M.,... Paola, M. (2009). Histological findings in fetuses congenitally infected by cytomegalovirus. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2009.09.026>
33. Galicia, J. C., Naqvi, A. R., Ko, C., Nares, S., Asma, A., & Hill, C. (2015). HHS Public Access, 15(5), 333–337. <https://doi.org/10.1038/gene.2014.24.MiRNA-181a>
34. Garcez, P. P., Higa, L. M., Trindade, P., Delvecchio, R., Tanuri, A., & Rehen, S. K. (2016). Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids, 352(6287), 33–36.
35. Garcez, P. P., Minardi, J., Mota, J., Vasc, D., Madeiro, R., Delvecchio, R., Rehen, S. K. (2017). Zika virus disrupts molecular fingerprinting of human neurospheres, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep40780>
36. Gaughwin, P., Ciesla, M., Yang, H., Lim, B., & Brundin, P. (2011). Stage-Specific Modulation of Cortical Neuronal Development by Mmu-miR-134, (August), 1857–1869. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhq262>
37. Gladwyn-ng, I., Cordon-barris, L., Alfano, C., Creppe, C., Couderc, T., Morelli, G., Nguyen, L. (2018). Stress-induced unfolded protein response contributes to Zika virus – associated microcephaly. *Nature Neuroscience*, 21(January). <https://doi.org/10.1038/s41593-017-0038-4>
38. Götz, M., & Huttner, W. B. (2005). THE CELL BIOLOGY OF NEUROGENESIS, 6, 777–788. <https://doi.org/10.1038/nrm1739>
39. Gu F, Hata R, Ma YJ, et al. Suppression of Stat3 promotes neurogenesis in cultured neural stem cells. *J Neurosci Res* 2005;81:163–171.
40. Hamel, R., Dejarnac, O., Wichit, S., Ekcharyawat, P., Neyret, A., Luplertlop, N. Yssel, H. (2015). Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells, 89(17), 8880–8896. <https://doi.org/10.1128/JVI.00354-15>
41. Hastings, A. K., Yockey, L. J., Jagger, B. W., Hwang, J., Uraki, R., Gaitsch, H. F., ... Rothlin, C. V. (2017). TAM receptors are not required for Zika virus infection in mice, 19(3), 558–568. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.058.TAM>
42. Hirano, M., Yoshii, K., Sakai, M., Hasebe, R., Ichii, O., & Kariwa, H. (2018). Tick-borne flaviviruses alter membrane structure and replicate in dendrites of primary mouse neuronal cultures, (2014), 849–861. <https://doi.org/10.1099/vir.0.061432-0>
43. Huang, H., Yu, H., Huang, L., Huang, H., & Chen, R. (2012). miRNA-125b regulates TNF- $\alpha$  production in CD14 $^+$  neonatal monocytes via post-transcriptional regulation, 92(6), 171–182. <https://doi.org/10.1189/jlb.1211593>
44. Jaworski, D & Pérez-Martínez, L. (2010). Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2 (TIMP-2) expression is regulated by multiple neural differentiation signals NIH Public Access, 98(1), 234–247. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03855.x>
45. Klein, R. S. (2018). Dual Blades: The Role of Musashi 1 in Zika Replication and Microcephaly, 22(1), 9–11. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.06.015.Dual>
46. Klein, R. S., Louis, S., Louis, S., & Louis, S. (2018). HHS Public Access, 22(1), 9–11. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.06.015.Dual>
47. Kozak, R. A., Majer, A., Biondi, M. J., Medina, S. J., Goneau, L. W., Sajesh, B. V., Kobinger, G. P. (2017). Infected with Zika Virus, 1–18. <https://doi.org/10.3390/v9100297>
48. Krichevsky, A. M., Sonntag, K. C., Isacson, O., Kosik, K. S. (2008). Specific MicroRNAs Modulate Embryonic Stem Cell-Derived Neurogenesis. NIH Public Access, 24(4), 857–864. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0441.Specific>
49. Kumar, A., Airo, A. M., Hou, S., Hobman, T. C., Limonta, D., Mancinelli, V., Branton, W. (2016). Zika virus inhibits type-I interferon production and downstream signaling. *EMBO Reports*, 17(12), 1766–1775. <https://doi.org/10.15252/embr.201642627>
50. Kutsche, L. K., Gysi, D. M., Fallmann, J., Jakobsson, J., Kutsche, L. K., Gysi, D. M., Swiersy, A. (2018). Combined Experimental and System-Level Analyses Reveal the Complex Regulatory Network of miR-124 during Human Neurogenesis Article Combined Experimental and System-Level Analyses Reveal the Complex Regulatory Network of miR-124 during Human Neurogenesis. *Cell Systems*, 7(4), 438-452.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2018.08.011>
51. Laguesse, S., Peyre, E., & Nguyen, L. (2015). Progenitor genealogy in the developing cerebral cortex. *Cell and Tissue Research*, 359(1), 17–32.
