



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

**“Expresión de la proteína E del virus del Zika en las células troncales neurales para
generar un modelo de reconocimiento de las células iniciadoras de glioma”**

T E S I S

Que presenta

QFB. JUAN CARLOS QUINTERO GALLEGOS

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

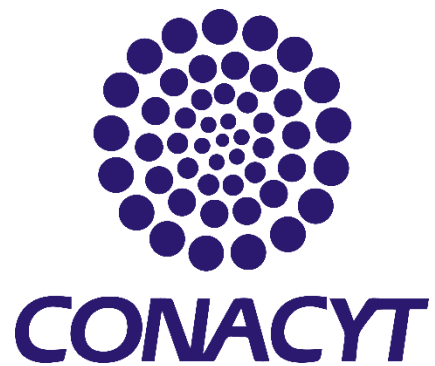
En la especialidad de

NEUROBIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Director de Tesis:

Dr. José Víctor Segovia Vila

Agradecimientos



Quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico aportado en mi beca para la culminación de mi maestría.



De igual manera gracias al Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) por permitirme ser parte de tan honorable institución.

Agradecimientos al **Dr. José Víctor Segovia Vila** por incorporarme a su equipo de investigación y por ser el director de mi tesis de maestría, infinitas gracias por su tiempo, por la confianza y por el conocimiento depositado en mi ser.

De igual manera gracias al laboratorio 44 por todo su apoyo, en especial a sus auxiliares, la QFI. Paula Vergara Zubillaga y la QFB. Araceli Navarrete Alonso. Quiero resaltar todo el asesoramiento y apoyo brindado por mis compañeros, especialmente el MC. Manuel Lara Lozano y el MC. José Nicolás Aguirre Pineda.

Quiero agradecer a mi comité revisor, primero a la Dra. Lorenza Gonzales Mariscal, a quien admiro y respeto profundamente por su trayectoria y su impecable trabajo de investigación, así como a su alumna la MC. Jael Miranda. Segundo y no menos importante, al Dr. Juan Ernesto Ludert, alguien a quien además de asesor es muy fácil llamar amigo, así como a sus estudiantes: Romel, Gerson y Mercedes, los venezolanos más mexicanos que conozco.

Agradecimientos especiales al LaNSE por permitir usar sus servicios de secuenciación para proseguir en mi proyecto de tesis, sobre todo a la D en C. Dulce María Delgadillo Álvarez.

Gracias a mis compañeros de generación, no solo por compartir su conocimiento, si no por compartir su amistad, especialmente ustedes: Sandra, Juan Manuel, Paola Y Jesús.

Gracias a mi familia quien siempre me ha apoyado, todo lo que soy es gracias a ustedes, sobre todo gracias a mi madre María Regina Gallegos QEPD. Los quiero demasiado y son mi principal pilar.

Dedicatoria

Quiero dedicar este proyecto de maestría a mi madre **María Regina Gallegos** quien falleció en noviembre del año pasado, víctima de un glioblastoma. Tu muerte aún está tan fresca, el dolor siempre estará presente... pero las ganas de superarme, de saber que estás orgullosa de tu hijo desde el cielo y de pintar una sonrisa en tu rostro, nunca fueron tan intensas como hoy.

Me guiaste durante tu vida, y aún hoy que has partido de este mundo, sigues orientándome en mi sendero. En honor a ti sigo este camino, te amaré por siempre mamá.

Que tu memoria sea eterna.

Índice

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
<u>1.</u> Introducción	3
1.1 Tumores de origen glial.....	4
1.1.1. Clasificación de los gliomas.....	4
1.1.2. Tratamiento y epidemiología del glioblastoma multiforme.....	5
1.1.3. Marcadores moleculares presentes en el glioblastoma multiforme.....	6
1.2 Células troncales en el SNC.....	8
1.2.1. Células troncales neurales.....	8
1.2.2. Células iniciadoras de glioma.....	9
1.2.3. Tropismo de las CTNs hacia las lesiones tumorales.....	12
1.3 Virus del Zika.....	14
1.3.1 Estructura del virus del Zika.....	14
1.3.2 Importancia de la proteína E en los flavivirus.....	15
1.3.3 Ciclo de vida del virus del Zika.....	17
1.3.4 Receptores de entrada al virus del Zika.....	18
<u>2.</u> Justificación.....	20
<u>3.</u> Hipótesis.....	21
<u>4.</u> Objetivos	21
4.1. Objetivo general.....	21
4.2. Objetivos particulares.....	21
<u>5.</u> Materiales y metodos	22
5.1. Clonación de la región que codifica para la proteína E.....	23
5.1.1. Amplificación de la región que codifica para la proteína E.....	23
5.1.2. Generación del vector de clonación	23

5.2. Subclonación de la región que codifica para la proteína E	24
5.3. Cultivos celulares	24
5.3.1. Cultivo de la línea celular C6	24
5.3.2. Generación de gliomaesferas.....	25
5.3.2. Cultivo de la línea celular ReNcell	25
5.4. Caracterización de la línea celular C6.....	26
5.5. Infección con el ZIKV	26
5.6. Expresión de la proteína E en las CTNs.....	27
5.6.1. Transfección	27
5.6.2. RT-PCR.....	27
5.6.3. Inmunofluorescencia	28
<u>6.</u> Resultados	29
6.1. Análisis de la expresión de los receptores al ZIKV en las células de glioma.....	30
6.2. Evaluación de la capacidad infectiva del ZIKV sobre las células de glioma.....	32
6.3. Clonación de la región que codifica para la proteína E en el genoma del ZIKV.....	33
6.4. Desarrollo de un vector de expresión para la proteína E en las células de mamífero.....	37
6.5. Inducción y evaluación de la expresión de la proteína E en las CTNs.....	39
<u>7.</u> Discusión.....	41
<u>8.</u> Conclusión.....	43
<u>9.</u> Perspectivas.....	44
<u>10.</u> Referencias bibliográficas.....	45

Lista de figuras

Figura	Pág.
Figura 1. Tumores de origen glial	4
Figura 2. Relación entre los marcadores moleculares y diversos tipos de gliomas	7
Figura 3. Nichos neurogénicos en el cerebro adulto	8
Figura 4. Marcadores moleculares en las CTNs y sus progenitores	9
Figura 5. Hipótesis de la célula troncal cancerosa	11
Figura 6. Las CTNs como vehículos de genes terapéuticos	13
Figura 7. Genoma del ZIKV	14
Figura 8. Estructura de la proteína E del ZIKV	15
Figura 9. El ZIKV impide la formación de neuroesferas	16
Figura 10. Ciclo de vida del virus del Zika	18
Figura 11. Expresión de los receptores al ZIKV en monocapa de células de glioma	30
Figura 12. Expresión de los receptores al ZIKV en neuroesferas de células de glioma	31
Figura 13. El ZIKV infecta a las células C6	32
Figura 14. Amplificación del fragmento que codifica a la proteína E del ZIKV	33
Figura 15. Mapa del plásmido de clonación pCR4/ProteinE	34
Figura 16. Generación de los plásmidos de clonación pCR4/ProteinE	35
Figura 17. Secuencia de la región clonada en el genoma del ZIKV	36
Figura 18. Mapa del vector de clonación pcDNA3.1/ProteinE	37
Figura 19. Generación del plásmido de expresión pcDNA3.1/ProteinE	38
Figura 20. Las CTNs pueden expresar el transcrito que codifica para la proteína E	39
Figura 21. La proteína E llega a la membrana de las CTNs	40

Lista de abreviaturas

SNC	Sistema nervioso central
OMS	Organización Mundial de la Salud
GBM	Glioblastoma multiforme
IDH	Isocitrato deshidrogenasa
TMZ	Temozolamida
EGFR	Receptor para el factor de crecimiento epidermal
MGMT	O ⁶ -metilguanin-ADN-metiltransferasa
hTERT	Telomerasa transcriptasa inversa
ATRX	Síndrome de alfa-talasemia con retraso mental ligado al X
SVZ	Zona subventricular
SGZ	Zona subgranular
CTN	Célula Troncal Neural
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
EGF	Factor de crecimiento epidermal
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
HGF	Factor de crecimiento hepático
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
Gas1	Growth arrest specific 1
GFP	Proteína verde fluorescente
ZIKV	Virus del Zika
JEV	Virus de la encefalitis japonesa
TGN	Trans Golgi
PrM	Proteína M
TAM	Tyro3 Axl Mer
TIM	Receptor de célula T con dominios de mucina e inmunoglobulina

RESUMEN

El glioblastoma es el tumor glial con el peor pronóstico entre este tipo de tumores. A pesar de la agresiva terapia multimodal empleada para su tratamiento el resultado siempre es fatal, con una esperanza de vida de solo 15 meses aproximadamente. Existe una pequeña población celular dentro del tumor emparentada a las células troncales neurales (CTNs), la cual se denomina como células iniciadoras de glioma. Estas células son muy resistentes al tratamiento convencional, y están asociadas a las recaídas y a la generación de nuevos tumores.

Se ha propuesto al virus del Zika (ZIKV) como un virus oncolítico en contra del glioblastoma, infectando principalmente a la población de las células iniciadoras de glioma, generando muerte por apoptosis. La infección se debe a la interacción de la proteína de envoltura (proteína E) del virus con los receptores de la célula blanco.

En nuestro laboratorio se comprobó la capacidad migratoria de las CTNs hacia los sitios de lesión tumoral, mostrando un alto tropismo hacia las células de glioma. En el presente trabajo se demuestra la presencia de los receptores al ZIKV Axl, Tyro3 y Tim1 en las células de glioma, los cuales permiten que estas células sean un blanco de infección para el ZIKV. Además, se logró expresar a la región que codifica para la proteína E en el genoma del ZIKV en las CTNs, tanto a nivel de transcrito como de proteína. Aprovechando el alto tropismo de las CTNs hacia las células de glioma, la expresión de la proteína E puede ser empleada para la generación de un modelo de reconocimiento contra las células iniciadoras de glioma.

ABSTRACT

Glioblastoma has the worst prognosis among glial tumors. Despite the aggressive multimodal therapy used for its treatment, the result is always fatal, with a life expectancy of only approximately 15 months. There is a small cell population within the tumor that is related to the neural stem cells (NSCs), which are called glioma-initiating cells. Glioma-initiating cells are highly resistant to conventional treatment, and are associated with relapses and the generation of new tumors.

Zika virus (ZIKV) is an oncolytic virus against glioblastoma, that infects mainly the population of glioma-initiating cells and generates death by apoptosis. ZIKV infection is due to the interaction of the viral envelope protein (E protein) with the cell receptors.

In our laboratory, the migratory capacity of the NSCs towards the sites of tumor lesion was verified, showing a high tropism towards the glioma cells. This thesis demonstrates the presence of ZIKV receptors Axl, Tyro3 and Tim1 in glioma cells, which allow these cells to be an infection target for ZIKV. In addition, we were able to express the region that codes for E protein in the ZIKV genome in NSCs, both at the level of transcript and protein. Taking advantage of the high tropism of NSCs towards glioma cells, the expression of protein E can be used to generate a recognition model against glioma-initiating cells.

1. Introducción

1.1 Tumores de origen glial

1.1.1 Clasificación de los gliomas

Los gliomas son tumores del sistema nervioso central (SNC) que se originan a partir de células de linaje glial, es decir, a partir de astrocitos, oligodendrocitos o células ependimarias, generando astrocitomas, oligodendrogliomas y ependimomas respectivamente (figura 1). Sin embargo, también puede haber tumores poco frecuentes con composición celular mixta (Rao et al, 2003).

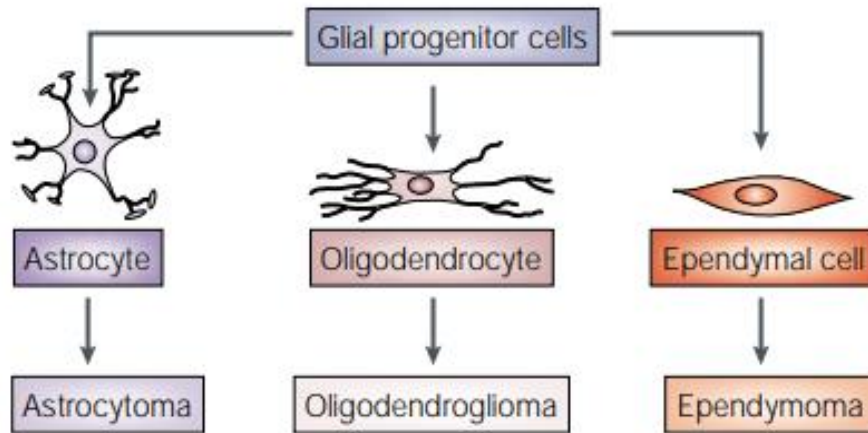


Figura 1. Tumores de origen glial. Las células gliales en el SNC pueden generar diversos tipos de tumores cerebrales (gliomas) dependiendo del linaje celular al cual pertenecen. Los gliomas pueden ser astrocitomas, oligodendrogliomas o ependimomas (Rao et al, 2003).