52. Lattanzi, A., Gentner, B., Corno, D., Di Tomaso, T., Mestdagh, P., Speleman, F., Gritti, A. (2013). Dynamic Activity of miR-125b and miR-93 during Murine Neural Stem Cell Differentiation In Vitro and in the Subventricular Zone Neurogenic Niche. *PLoS ONE*, 8(6).
53. Le, M. T. N., Xie, H., Zhou, B., Chia, P. H., Rizk, P., Um, M., Lodish, H. F. (2009). MicroRNA-125b Promotes Neuronal Differentiation in Human Cells by Repressing Multiple Targets □ †, 29(19), 5290–5305.

54. Leta, S., Jibat, T., Clercq, E. M. De, Amenu, K., Kraemer, M. U. G., & Revie, C. W. (2018). International Journal of Infectious Diseases Global risk mapping for major diseases transmitted by Aedes aegypti and Aedes albopictus. *International Journal of Infectious Diseases*, 67, 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.11.026>
55. Li, C., Xu, D., Ye, Q., Hong, S., Jiang, Y., Liu, X., Qin, C. (2016). Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. *Stem Cell*, 19(1), 120–126. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.04.017>
56. Liang, B., Guida, J. P., Costa, M. L., Mysorekar, I. U., Liang, B., Guida, J. P., Liang, B. (2019). Host and viral mechanisms of congenital Zika syndrome Host and viral mechanisms of congenital Zika syndrome. *Virulence*, 10(1), 768–775. <https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1656503>
57. Liang, Q., Luo, Z., Zeng, J., Chen, W., & Foo, S. (2017). Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Deregulate Akt-mTOR Signaling in Human Fetal Neural Stem Cells to Inhibit Neurogenesis and Induce Autophagy, 19(5), 663–671. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.07.019>.
58. Linares, A. J., Lin, C., Damianov, A., Adams, K. L., Novitsch, B. G., & Black, D. L. (2015). The splicing regulator PTBP1 controls the activity of the transcription factor Pbx1 during neuronal differentiation, 1–25. <https://doi.org/10.7554/eLife.09268>
59. Liu, J., Githinji, J., McLaughlin, B., Wilczek, K., & Nolte, J. (2015). Role of miRNAs in Neuronal Differentiation from Human Embryonic Stem Cell—Derived Neural Stem Cells. *Stem Cell Rev.* 8(4), 1129–1137.
60. Liu, Y., Gordesky-gold, B., Leney-greene, M., Weinbren, N. L., Tudor, M., Cherry, S. (2018). Autophagy Restricts Zika Virus Infection in the Drosophila Brain, 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.05.022>
61. Lossia, O. V, Conway, M. J., Tree, M. O., Williams, R. J., Goldthorpe, S. C., Srinageshwar, B., Conway, M. J. (2017). Zika virus induces astrocyte differentiation in neural stem cells.
62. Luo, H., Winkelmann, E. R., Fernandez-salas, I., Li, L., Sandra, V., Daniz-lozano, R., Wang, T. (2018). *Accepted Manuscript*. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.01.003>
63. Ma, X., Buscaglia, L. E. B., Barker, J. R., & Li, Y. (2011). MicroRNAs in NF- $\kappa$ B signaling, 159–166.
64. Makeyev, E. V., Zhang, J., Carrasco, M. A & Maniatis, T. (2011). The MicroRNA miR-124 Promotes Neuronal Differentiation by Triggering Brain-Specific Alternative Pre-mRNA Splicing. 27(3), 435–448. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.07.015>.
65. Markopoulos, G. S., Roupakia, E., Tokamani, M., Alabasi, G., Sandaltzopoulos, R., Marcu, K. B., & Kolettas, E. (n.d.). Roles of NF- $\kappa$ B Signaling in the Regulation of miRNAs impacting on Inflammation in Cancer, 1–19.