Entre los gliomas, los astrocitomas son el tipo de tumor cerebral más frecuente y se clasifican según el grado de malignidad de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en:

- Astrocitomas de grado I (Ej. Astrocitoma pilocítico)
- Astrocitomas de grado II (Ej. Astrocitoma difuso)
- Astrocitomas de grado III (Ej. Astrocitoma anaplásico)
- Astrocitomas de grado IV (Ej. Glioblastoma)

El glioblastoma multiforme (GBM) es una neoplasia de grado 4, siendo el glioma con mayor incidencia y también el más mortal. El GBM rara vez genera metástasis fuera del SNC, sin embargo, es un tumor altamente infiltrante en el parénquima cerebral con bordes indefinidos, lo cual hace imposible la resección quirúrgica completa (Rao et al 2003; Louis et al 2007). Los glioblastomas pueden originarse a partir de la evolución de astrocitomas difusos y astrocitomas anaplásicos dando origen a un nuevo tumor con mayor grado de malignidad (glioblastomas secundarios). Sin embargo, los GBM suelen aparecer sin la presencia previa de gliomas de bajo grado originándose un tumor *de novo* (glioblastoma primario). En la actualidad, la forma de clasificación más aceptada para el glioblastoma se basa en el perfil de expresión del gen *IDH* (Louis et al, 2016), el cual codifica para la enzima isocitrato deshidrogenasa (IDH). La forma mutada de la IDH suele estar relacionada con los gliomas de bajo grado y los glioblastomas secundarios, y por el contrario, la expresión de la forma nativa de la enzima está relacionada con los glioblastomas primarios (Thakkar et al, 2014).

1.1.2 Tratamiento y epidemiología del glioblastoma multiforme

Dentro de los tumores gliales, el GBM es el tumor más frecuente en la edad adulta, el más difícil de tratar y el de peor pronóstico, siendo letal en todos los casos. El tratamiento convencional consta de cirugía citorreductora, radioterapia y quimioterapia adyuvante con temozolamida (TMZ). A pesar de la agresiva terapia multimodal, la media de supervivencia es de aproximadamente 14.6 meses a partir del momento del diagnóstico, siendo una de las neoplasias con peor pronóstico. La tasa de supervivencia a los 2, 3, 4 y 5 años es de 27.3%, 16.7%, 12.9% y 9.8% respectivamente (Tran y Rosenthal, 2010).

El GBM tiene una incidencia de 3.19 casos por cada 100, 000 habitantes con una edad de aparición media de 64 años, siendo la neoplasia maligna más común del SNC, representando el 54% de todos los gliomas. El mal pronóstico del GBM se

relaciona estrechamente con la naturaleza infiltrante del tumor y con su elevada resistencia al tratamiento.

Los glioblastomas pueden evolucionar a partir de diversas rutas genéticas, afectando a diversos grupos de edad y presentando respuestas diferentes a los tratamientos. Los glioblastomas primarios suelen presentarse en pacientes mayores, con una edad promedio de 62 años, y suelen representar el 80% de este tipo de tumores. El porcentaje restante de estos tumores suele evolucionar a partir de gliomas de bajo grado y se presentan a una edad promedio de aparición de 45 años (Thakkar et al, 2014).

1.1.3 Marcadores moleculares presentes en el glioblastoma multiforme

Los GBM son tumores muy heterogéneos, presentándose de diversas formas y expresando diferentes marcadores moleculares. La enzima IDH suele ser uno de los marcadores moleculares más estudiados entre los gliomas, tomándose recientemente el perfil de expresión de esta enzima para la clasificación de los gliomas de bajo grado y de los glioblastomas (glioblastoma IDH-nativa y glioblastoma IDH-mutante). Los glioblastomas que presentan la forma nativa de la IDH recientemente se han subdividido en glioblastomas de células gigantes, gliosarcomas y glioblastomas epitelioides (Louis et al, 2016).

Además del perfil de expresión de la IDH, otros marcadores moleculares se asocian con la aparición del GBM. Los glioblastomas primarios incrementan la expresión del receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR), exhiben mutaciones en el gen homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN), deleciones en p16 y una alta frecuencia de mutaciones en el promotor de la telomerasa transcriptasa inversa (hTERT). Las mutaciones en los genes de las proteínas TP53, ATRX e IDH, suelen relacionarse con la aparición de glioblastomas secundarios y otros gliomas de grado II/III (Figura 2) (Thakkar et al, 2014).

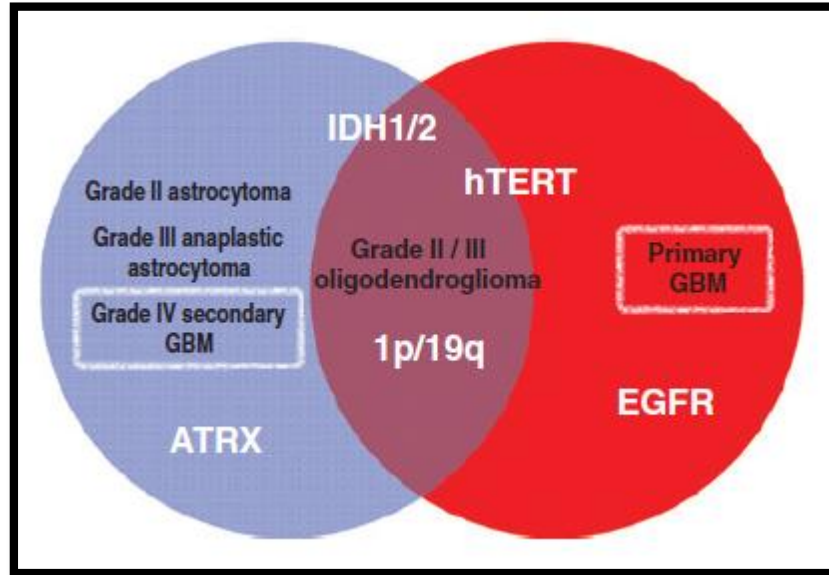


Figura 2. Relación entre los marcadores moleculares y diversos tipos de gliomas. Comparación entre los marcadores moleculares característicos encontrados en astrocitomas de grado II y III y glioblastomas secundarios (color azul), oligodendrogliomas grado II y III (color púrpura) y glioblastomas primarios (color rojo) (Modificado de Thakkar et al, 2014).

Algunas mutaciones presentes en los glioblastomas generan resistencia a las terapias convencionales. La TMZ es un agente terapéutico que añade grupos alquilo a las guaninas causando daño al ADN. La O⁶-metilguanin-ADN-metiltransferasa (MGMT) es una enzima reparadora del ADN que actúa removiendo los grupos alquilo de la posición O⁶ en las guaninas. El gen que codifica para la MGMT suele estar metilado en los glioblastomas secundarios, ocasionando un silenciamiento en la expresión de esta enzima en las células tumorales y una mayor resistencia a los agentes quimioterapéuticos (Thakkar et al 2014).

1.2 Células troncales en el SNC

1.2.1 Células troncales neurales

Las células troncales neurales (CTNs) son células no diferenciadas del SNC con capacidad de auto-renovación y de generación de células progenitoras capaces de dar origen tanto a neuronas como a células gliales. Al igual que las otras células troncales de un organismo, las CTNs se dividen asimétricamente, generando una célula hija idéntica a la CTN y una célula progenitora más diferenciada.

El término neurogénesis se refiere al proceso por el cual se generan neuronas maduras a partir de las CTNs. En un principio se creía que este proceso se generaba solo durante el desarrollo embrionario, sin embargo, en la actualidad se sabe que en el cerebro adulto existen dos nichos neurogénicos: la zona subventricular (SVZ) y la zona subgranular (SGZ) del giro dentado en el hipocampo (Ming & Song, 2011) (Figura 3).

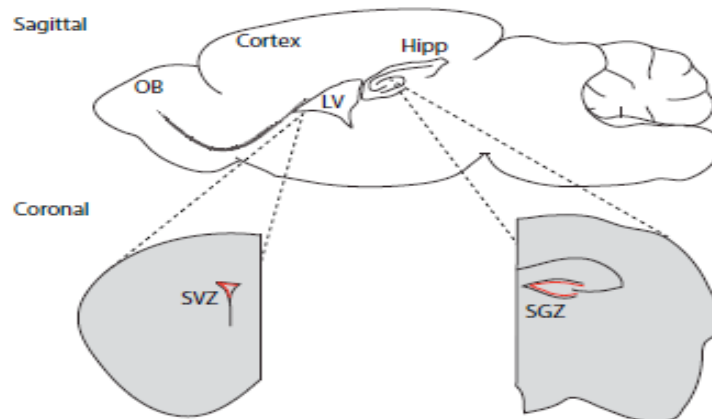


Figura 3. Nichos neurogénicos en el cerebro adulto. El proceso de neurogénesis en el adulto está confinado a dos áreas específicas dentro del cerebro: la zona subventricular (SVZ) y la zona subgranular (SGZ) en el giro dentado (Li et al, 2016).

La neurogénesis tiene como finalidad la generación de neuronas maduras tanto en la SVZ como en la SGZ, sin embargo, el proceso de maduración, así como los marcadores moleculares pueden diferir un poco dependiendo del nicho neurogénico. Entre los marcadores de troncalidad expresados en las CTNs se encuentra la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), la nestina y Sox2 (Figura 4).

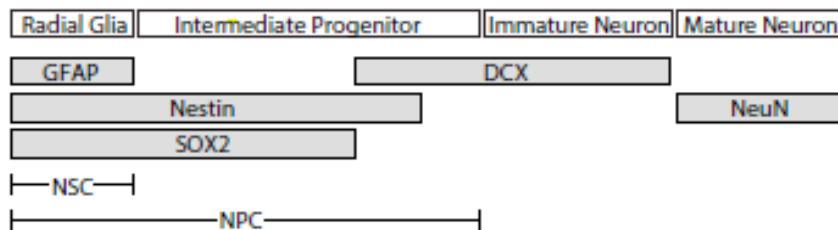


Figura 4. Marcadores moleculares en las CTNs y sus progenitores. Las CTNs suelen expresar marcadores moleculares específicos como GFAP, nestina y Sox2. Las células progenitoras neurales, las cuales derivan de las CTNs suelen expresar marcadores de troncalidad como nestina y Sox2, y conforme avanzan empiezan a expresar marcadores de neuronas inmaduras como DCX, al igual que los neuroblastos. NeuN es un marcador característico de las neuronas maduras. NSC: Célula troncal neural; NPC: Célula progenitora neural; GFAP: Proteína ácida fibrilar glial; DCX: Doblecortina. (Li et al, 2016).

1.2.2 Células iniciadoras de glioma

Los gliomas son tumores muy heterogéneos, que parecen tener una organización jerárquica en la cual se observa un vasto gradiente de diferenciación. Una pequeña población celular dentro del tumor parece estar emparentada con las CTNs y muestra propiedades de auto-renovación y tiene la capacidad de dar origen a células más diferenciadas. Estas células troncales cancerosas han recibido diversos nombres: células iniciadoras de glioma (Goffart et al, 2013), células troncales de glioma (Bao et al, 2006) y células iniciadoras de tumores cerebrales (Singh et al, 2004).

En el GBM, el mal pronóstico se relaciona con la población de células iniciadoras de glioma, debido a que estas células participan en la formación, mantenimiento, infiltración y recurrencia del tumor. Las células iniciadoras de glioma muestran marcadores similares a las CTNs, tales como nestina y CD133 (Bao et al 2006).

Las células tumorales CD133⁺ tienen la capacidad de auto-renovación, y generan neuroesferas cuando se cultivan en condiciones apropiadas, esto es, en ausencia de suero y en presencia de factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). De igual manera, la implantación de las células CD133⁺ en ratones inmunocomprometidos genera tumores en el parénquima cerebral, a diferencia de las células CD133⁻ las cuales no muestran capacidad tumorigénica (Hemmati et al, 2003; Singh et al, 2003).

Algunos estudios sugieren que no todas las células de glioma con capacidad tumorigénica muestran un fenotipo CD133⁺, lo cual señala la presencia de otros marcadores tumorales de troncalidad en los tumores (Beier et al, 2007), tales como SSEA-1/CD15 (Read et al, 2009) y la integrina $\alpha 6$ (Lathia et al, 2010). A pesar de estos hallazgos, CD133 sigue siendo el marcador más estudiado y junto con la nestina se asocia a un peor diagnóstico en los pacientes con gliomas malignos (Read et al, 2009). El porcentaje de células CD133⁺ correlaciona con el grado del tumor, y, en consecuencia, una alta población de células iniciadoras de glioma conlleva a un peor diagnóstico. Las células iniciadoras de glioma expresan bombas que expulsan a los fármacos quimioterapéuticos hacia el exterior celular, poseen una mayor capacidad de eliminar a las especies reactivas de oxígeno y pueden permanecer en estado de quiescencia, lo que les permite escapar a los tratamientos dirigidos a las células tumorales en proliferación y así dar origen a un nuevo tumor. La hipótesis de la célula troncal cancerosa postula el modelo celular jerárquico dentro del tumor y atribuye a las células iniciadoras de glioma la agresiva recurrencia de estas neoplasias (Das et al, 2008) (Figura 5).