66. Mazeaud, C., Freppel, W., Chatel-chaix, L., & Friedrich, S. (2018). The Multiples Fates of the Flavivirus RNA Genome During Pathogenesis. 9(December), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00595>
67. McGrath, E. L., Rossi, S. L., Gao, J., Widen, S. G., Grant, A. C., Dunn, T. J., Ferna, I. (2017). *Stem Cell Reports*, 8, 715–727. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.01.008>
68. Mesci., de A. Zanotto, P. M., Beltrão-Braga, P. C. B., Mesci, P., Tejwani, L., Suarez, N. A., Macia, A., Fernandes, I. R. (2017). Modeling neuro-immune interactions during Zika virus infection. *Human Molecular Genetics*, 27(1), 41–52. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx382>
69. Meza-sosa, K. F., Pedraza-alva, G., & Pérez-martínez, L. (2014). microRNAs : key triggers of neuronal cell fate, 8(June), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00175>
70. Meza-Sosa, K. F., Valle-García, Marcía, D. Pedraza-Alva, G., & Pérez-Martínez, L. (2012). Review Role of microRNAs in Central Nervous System Development and Pathology.
71. Mirzaa, G. M., Rivière, J. B., & Dobyys, W. B. (2013). Megalencephaly Syndromes and Activating Mutations in the PI3K - AKT Pathway : MPPH and MCAP, 130(April), 122–130. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.31361>
72. Morrison, T. E., & Diamond, M. S. (2017). crossm Animal Models of Zika Virus Infection , 91(8), 1–15.
73. Needhamsen, M., White, R. B., Giles, K. M., Dunlop, S. A., & Thomas, M. G. (2014). *Evolutionary Bioinformatics*, 7(October 2013), 8–10. <https://doi.org/10.4137/EBO.S13739>.
74. Neufeldt, C. J., Cortese, M., Acosta, E. G., & Bartenschlager, R. Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.170>
75. Niu, C. S. H. I., Yang, Y., & Cheng, C. (2013). MiR-134 regulates the proliferation and invasion of glioblastoma cells by reducing Nanog expression, (14), 1533–1540. <https://doi.org/10.3892/ijo.2013.1844>
76. Olgarnier, D., Muscolini, M., Coyne, C. B., Diamond, M. S., & Hiscott, J. (2016). Mechanisms of Zika Virus Infection and Neuropathogenesis, 35(8), 367–372. <https://doi.org/10.1089/dna.2016.3404>
77. Ouyang, Yi-Bing., Yu Lu, M.D., Sibiao Yue, M.D y Rona G. Giffard. (2013). miR-181 targets multiple Bcl-2 family members and influences apoptosis and mitochondrial function in astrocytes. *NIH Public Access*, 12(2), 213–219.
78. Pan, D., Flores, O., Umbach, J. L., Pesola, J. M., Bentley, P., Rosato, C., Coen, D. M. (2015). *NIH Public Access*, 15(4), 446–456. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.03.004>
79. Paridaen, J. T. M. L., & Huttner, W. B. (2014). Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system, 15(4), 351–364.
80. Pena, J. L., Guarines, K. M., Anna, J., Silva, D., Rosa, L., Leal, S., & Ayres, J. (2018). In vitro and in vivo models for studying Zika virus biology, 1529–1550. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001153>
81. Pequeno, G., Gomes, C., Manuel, C., Leite, S., Dias, B., Maria, S., Moraes, R. A. De. (2019). Evidence for Host Epigenetic Signatures Arising From Arbovirus Infections : A Systematic Review, 10(May), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01207>
82. Pereira, L., Medina, R., Baena, M., & Planas, A. M. (2015). IFN gamma regulates proliferation and neuronal differentiation by STAT1 in adult SVZ niche, 9(July), 1-10.

83. Pollock, A., Bian, S., Zhang, C., Chen, Z., & Sun, T. (2014). Article Growth of the Developing Cerebral Cortex Is Controlled by MicroRNA-7 through the p53 Pathway, 5.
84. Price, M. D., Lai, Z., & Competence, A. (1999). The yan gene is highly conserved in Drosophila and its expression suggests a complex role throughout development, 207–217.