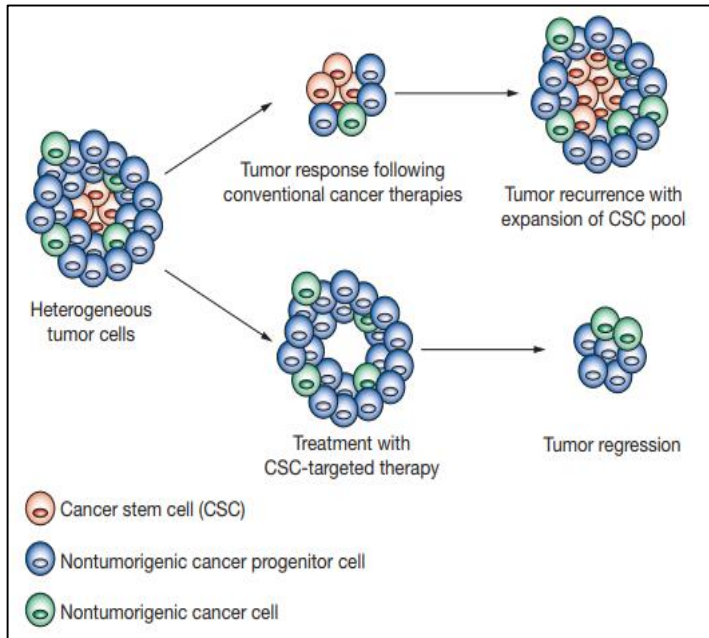


Figura 5. Hipótesis de la célula troncal cancerosa.

Las células troncales cancerosas tienen propiedades de pluripotencia y auto-regeneración, generando diversos linajes celulares que propician el crecimiento tumoral. Los tratamientos antineoplásicos fallan en la eliminación de las células troncales cancerosas y esta pequeña población es la responsable de la recurrencia del tumor (Das et al, 2008).

A pesar de que se sugiere a las CTNs como el origen de las células iniciadoras de glioma, existen reportes que sugieren que la gliomagénesis puede ocurrir a partir de células ya diferenciadas, tales como neuronas maduras o astrocitos. Así mediante la activación constitutiva de H-RasV12 y el silenciamiento de p53 es posible generar de manera experimental gliomas a partir de poblaciones astrocitarias y neuronales en modelos murinos (Friedmann-Morvinski et al, 2012). Estos estudios sugieren que varios linajes celulares pueden originar transformaciones neoplásicas en el SNC. Sin embargo, los modelos experimentales sugieren a la SVZ y a la SGZ en el giro dentado, como los posibles sitios de origen de las células neoplásicas en presencia de los factores carcinogénicos, y por consecuencia, sustentan la teoría del origen tumoral a partir de las células troncales (Dirks et al, 2008b).

1.2.3 Tropismo de las CTNs hacia las lesiones tumorales

Estudios recientes han demostrado la capacidad migratoria de las CTNs hacia los tumores intracraneales, observándose un tropismo nato hacia las zonas de lesión tumoral, lo que sugiere el empleo de las CTNs como vehículos de genes terapéuticos (Aboody et al, 2000; Díaz-Coranguez et al, 2013; López-Ornelas et al, 2014). Los factores de crecimiento, como el factor de crecimiento epidermal (EGF), el factor de crecimiento hepático (HGF) y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) son agentes gliomatópicos potentes para las CTNs (Díaz-Coranguez et al, 2013). En el caso de HGF se ha demostrado su papel en la vía de Ras-PI3K promoviendo el re-arreglo del citoesqueleto y la motilidad celular (Kendal et al, 2008).

En nuestro laboratorio se probó la capacidad de las CTNs como acarreadoras de genes terapéuticos. Las CTNs se modificaron genéticamente para secretar una forma soluble de la proteína Gas1 (del inglés, Growth Arrest Specific 1), que induce arresto celular y tiene efectos pro-apoptóticos. Implantando intracranealmente células de glioma en el hemisferio cerebral derecho y CTNs modificadas genéticamente para expresar a la GFP en el hemisferio contralateral (ReNcell-GFP), se comprobó la capacidad migratoria de las CTNs hacia las zonas de lesión tumoral (figura 6). De igual manera, se diseñaron CTNs que además de expresar a la GFP, pueden expresar a tGas1 de manera regulada por tetraciclina (ReNcell-GFP/tGas1/TR). La expresión de tGas1 por medio de las CTNs disminuyó la viabilidad en las células de glioma, induciendo arresto celular y apoptosis (López-Ornelas et al, 2014). Cabe mencionar que la co-expresión de tGas1 con la proteína PTEN mostró un mayor efecto terapéutico contra las células de glioma, al inhibir la activación de las vías AKT y ERK1/2 (Sánchez-Hernández et al, 2018).

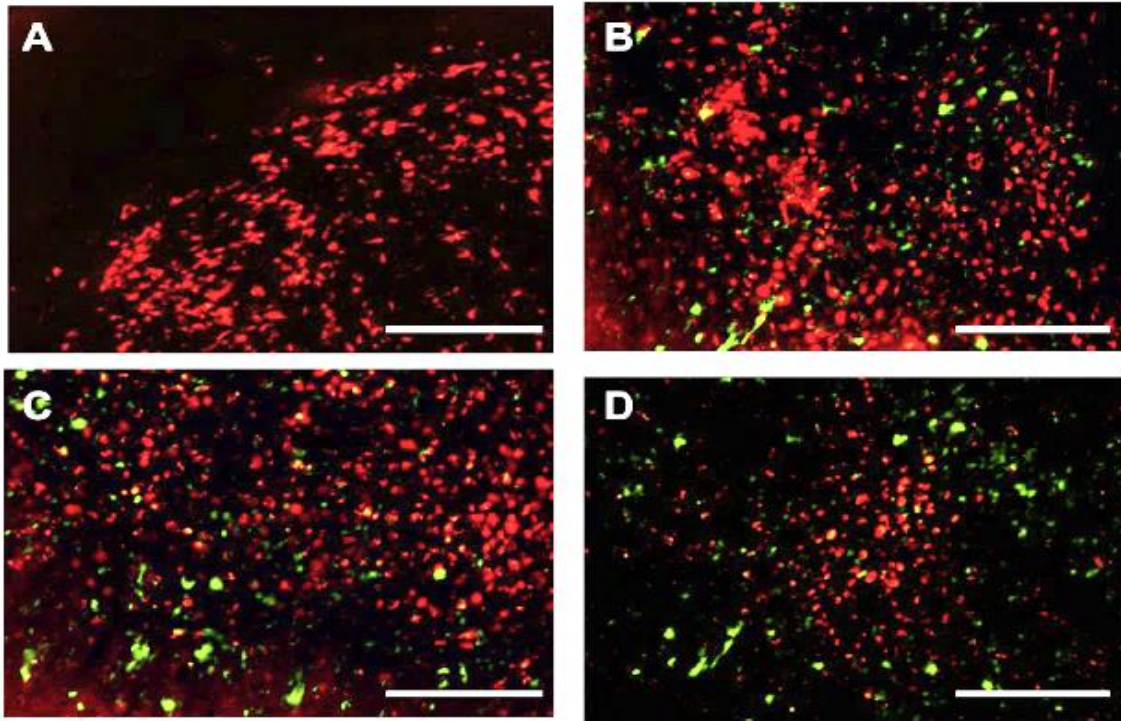


Figura 6. Las CTNs como vehículos de genes terapéuticos. Imágenes de microscopía confocal en el estriado de ratones desnudos, que muestran diversos grupos experimentales de tumores intracraniales 21 días después de haberse implantado células de glioma que expresan a la RFP en el hemisferio cerebral derecho. Las células tumorales se muestran en color rojo y las CTNs de la línea ReNcell en color verde. A) Ratones a los que solo se les administró tetraciclina. B) Ratones a los que se les administró tetraciclina y se les implantó ReNcell-GFP en el hemisferio cerebral contralateral. C) Ratones a los que se les implantó RenCell-GFP/tGas1/TR en el hemisferio cerebral contralateral. D) Ratones a los que se les administró tetraciclina y se les implantó ReNcell-GFP/tGas1/TR en el hemisferio cerebral contralateral (tomado de López-Ornelas et al, 2014).

Como se ha demostrado, el tropismo de las CTNs hacia los sitios de lesión tumoral puede ser aprovechado en terapia génica para realizarse tratamientos complementarios en contra del GBM (López-Ornelas et al, 2014).

1.3 Virus del Zika

1.3.1 Estructura del virus del Zika

El virus del Zika (ZIKV) es un importante patógeno humano estrechamente relacionado con el desarrollo de la microcefalia. El ZIKV pertenece al grupo de los flavivirus, y posee un genoma de RNA monocatenario con sentido positivo de aproximadamente 10.8 kb. El genoma viral se traduce en una sola poliproteína de 3423 aminoácidos, que codifica a tres proteínas estructurales: cápside (C), membrana (M) y envoltura (E). De igual manera, la escisión de esta poliproteína origina siete proteínas no estructurales: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5, que son importantes durante la replicación y el empaquetamiento del genoma viral para la producción de nuevos viriones (Figura 7). La generación de las distintas proteínas virales se regula por proteasas tanto del virus como del propio hospedero (Sirohi y Kuhn, 2017).

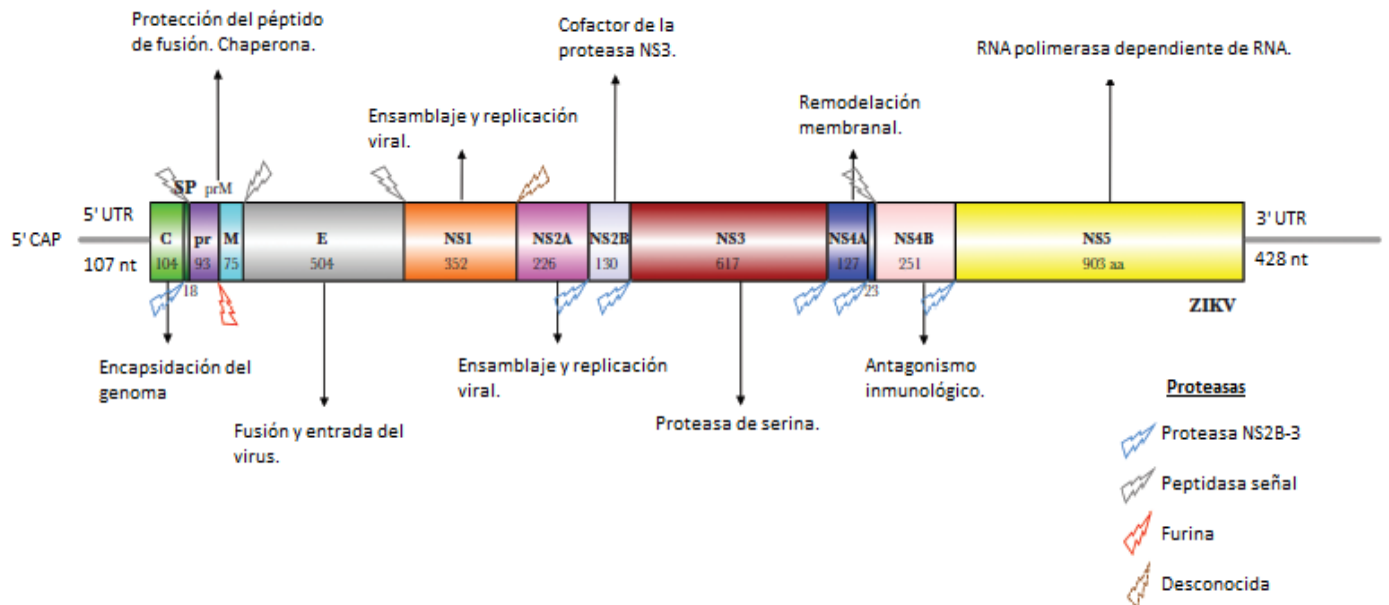


Figura 7. Genoma del ZIKV. El genoma viral codifica para una poliproteína de 3423 aa, que se corta en diez proteínas individuales. La generación de las proteínas estructurales (C, PrM/M y E), así como de las no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) se regula por proteasas tanto del virus como del huésped. Las líneas grises muestran las regiones no traducidas del genoma viral (5' UTR y 3' UTR). El RNA viral se modifica mediante la adición de una caperuza en el extremo 5', pero carece de la cola de poli A en su extremo 3' (Modificada de Sirohi y Kuhn, 2017).

El ZIKV es un virus envuelto en una membrana lipídica que reviste a la cápside, que a su vez resguarda al ARN viral. En la envoltura viral quedan ancladas las proteínas E y de membrana (proteína M). Las partículas maduras del ZIKV tienen un diámetro de 50 nm y poseen 180 copias de las proteínas E y M embebidas en la envoltura viral. De manera similar a otros flavivirus, la proteína E del ZIKV está constituida por 4 dominios (Figura 8): un dominio transmembranal (stem anchor) y tres dominios localizados del lado exterior de la membrana (ectodominios I, II y III) (Sirohi y Kuhn, 2017).

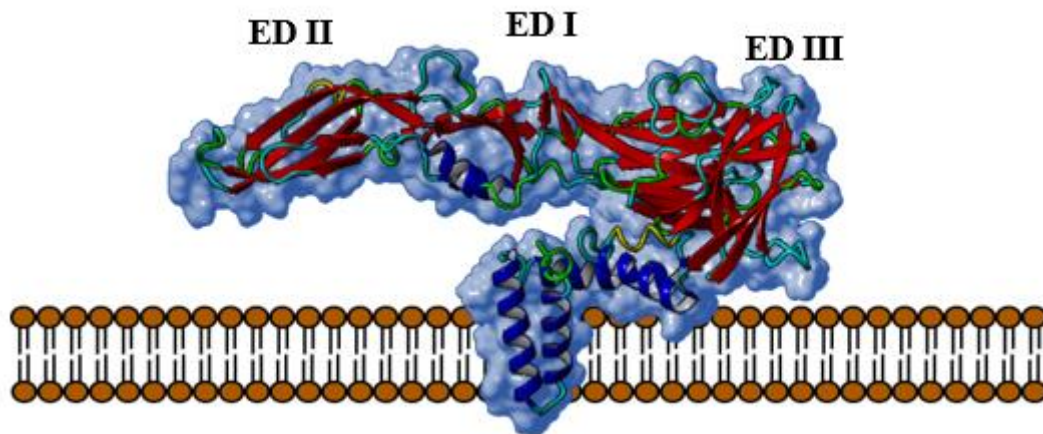


Figura 8. Estructura de la proteína E del ZIKV. La proteína E del virus del Zika se ancla a la membrana mediante dos pasos transmembrana (stem anchor) y muestra hacia al exterior tres dominios diferentes: ectodominio 1 (EDI), ectodominio 2 (ED II) y ectodominio 3 (ED III).

1.2.2 Importancia de la proteína E en los flavivirus

La proteína E se organiza en dímeros y participa como ligando de entrada y fusión a las células diana. Una gran variedad de linajes celulares son blanco del ZIKV, incluyendo a células del SNC, como astrocitos, oligodendrocitos, neuronas maduras y células troncales neurales (Li et al, 2016; Souza et al, 2016; Tang et al 2016; Miner y Diamonds, 2017). Estudios con el virus de la encefalitis japonesa (JEV), un miembro del grupo de los flavivirus, mostraron que las mutaciones en la proteína E son suficientes para atenuar su neurovirulencia (Gromowski et al, 2015).

Du y colaboradores demostraron que la expresión de la proteína E del virus del JEV genera la formación de sincicios, y que la proteína E entra en la vía secretora, se sobre-expresa en el retículo endoplásmico y llega a la cara externa de la membrana plasmática. Cierta fracción de la proteína genera vesículas de secreción llamadas VLPs (del inglés: Virus like particles) (Du et al, 2015). Diversos grupos han intentado generar vacunas contra los flavivirus empleando principalmente a las proteínas E y M, debido a su exposición en la envoltura viral y a su capacidad inmunogénica (Liu et al, 2018).

Dada la similitud entre las CTNs, las cuales son blancos para el ZIKV, y las células iniciadoras de glioma, el ZIKV se ha propuesto como un modelo oncolítico para células de glioma que infecta preferentemente las células iniciadoras de glioma en comparación con las células diferenciadas del glioma. Al respecto, se ha visto que el ZIKV disminuye la generación de neuroesferas de células de glioma *in vitro* (Zhu et al, 2017).

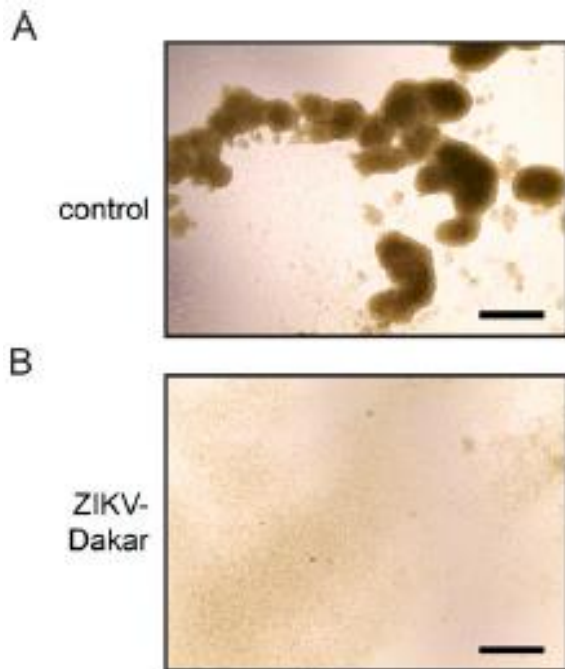


Figura 9. El ZIKV impide la formación de neuroesferas. Se realizaron cultivos de células de glioblastoma favoreciendo la generación de esferas, infectándose el cultivo de la imagen B con la cepa Dakar de ZIKV. 7 días después de la infección se evaluó la generación de neuroesferas. MOI: 5. (tomado de Zhu et al, 2017).

1.3.2 Ciclo de vida del virus del Zika

Cuando el ZIKV interactúa con los receptores de membrana por medio de la proteína E, la célula blanco endocita a la partícula viral. internalizándola en un endosoma. El pH ácido del endosoma ocasiona cambios conformacionales en las proteínas de envoltura del ZIKV, lo que lleva a la trimerización de la proteína E y la exposición de un péptido de fusión, que permite que la membrana viral se fusione a la membrana endosomal conllevando a la liberación de la nucleocápside en el citosol. El desnudamiento del ARN_v se genera en el citosol, permitiendo la replicación del genoma viral y la síntesis de la poliproteína, la cual se transloca al retículo endoplásmico de manera cotraduccional. El ensamblaje de los nuevos virus se genera dentro del retículo. Las partículas virales inmaduras recién ensambladas entran en la ruta secretora, cabe mencionar que la proteína de premembrana (PrM) actúa a lo largo de la ruta bloqueando al péptido fusión de la proteína E. Llegado al trans Golgi (TGN), la proteasa furina escinde a la proteína PrM generando a la proteína M, la cual sigue embebida en la membrana viral, y al péptido Pr, el cual sigue bloqueando al péptido fusión de la proteína E. Cuando las partículas virales son exocitadas, el pH neutro del ambiente extracelular ocasiona la separación del péptido Pr de la proteína E, generando a los viriones maduros (figura 10), los cuales constan de ARN (+) dentro de la nucleocápside, la cual a su vez está recubierta por la membrana viral que contiene a la proteína M y a la proteína E expuesta hacia el exterior (Stiasny y Heinz, 2006).

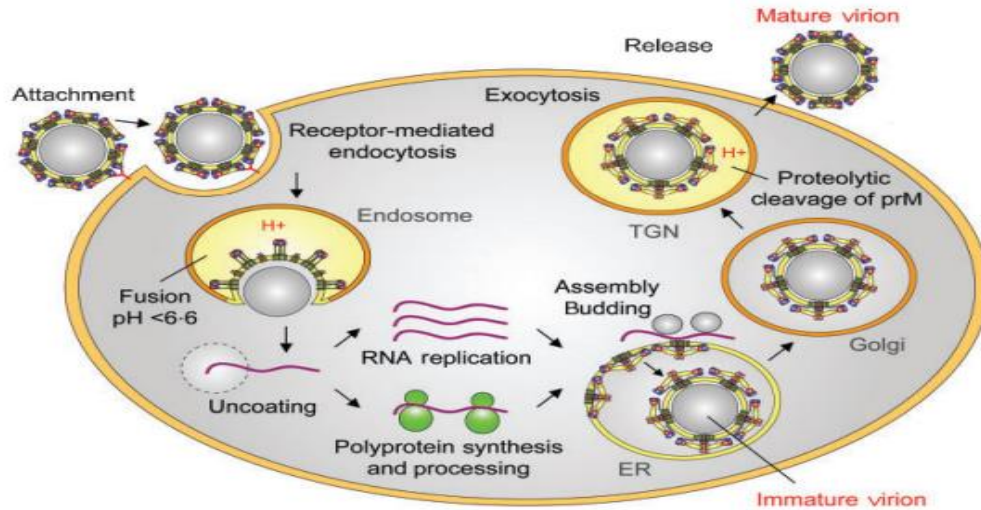


Figura 10. Ciclo de vida del virus del Zika. Los viriones ingresan a la célula por endocitosis mediada por receptor. Dentro del endosoma debido al pH ácido se produce la fusión de la membrana viral con la membrana endosomal, liberando al genoma viral en el citosol, el cual puede ser replicado directamente y a su vez traducido. El ensamblaje viral se genera dentro del retículo viral, pasando las partículas inmaduras recién sintetizadas a la ruta secretora. Al llegar al TGN, las partículas virales sufren los últimos cambios estructurales y se liberan en el medio extracelular a los viriones maduros (tomado de Stiasny y Heinz, 2006).

1.3.3 Receptores de entrada al virus del Zika

Identificar a los receptores de entrada al ZIKV es de gran utilidad para conocer el tropismo y la patogénesis ocasionada por este virus. Los receptores de entrada al ZIKV tipo TIM y TAM han sido los más caracterizados para el reconocimiento y la entrada del ZIKV en sus células blanco. La familia Tyro3 Axl Mer (TAM), está compuesta de receptores tirosin-cinasa involucrados en la eliminación de las células apoptóticas y se encuentra presente en los diversos linajes celulares que infecta el ZIKV. Actualmente Axl se considera como el receptor de entrada para el ZIKV en las células troncales neurales y las células de origen glial y la expresión de este receptor se relaciona a un mayor grado de infección (Meertens et al, 2012; Meertens et al, 2017; Nowakowski et al, 2016).

Otro candidato como receptor de entrada al ZIKV es la proteína TIM1, la cual reconoce a la fosfatidilserina, lípido altamente presente en la envoltura viral. Entre las células que puede infectar el ZIKV, el receptor TIM1 se expresa en macrófagos de Hofbauer, células endoteliales y trofoblastos (Miner y Diamond, 2017). Tanto los receptores TIM y TAM se unen a fosfatidilserina (PS), la diferencia es que los receptores TIM lo hacen de manera directa, mientras que los de la familia TAM lo hacen de manera indirecta por medio de ligandos como la proteína growth arrest specific 6 (Gas6) y la proteína S (ProS).

A pesar de compartir las mismas proteínas estructurales y los mismos receptores de entrada que otros flavivirus, el ZIKV difiere en que puede cruzar la barrera placentaria y es altamente neurovirulento. Estas diferencias en el ZIKV quizá se deban a los motivos de glicosilación en sus proteínas. Estas características dan al ZIKV un tropismo celular muy variado, pudiendo infectar a un gran rango de células, como CTNs, oligodendrocitos, neuronas, astrocitos, células de la retina, células placentarias, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos y fagocitos mononucleares (Sirohi y Kuhn, 2017). Dentro de las células del SNC que el ZIKV puede infectar, se ha demostrado una preferencia hacia las células troncales neurales y precursoras neurales (Garcez et al, 2016; Li et al, 2016; Nowakowski et al, 2016), de igual manera estudios recientes demuestran una infección preferencial hacia las células troncales dentro de los gliomas (Zhu et al, 2017).

2 Justificación

La forma más maligna y común de gliomas es el glioblastoma, el cual es un tumor altamente infiltrante y recurrente, que a pesar del agresivo régimen terapéutico siempre es letal. Entre los tratamientos actuales están la resección quirúrgica, la radioterapia y la quimioterapia, con un promedio de supervivencia de 14.6 meses aproximadamente. Los estudios recientes muestran que una población de células dentro del tumor con características de troncalidad denominadas células iniciadoras de glioma, están implicadas en la resistencia a los tratamientos convencionales. Para el desarrollo de un abordaje terapéutico resulta crucial la eliminación de estas células en el tratamiento del GBM.

Por otro lado, hay un estrecho vínculo entre la infección del virus del Zika (ZIKV) y el desarrollo de la microcefalia. Este virus, se replica eficazmente en las células troncales neurales embrionarias, genera apoptosis y detiene el ciclo celular. Recientemente se ha propuesto al ZIKV como un virus oncolítico contra el glioblastoma, atacando preferentemente a las células iniciadoras de glioma. Se postula que el ligando de entrada a las células blanco es la proteína E del virus.