85. Rago, L., Beattie, R., Taylor, V., & Winter, J. (2014). miR 379 – 410 cluster miRNAs regulate neurogenesis and neuronal migration by fine-tuning N-cadherin, 33(8), 906–920.
86. Reikine, S., Nguyen, J. B., & Modis, Y. (2014). Pattern recognition and signaling mechanisms of RIG-I and MDA5. *Frontiers in Immunology*, 5(JUL), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00342>
87. Rey, F. A., Stiasny, K., & Heinz, F. X. (2018). Europe PMC Funders Group Flavivirus structural heterogeneity : implications for cell entry, 132–139. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.06.009.Flavivirus>
88. Rolfe, A. J., Bosco, D. B., Wang, J., Nowakowski, R. S., Fan, J., & Ren, Y. (2016). Bioinformatic analysis reveals the expression of unique transcriptomic signatures in Zika virus infected human neural stem cells, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13578-016-0110-x>
89. Saiz, J.-C., Merino-Ramos, T., Martín-Acebes, M. A., Escribano-Romero, E., Blázquez, A. B., & Vázquez-Calvo, Á. (2016). Zika Virus: the Latest Newcomer. *Frontiers in Microbiology*, 7(April), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00496>
90. Sempere, L. F., Freemantle, S., Pitha-rowe, I., Moss, E., Dmitrovsky, E., & Ambros, V. (2004). Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation, 5(3).
91. Sharma, N., Kumawat, K. L., Rastogi, M., Basu, A., & Singh, S. K. (2016). Japanese Encephalitis Virus exploits the microRNA-432 to regulate the expression of Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS) 5. *Nature Publishing Group*, (January), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep27685>
92. Shenoy, A., Danial, M., & Belloch, R. H. (2015). Let- 7 and miR- 125 cooperate to prime progenitors for astroglialogenesis, 34(9), 1180–1194.
93. Sirohi, D., & Kuhn, R. J. (2017). Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors, 216(Suppl 10), 935–944. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix515>
94. Smith, B., Treadwell, J., Zhang, D., Ly, D., Mckinnell, I., & Walker, P. R. (2010). Large-Scale Expression Analysis Reveals Distinct MicroRNA Profiles at Different Stages of Human Neurodevelopment, 5(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011109>
95. Smith, J. L., Jeng, S., Mcweeney, S. K., & Hirsch, A. J. (2017). crossm A MicroRNA Screen Identifies the Wnt Signaling Pathway as a Regulator of the Interferon Response during Flavivirus Infection, 91(8), 1–15.
96. Song, B. H., Yun, S. I., Woolley, M., & Lee, Y. M. (2017). Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. *Journal of Neuroimmunology*, 308, 50–64. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.03.001>
97. Song, J., Hu, Y., Li, H., Huang, X., Zheng, H., Hu, Y., Wang, X. (2018). miR-1303 regulates BBB permeability and promotes CNS lesions following CA16 infections by directly targeting MMP9. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0157-3>
98. Stappert, L., Borghese, L., Roese-koerner, B., Weinhold, S., & Koch, P. (2013). MicroRNA-Based Promotion of Human Neuronal Differentiation and Subtype Specification, 8(3).
99. Sun, G., Ye, P., Murai, K., Lang, M., Li, S., Zhang, H., Shi, Y. (2011). miR-137 forms a regulatory loop with nuclear receptor TLX and LSD1 in neural stem cells, (November). <https://doi.org/10.1038/ncomms1532>
100. Sutarjono, B. (2019). Can We Better Understand How Zika Leads to Microcephaly ? A Systematic Review of the Effects of the Zika Virus on Human Brain Organoids, 219. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy572>
101. Tan, Z., Zhang, W., Sun, J., Fu, Z., Ke, X., Zheng, C., Zheng, Z. (2018). ZIKV infection activates the IRE1-XBP1 and ATF6 pathways of unfolded protein response in neural cells, 1–16.
102. Tang, H., Hammack, C., Ogden, S. C., Wen, Z., & Qian, X. (2017). Zika Virus Infects Human Cortical Neural Precursors and Attenuates Their Growth, 18(5), 587–590. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.02.016.Zika>
103. Ticconi, C., Pietropoli, A., & Rezza, G. (2016). Zika virus infection and pregnancy : what we do and do not know. *Pathogens and Global Health*, 110, 1–7. <https://doi.org/10.1080/20477724.2016.1234804>
104. Van Den Pol, A. N., Mao, G., Yang, Y., Ornaghi, X. S., & Davis, J. N. (2017). Zika Virus Targeting in the Developing Brain, 37(8), 2161–2175.