El presente proyecto pretende desarrollar CTNs modificadas genéticamente para expresar a la proteína E del virus del Zika en la membrana plasmática. Previamente se demostró que las CTNs migran a los sitios de lesión tumoral, y por la expresión de la proteína E, esperamos que las CTNs reconozcan de manera específica a las células iniciadoras de glioma. Este proyecto ayudará a generar un modelo de reconocimiento contra las células iniciadoras de glioma y demostrará la capacidad de las CTNs como una herramienta adyuvante en el tratamiento de los tumores cerebrales.

3 Hipótesis

Las células troncales neurales (CTNs) pueden expresar a la proteína E del ZIKV lo que les permitirá reconocer a las células iniciadoras de glioma.

4 Objetivos

4.1 Objetivo general

Modificar genéticamente a las CTNs para que expresen a la proteína E del ZIKV con el fin de que puedan identificar de manera específica a las células iniciadoras de glioma.

4.2 Objetivos particulares

1. Caracterizar la expresión de los receptores al ZIKV en las células de glioma.
2. Evaluar la capacidad infectiva del ZIKV sobre las células de glioma.
3. Clonar la región que codifica para la proteína E en el genoma del ZIKV.
4. Desarrollar un vector de expresión de la proteína E para células de mamífero.
5. Inducir y evaluar la expresión de la proteína E en las CTNs.

5. Materiales y métodos

5.1 Clonación de la región que codifica a la proteína E

5.1.1 Amplificación de la región que codifica a la proteína E

El virus del Zika empleado en este proyecto se aisló de mosquitos infectados de la región de Chiapas, México, por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) y fue donado gentilmente por el Dr. Juan Ernesto Ludert del departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular.

El genoma viral (ARNv) se extrajo y purificó directamente del ZIKV mediante columna de intercambio iónico (QiAMP-QIAGEN). Se utilizó el ARNv como molde para la síntesis de ADNc utilizando oligonucleótidos aleatorios. Una vez generado el ADNc se amplificó el fragmento que codifica a la proteína E en el genoma viral utilizando al oligo sentido: “TACCACCATGATCAGGTGCATAGGAGTCAGC” y el oligo antisentido: “ACTCGAGCTAAGCAGAGACGGCTGTGGAT”, obteniéndose un amplicón de 1531 pb. El producto de PCR se purificó a partir de un gel de agarosa 1% y se clonó en el plásmido PCR4 mediante el kit TOPO-TA (Invitrogen).

5.1.2 Generación del vector de clonación

El producto de PCR generado en la amplificación de la región que codifica para la proteína E del ZIKV se corrió en un gel de agarosa al 1% y se purificó directamente del gel a los 15 minutos de iniciar la electroforesis. El producto de PCR se incertó en el vector de clonación, el plásmido pCR4 empleando el estuche comercial TOPO-TA (Invitrogen). El mapa del plásmido (pCR4/ProteinE) se diseñó con el software SnapGene. El plásmido generado se utilizó para transformar cepas de *E. coli* DH5- α mediante choque térmico durante 90 segundos a 4°C. Las bacterias transformadas se inocularon en 1 ml de medio LB (Sigma-Aldrich) y se crecieron en agitación constante durante 1 hora a 37° C, posteriormente se estriaron en placas de agar y se crecieron hasta el día siguiente.

El plásmido se recuperó de las bacterias transformadas mediante lisis alcalina. Este plásmido se empleó para secuenciar a la región clonada del genoma viral usando los servicios de secuenciación del LaNSE-CINVESTAV y de Macrogen Korea.

5.2 Subclonación de la región que codifica para la proteína E

Se realizó una reacción de restricción al plásmido pCR4/ProteinE con las enzimas EcoR1 (New England Biolabs) y Xho1 (New England Biolabs) para liberar el fragmento que codifica para la proteína E. Con las mismas enzimas de restricción se linearizó al vector de expresión, el plásmido pcDNA3.1. Los productos de restricción se sometieron a migración electroforética en un gel de agarosa al 1% y posteriormente se purificaron directamente del gel. El pcDNA3.1 linearizado y el fragmento que codifica para la proteína E se sometieron a una reacción de ligación empleando a la ligasa T4 (Invitrogen) durante 1 hora a 24°C. El producto de la ligación (pcDNA3.1/ProteinE) se utilizó para transformar a bacterias *E. coli* de la cepa DH5- α con el mismo protocolo descrito en el apartado 5.1.2.

5.3 Cultivos celulares

5.3.1 Cultivo de la línea celular C6

Se realizaron cultivos de la línea celular de glioma murino C6 en cajas de 35 mm con medio DMEM F12 (GIBCO) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% (GIBCO), L-glutamina al 1% (Sigma-Aldrich) y penicilina y estreptomycinina al 1% (GIBCO). Las células se incubaron a 37°C con un 5% de CO₂.

5.3.2 Generación de gliomaesferas

Para amplificar la población de células troncales en la línea celular C6 se realizaron ensayos de gliomaesferas. Para el cultivo se utilizó el medio DMEM F12 (GIBCO) suplementado con los factores de crecimiento EGF y FGF (20 ng/ml) (GoldBio), B27 al 1% (GIBCO), L-glutamina al 1% (Sigma-Aldrich) y penicilina y estreptomicina al 1% (GIBCO). Las células C6 se crecieron en cajas de 100 mm como se indica en el apartado 5.3.1 hasta alcanzar una confluencia del 70%, posteriormente el medio se reemplazó por el descrito en este apartado y se incubaron toda la noche a 37°C con un 5% de CO₂.

Al día siguiente se recuperó el medio de la caja de 100 mm y se resembró en cajas de 35 mm para permitir la generación de las esferas. El medio se recuperó y se centrifugó a 900 rpm durante 3 minutos, la pastilla resultante se resuspendió suavemente en medio para gliomaesferas y se sembró en cajas de 35 mm. Los cultivos permanecieron a 37°C con un 5% de CO₂.

5.3.3 Cultivo de la línea celular ReNcell

Se realizaron cultivos de CTNs de la línea celular ReNcell en cajas de 35 mm con medio HA (Millipore) sin SFB, suplementado con los factores de crecimiento EGF y FGF (20ng/ml) (GoldBio), así como penicilina y estreptomicina al 1% (GIBCO). Antes de sembrar a las células, se añadió Matrigel (Corning) a la caja de cultivo durante 1 hora y se incubó a 37°C. El cultivo se mantuvo a 37°C con un 5% de CO₂.

5.4 Caracterización de la línea celular C6

Para analizar la expresión de receptores al ZIKV en las células C6, se siguieron protocolos de inmunofluorescencia indirecta, empleándose anticuerpos policlonales de conejo contra Ax1, Tyro3 y Tim1, a una dilución 1:200. Las células se fijaron en PFA al 4% durante 20 minutos, se permeabilizaron con el detergente Triton X-100 al 0.2% durante 10 minutos y se bloquearon con BSA 1% durante 1 hora antes de la administración del anticuerpo primario, el cual se dejó incubar toda la noche. En seguida se utilizó un anticuerpo secundario contra conejo (dilución 1:1000). Después de la inmunotinción las células se montaron sobre DAPI. Las inmunotinciones se observaron mediante microscopia confocal (Leica TCS SP2) y se analizaron con el programa Fiji.

5.5 Infección con el ZIKV

Las células C6 subconfluentes se infectaron con el ZIKV a una multiplicidad de infección (MOI) de 3. El virus se aspiró 1 hora después de la infección y se reemplazó el medio. Las células se crecieron a 37° con un 5% de CO2 durante 48 horas. Para detectar a las células infectadas, se realizó una inmunofluorescencia indirecta empleando al anticuerpo monoclonal generado en ratón contra la proteína NS3 del virus (dilución 1:300). El anticuerpo fue donado gentilmente por el Dr. Juan Ernesto Ludert. Se empleó un anticuerpo secundario contra ratón acoplado al fluoróforo FITC (dilución 1:300). Las inmunotinciones se observaron mediante microscopia confocal (Leica TCS SP2) y se analizaron con el software Fiji.

5.6 Expresión de la proteína E en las CTNs

5.6.1 Transfección

La línea celular ReNcell se transfectó con el vector pcDNA3.1/ProteinE (15 ug de plásmido). Se empleó el protocolo de transfección de la Lipofectamine 3000 (Invitrogen). Las células fueron expuestas durante 6 horas a la lipofectamina a 37°C con un 5% de CO₂, y posteriormente se hizo el cambio de medio. Las células se incubaron por 48 horas, y posteriormente se hizo el análisis por inmunofluorescencia y RT-PCR.

5.6.2 RT-PCR

El ARN total de las células ReNcell se extrajo mediante el protocolo de TRIzol (Invitrogen). El ARN extraído se sometió a un tratamiento con DNAsa a 2 ug (Invitrogen) y posteriormente se empleó para la generación de ADNc mediante una reacción de retrotranscripción (RT) empleando a la enzima M-MLV (Invitrogen Life Technologies). El ADNc se utilizó en una PCR para comprobar la expresión del transcrito de la proteína E utilizando al oligo sentido: 5'-CGGAGATCTAGAAGAGCTGTGAC-3'; y al oligo antisentido: 5'-GGTCATGATACTGCTGATTGCC-3'. El amplicón esperado tiene un peso molecular de 242 pb. Para un control de carga, se hizo una de PCR al gen de actina humana utilizando al oligo sentido: 5'-TGGCACCACACCTTCTACA-3'; y al oligo antisentido: 5'-TCACGCACGATTTCCC-3', generando un amplicón de 373 pb.

5.6.3 Inmunofluorescencia

Las células ReNcell se cultivaron sobre cubreobjetos con poli L-lisina. La poli L-lisina se incubó en los cubreobjetos a 37°C durante 30 minutos. Las células ReNcell se fijaron con PFA al 4% durante 20 minutos. Para analizar la expresión de la proteína E y su localización, un cultivo se permeabilizó durante 10 minutos con Tritón X-100 al 0.2% y otro cultivo se dejó sin permeabilizar. Las células se bloquearon con BSA al 1% durante 1 hora. Como anticuerpo primario se empleó al anticuerpo monoclonal 4G2 de ratón contra la proteína E a una dilución de 1:200 (donado por el Dr. Juan Ernesto Ludert). El anticuerpo se dejó incubar durante toda la noche. Al día siguiente se empleó como anticuerpo secundario a un anticuerpo contra ratón acoplado al fluoróforo FITC (dilución 1:300). Después de la inmunotinción, las células se montaron con DAPI. Las láminas se analizaron por microscopía confocal (Leica TCS SP2) y las imágenes de inmunofluorescencia resultantes se procesaron utilizando al programa Fiji.

6. Resultados

6.1 Análisis de la expresión de los receptores al ZIKV en las células de glioma.

Para determinar si las células de glioma murino de la línea C6 son susceptibles a la infección por el ZIKV, se caracterizó mediante IF indirecta la expresión de los receptores de entrada al ZIKV: Axl, Tyro3 y Tim1. Las IF se realizaron en monocapas (Figura 11) y en gliomaesferas (Figura 12). En el control negativo no se añadió el anticuerpo primario.

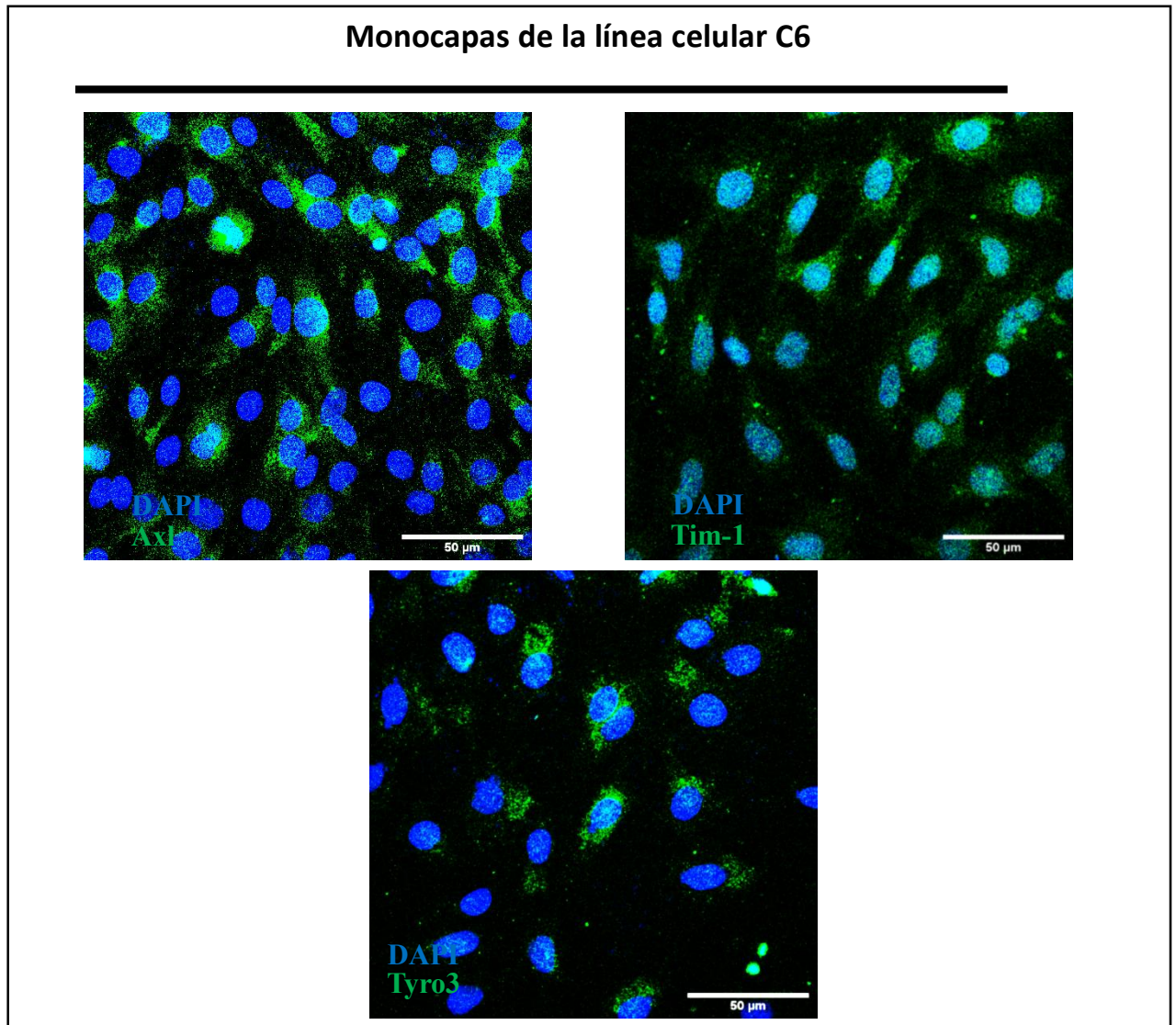


Figura 11. Expresión de los receptores al ZIKV en monocapas de células de glioma

Se analizó mediante IF la expresión de los receptores al ZIKV Axl, Tim-1 y Tyro3 en monocapas de células C6.

Gliomaesferas de la línea celular C6

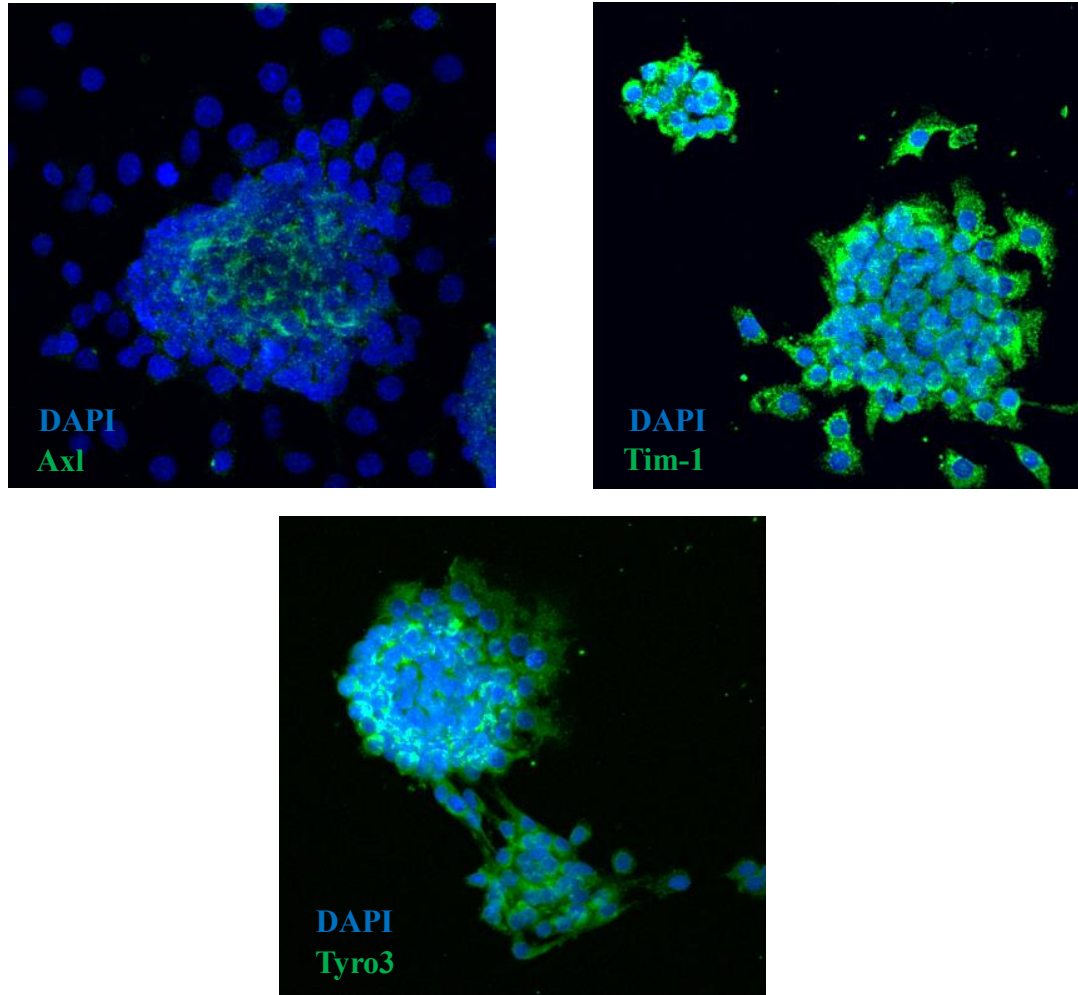
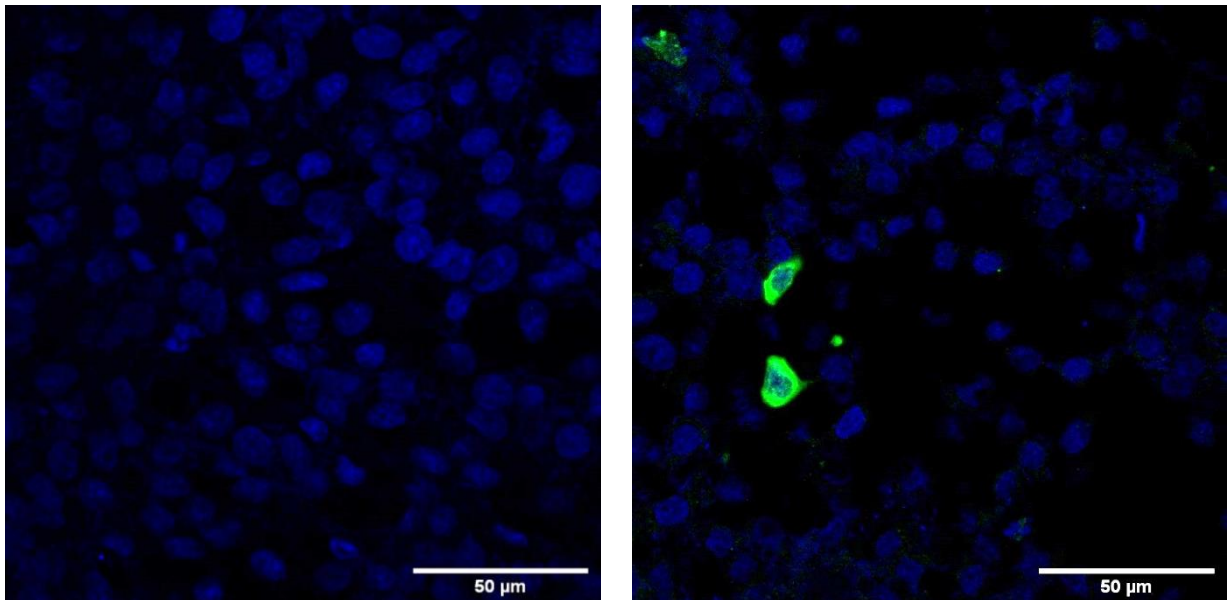


Figura 12. Expresión de los receptores al ZIKV en neuroesferas de células de glioma.

Se analizó mediante IF la expresión de los receptores de entrada al ZIKV Axl, Tim-1 y Tyro3, en gliomaesferas de la línea C6.

6.2 Evaluación de la capacidad infectiva del ZIKV sobre las células de glioma.

Una vez determinada la expresión de los receptores al ZIKV en las células de glioma, se verificó la capacidad infectiva del ZIKV sobre estas células. Las células C6 en monocapa se infectaron con el ZIKV (Figura 13), empleando una MOI de 3. La infección se evaluó por inmunofluorescencia con un anticuerpo contra la proteína no estructural NS3 del ZIKV, para de esta manera garantizar la síntesis *de novo* de las partículas virales.



NS3
MOI: 3
DAPI

Figura 13. El ZIKV infecta a las células C6

El ZIKV infecta pobremente a las células C6 en monocapa. Las células se expusieron durante 6 horas al ZIKV empleándose una MOI de 3. Posteriormente el medio se reemplazó por medio normal y las células se dejaron proliferar durante 48 horas. Por inmunofluorescencia empleando un anticuerpo contra la proteína no estructural NS3 (verde), se detectó a las células infectadas con el ZIKV.

6.3 Clonación de la región que codifica para la proteína E en el genoma del virus del Zika.

Se aisló el genoma viral (ARNv) a partir de las partículas virales del ZIKV y se utilizó para la síntesis de ADNc. Con el oligo sentido: 5'-TACCACCATGATCAGGTGCATAGGAGTCAGC-3', y el oligo antisentido: 5'-ACTCGAGCTAAGCAGAGACGGCTGTGGAT-3' se amplificó el fragmento que codifica a la proteína E en el genoma viral, obteniendo un amplicón de 1531 pb (Figura 14).

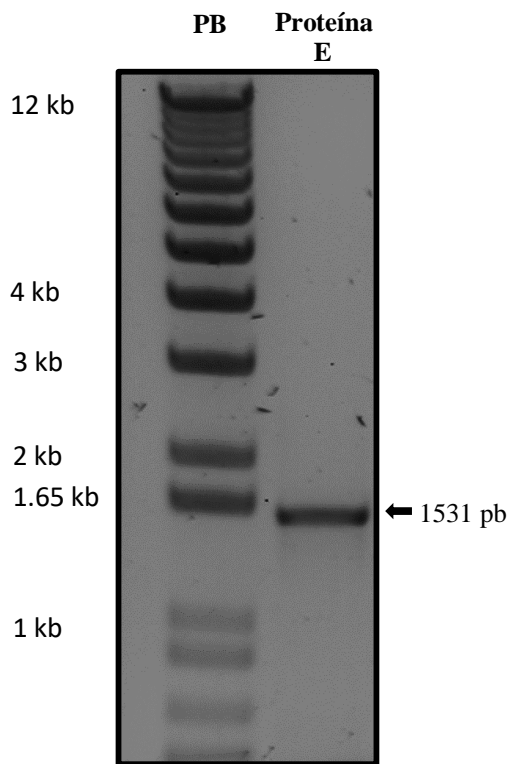


Figura 14. Amplificación del fragmento que codifica a la proteína E del ZIKV.

Utilizando el ADNc del ZIKV y oligos diseñados para flanquear con el fragmento que codifica a la proteína E en el ZIKV se amplificó un producto de 1531 pb.

Una vez amplificada la región que codifica para la proteína E, se clonó en el plásmido pCR4 empleando el kit TOPO-TA (Invitrogen), generando el plásmido de clonación pCR4/ProteinE de 5488 pb (Figura 15).