105. Visvanathan, J., Lee, S., Lee, B., Lee, J. W., Lee, S.-K. (2007). The microRNA miR-124 antagonizes the anti-neural REST/SCP1 pathway during embryonic CNS development. *Genes Dev.* 21: 744-749.
106. Wu, K., Zuo, G., Li, X., Ye, Q., Deng, Y., & Huang, X. (2016). Vertical transmission of Zika virus targeting the radial glial cells affects cortex development of offspring mice. *Nature Publishing Group*, 26(6), 645–654. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.58>
107. Wu, Y., Liu, Q., Zhou, J., Xie, W., Chen, C., Wang, Z., & Yang, H. (2017). Zika virus evades interferon-mediated antiviral response through the co-operation of multiple nonstructural proteins in vitro. <https://doi.org/10.1038/celldisc.2017.6>
108. X Li., J Zhang, L Ga., S McClellan., MA Finan., TW Butler., LB Owen., GA Piazza and Yaguang Xi (2012). MiR-181 mediates cell differentiation by interrupting the Lin28 and let-7 feedback circuit. 378–386.
109. Xu, Z., Asahchop, E. L., Branton, W. G., Gelman, B. B., Power, C., & Hobman, T. C. (2017). MicroRNAs upregulated during HIV infection target peroxisome biogenesis factors : Implications for virus biology, disease mechanisms and neuropathology, 1–29. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006360>
110. Yu IM, Zhang W, Holdaway HA, Li L, Kostyuchenko VA, Chipman PR, Kuhn RJ, Rossmann MG, Chen J. (2008). Structure of the Immature Dengue Virus at Low pH Primes Proteolytic Maturation. *Science*; 319(5871):1834–1837. <https://doi.org/10.1126>

111. Zanluca, C., de Noronha, L., & Duarte dos Santos, C. N. (2018). Maternal-fetal transmission of the zika virus: An intriguing interplay. *Tissue Barriers*, *6*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1080/21688370.2017.1402143> Chang, C., Ortiz, K., Ansari, A., & Gershwin, M. E. (2016). The Zika outbreak of the 21st century. *Journal of Autoimmunity*, *68*, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2016.02.006>
112. Zhang, B., Wang, L., & Zhou, Y. (2017). Elevated microRNA-125b promotes inflammation in rheumatoid arthritis by activation of NF- $\kappa$ B pathway, *93*, 1151–1157.
113. Zhang, F., Hammack, C., Ogden, S. C., Cheng, Y., Lee, E. M., Wen, Z., Tang, H. (2016). Molecular signatures associated with ZIKV exposure in human cortical neural progenitors, *44*(18), 8610–8620. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw765>
114. Zhang, H., Chang, Y., Zhang, L., Kim, S., Otaegi, G., Zhang, Z., & Nie, Y. (2018). Upregulation of MicroRNA miR-9 Is Associated with Microcephaly and Zika Virus Infection in Mice.
115. Zhang, W. D., Yu, X., Fu, X., Huang, S., Jin, S. J., Ning, Q., & Luo, X. P. (2014). MicroRNAs function primarily in the pathogenesis of human anencephaly via the mitogen-activated protein kinase signaling pathway, *1*(1), 1015–1029.
116. Zhao, J., Zhou, Y., Guo, M., Yue, D., Chen, C., Liang, G., & Xu, L. (2020). MicroRNA - 7 : expression and function in brain physiological and pathological processes. *Cell & Bioscience*, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00436-w>
117. Zhao, X. Di, Lu, Y. Y., Guo, H., Xie, H. H., He, L. J., Shen, G. F., Fan, D. M. (2015). MicroRNA-7 / NF- $\kappa$ B signaling regulatory feedback circuit regulates gastric carcinogenesis, *210*(4), 613–627.
118. Zhu, X., He, Z., Hu, Y., Wen, W., Lin, C., Yu, J., Li, M. (2014). MicroRNA-30e \* Suppresses Dengue Virus Replication by Promoting NF- $\kappa$ B – Dependent IFN Production, *8*(8), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003088>