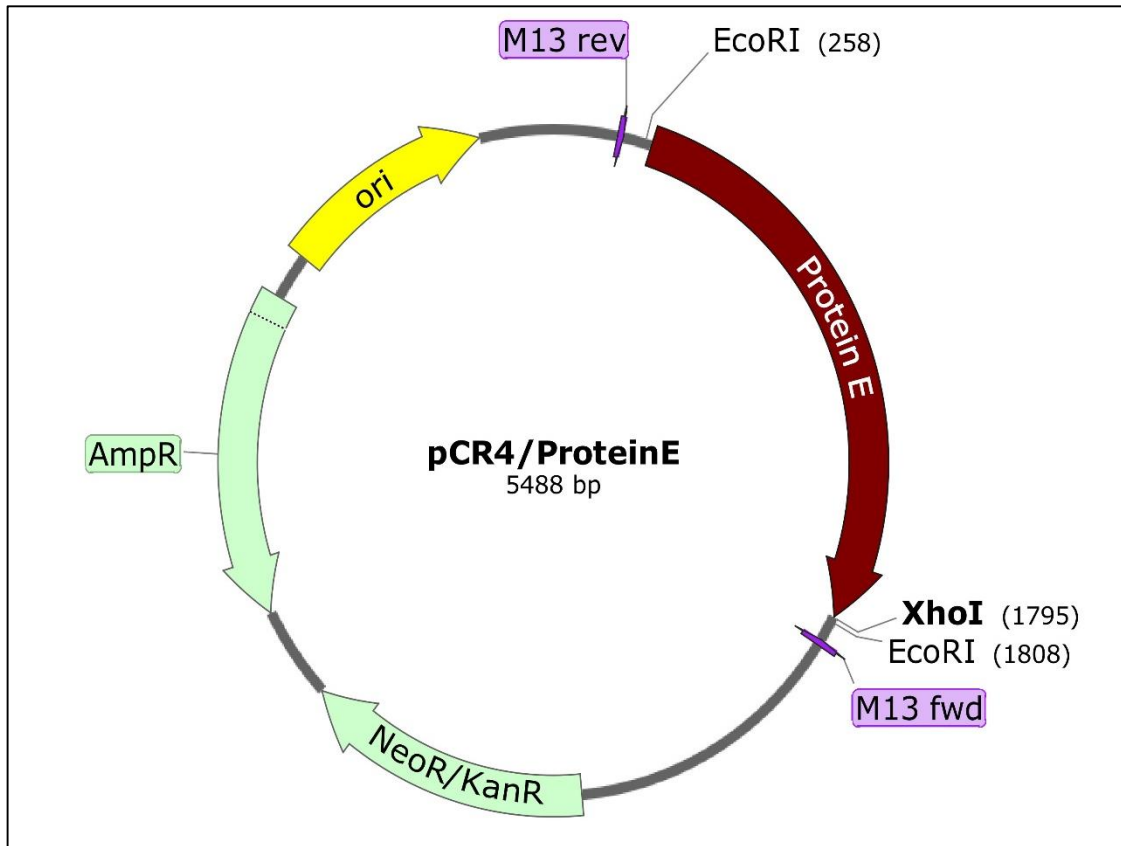


Figura 15. Mapa del plásmido de clonación pCR4/ProteinE.

El fragmento que codifica para la proteína E del ZIKV se clonó en el plásmido pCR4, generando un plásmido de 5488 pb. El inserto del gen que codifica a la proteína E está flanqueado por las enzimas de restricción EcoRI y XhoI. El plásmido tiene un gen de resistencia a ampicilina para su selección en bacterias transformadas (Mapa generado en Snap Gene Viewer).

El plásmido de clonación pCR4 se utilizó para la transformación de bacterias *E. coli* de la cepa DH5- α mediante choque térmico. Las bacterias transformadas crecieron en placas de agar que contenían 1% de ampicilina. De las colonias generadas se seleccionaron algunas y se crecieron en medio LB, este medio fue utilizado para extraer el plásmido pCR4/ProteinE mediante lisis alcalina. Se purificaron plásmidos de cinco colonias diferentes y se corrieron en un gel de agarosa al 1% para verificar la inserción del fragmento que codifica para la proteína E.

De los plásmidos obtenidos en las cinco colonias, se seleccionaron tres que se sometieron a una reacción de restricción utilizando a la enzima de restricción EcoR1 corroborando la liberación de un fragmento de 1515 pb, que coincide con el peso esperado para el fragmento que codifica a la proteína E (Figura 16).

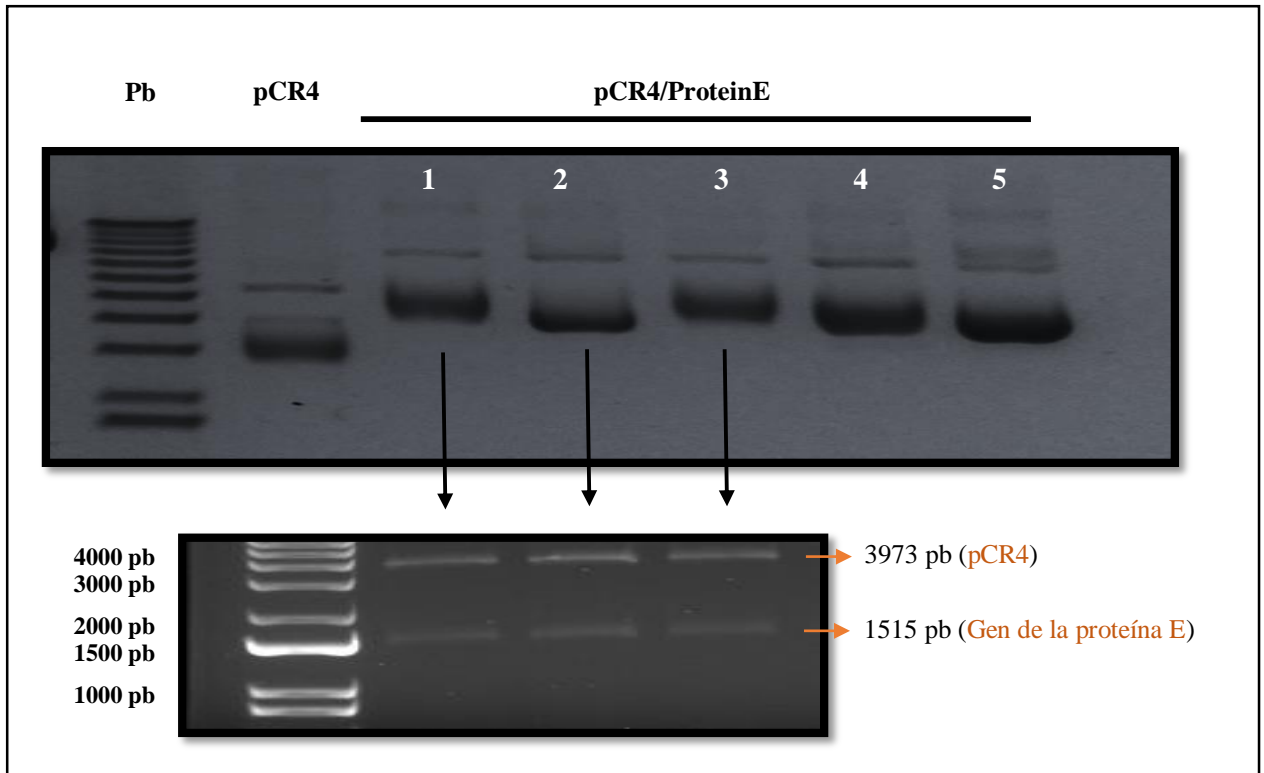


Figura 16. Generación de los plásmidos de clonación pCR4/ProteinE

El plásmido pCR4/ProteinE se utilizó para transformar bacterias *E. coli* DH5- α generándose cinco colonias transformadas, a las cuales mediante lisis alcalina se les extrajo el ADN plasmídico. Tres de estas colonias fueron seleccionadas para verificar la inserción del fragmento que codifica a la proteína E en el plásmido pCR4 mediante una reacción de restricción empleando a la enzima EcoR1. Las bandas obtenidas con un peso de 3973 pb y 1515 pb corresponden al plásmido pCR4 y al inserto de interés respectivamente.

En seguida, se seleccionó una de las clonas transformadas con el vector de clonación y se secuenció para determinar a que cepa de ZIKV corresponde el fragmento que codifica a la proteína E obtenido, encontrándose un 100% de identidad con la cepa de ZIKV mex24 (Figura 17).

Identidad de la región clonada 100%
 Secuencia de referencia: Zika virus isolate ZIKV/Homo sapiens/MEX/2016/mex24 polyprotein gene
 GenBank : MF801402.1

```

MF801402.1|ZIKV/mex24      TTGGCTTTTGGGAAGCTCAACGAGCCAAAAGTCATATACTGGTCATGACTGCTGAT 900   MF801402.1|ZIKV/mex24      ATTGTTGGAGSAAATGTCCTGGTCTCACAAATTCATTTGGAACTTGTCTGATGTGTT 2340
PCR4-Protein E ZIKV      -----0
MF801402.1|ZIKV/mex24      TCCCCGGCATACGATCAGGTGCATAGGAGTCAAGCAATAGGGACTTTGTGGAAAGTAT 960   MF801402.1|ZIKV/mex24      GGGTCTGAACCAAGAATGAACTATTTCCCTTATGTGCTTGGCCTTAGGGGGAGTGT 2400
PCR4-Protein E ZIKV      -----TACCACCATGATCAGGTGCATAGGAGTCAAGCAATAGGGACTTTGTGGAAAGTAT 53   PCR4-Protein E ZIKV      GGGTCTGAACCAAGAATGAACTATTTCCCTTATGTGCTTGGCCTTAGGGGGAGTGT 1487
                               * ** *****
                               Kozak-(Met-ZIKV-Prote)
MF801402.1|ZIKV/mex24      GTCAAGTGGGACTTGGGTTGATGTTGTCTTGGAAACATGGAAGTTGTGACCAGTAAATGGC 1020  MF801402.1|ZIKV/mex24      GATCTTCTTATCCAGACCGTCTCTGCTGATGTGGGGTGCCTGGGACTTCGAAAGAA 2460
PCR4-Protein E ZIKV      GTCAAGTGGGACTTGGGTTGATGTTGTCTTGGAAACATGGAAGTTGTGACCAGTAAATGGC 107  PCR4-Protein E ZIKV      GATCTTCTTATCCAGACCGTCTCTGCTGAGT-----1518
                               *****
                               <ZIKV-Prote-STOP-XhoI
  
```

Figura 17. Secuencia de la región clonada en el genoma del ZIKV

Con un 100% de identidad, la región que codifica para la proteína E aislada del genoma del ZIKV corresponde a la cepa Mex24 del linaje asiático.

6.4 Desarrollo de un vector de expresión para la proteína E en las células de mamífero.

Una vez determinada la secuencia del fragmento que codifica para la proteína E, este se subclonó en el vector de expresión pcDNA3.1 (Figura 18). La nueva construcción se utilizó para transformar mediante choque térmico a bacterias *E. coli* de la cepa DH5- α , obteniéndose tres colonias transformadas. Una de estas colonias se seleccionó para verificar la inserción del fragmento que codifica a la proteína E en el vector de clonación mediante una reacción de restricción empleando a las enzimas BamH1 y Xho1. Se obtuvo una banda con el peso esperado de 1568 pb (Figura 19).

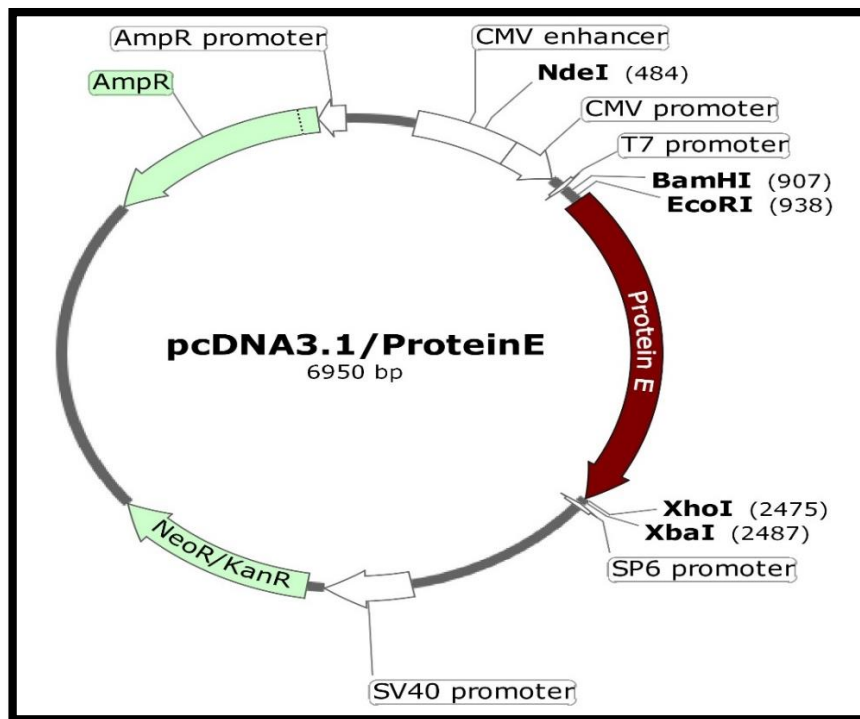


Figura 18. Mapa del vector de clonación pcDNA3.1/PrtoeinE.

El fragmento que codifica para la proteína E del ZIKV se subclonó en el plásmido pcDNA3.1, generando una construcción de 6950 pb. El inserto del gen que codifica a la proteína E está flanqueado por las enzimas de restricción BamH1 y EcoR1 en el extremo 5' y las enzimas Xho1 y Xba1 en el extremo 3' (Mapa generado en Snap Gene Viewer).

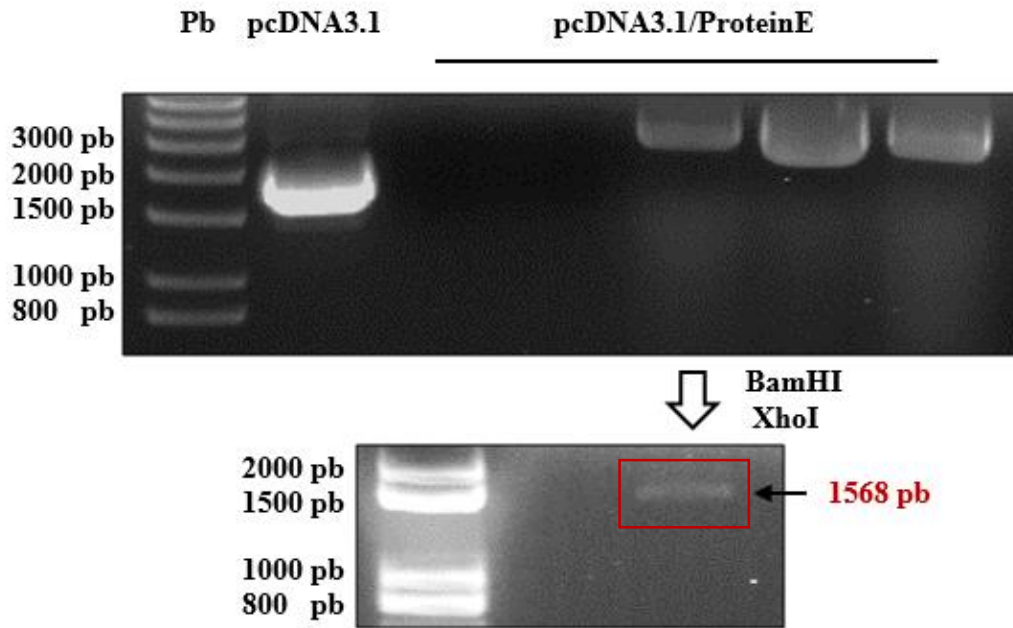


Figura 19. Generación del plásmido de expresión pcDNA3.1/ProteinE

El gen de la proteína E se subclonó en el vector de expresión pcDNA3.1. Este plásmido se empleó para transformar a las cepas de *E. coli* DH5- α . Se transformaron tres colonias bacterianas. Mediante una reacción de restricción con las enzimas BamHI y XhoI se obtiene lo que confirma la inserción del gen de la proteína E en el vector de expresión, una banda de 1615 pb.

6.5 Inducción y evaluación de la expresión de la proteína E en las CTNs.

Se evaluó la expresión de la proteína E en las células troncales neurales de la línea celular ReNcell. Se extrajo el ARN total y se utilizó para sintetizar al ADNc. Mediante PCR se obtuvo un amplicón de 242 pb, que corresponde con el peso esperado del producto (Figura 20).

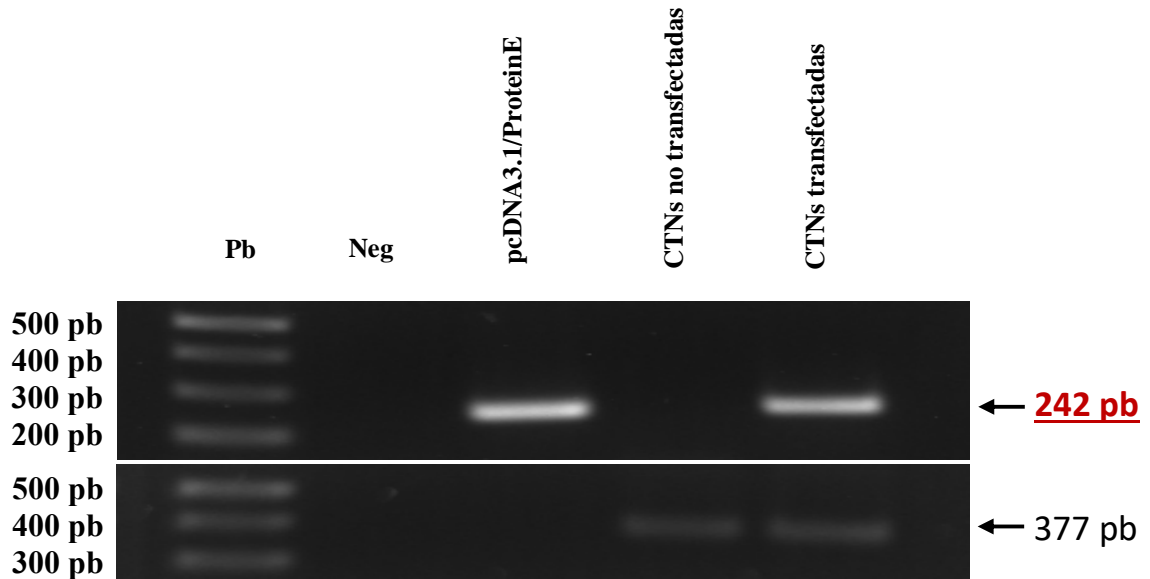


Figura 20. Las CTNs pueden expresar el transcrito que codifica para la proteína E.

RT-PCR de células ReNCell no transfectadas y transfectadas. Se demuestra la generación de un amplicón de 252 pb en estas últimas. Como control negativo se utilizó agua destilada y como control positivo se utilizó al plásmido pcDNA3.1/ProteinE. Como control de carga se muestra el amplicón generado para el gen de actina con un peso de 377 pb.

La expresión de la proteína E en la cara externa de la membrana plasmática en las células ReNcell se evaluó mediante inmunofluorescencia indirecta. Se analizaron a las células transfectadas con el plásmido pcDNA3.1/ProteinE, y a las células no transfectadas usándose como control. Las inmunofluorescencias se realizaron en condiciones permeabilizantes y no permeabilizantes, en presencia y ausencia del detergente Triton X-1000 respectivamente. Por medio de microscopía confocal, se observó un marcaje extracelular lo cual sugiere que la proteína llega a la membrana

plasmática. Cierta fracción de la proteína se queda retenida en un compartimiento intracelular, probablemente en el retículo endoplásmico (Figura 21).

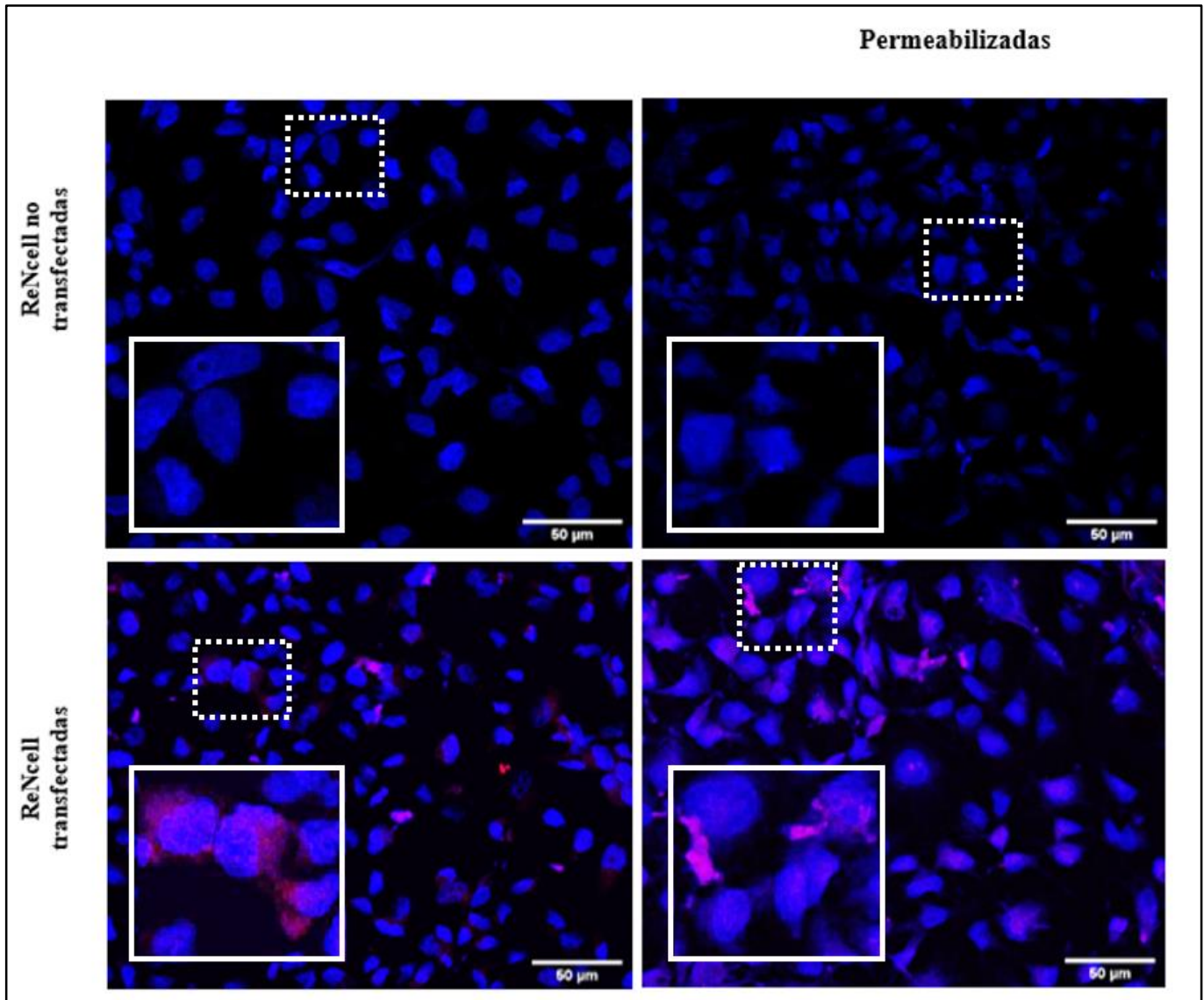


Figura 21. La proteína E llega a la membrana plasmática de las CTNs.

Imágenes de microscopía confocal de las células troncales neurales ReNcell transfectadas con el plásmido pcDNA3.1/ProteinE. Solo las células transfectadas mostraron un marcaje contra la proteína E, resaltándose la expresión de esta proteína en la membrana plasmática (panel inferior izquierdo) y la retención de una fracción de la proteína en un compartimiento intracelular (panel inferior derecho). En rojo se muestra a la proteína E, en azul el marcador nuclear DAPI.

7. Discusión

Dentro de los tumores cerebrales, el glioblastoma es el tumor con el peor pronóstico y el de mayor frecuencia. Los pacientes a los que se les detectan estos tumores suelen tener una esperanza de vida de aproximadamente 15 meses a partir del diagnóstico. A pesar de la agresiva terapia multimodal contra el GBM, la cual consta de quimioterapia, radioterapia y cirugía citoreductora, el pronóstico sigue siendo fatal en todos los casos, lo cual exige la aparición de terapias complementarias (Thakkar et al, 2014).

Hace casi dos décadas se reportó la presencia de una pequeña población de células troncales cancerosas en el GBM. Estas células se consideran las causantes de las recaídas, de la alta resistencia al tratamiento y de la generación de nuevos tumores, sin embargo, aún no se sabe como tratarlas. Estas células denominadas células iniciadoras de glioma, están emparentadas con las CTNs, y se propone a las CTNs como el origen de las células iniciadoras de glioma (Singh et al, 2013; Singh et al, 2014) .

Diversos reportes señalan a las CTNs como un blanco celular para el ZIKV, lo cual se asocia con la aparición de microcefalia en los hijos de mujeres embarazadas infectadas con el ZIKV. A diferencia de otros flavivirus, el ZIKV atraviesa a la barrera placentaria y muestra una muy alta neurovirulencia y un tropismo muy elevado hacia las células troncales y progenitoras del SNC (Li et al, 2016; Nowakowski et al, 2016; Miner y Diamond, 2017). Este tropismo se ha relacionado con la expresión de los receptores de la familia TAM (Tyro3, Axl, Mer) en las CTNs (Sirohi y Kuhn, 2017). Partiendo de la evidencia de que las células iniciadoras de glioma están emparentadas con las CTNs, se ha propuesto al ZIKV como un virus oncolítico en pacientes con glioblastomas, reportándose que el ZIKV infecta preferentemente a las células troncales dentro del tumor en comparación con las células cancerosas ya diferenciadas

(Zhu et al, 2017; Chen et al, 2018). Se postula que la interacción del ZIKV con sus células blanco está mediada por la proteína E.

Además de las terapias con virus oncolíticos, diversos grupos de investigación apuestan a las terapias celulares, usando a determinadas células como vehículos de genes terapéuticos. En nuestro equipo de trabajo, evidenciamos que las CTNs migran a los sitios de lesión tumoral, mostrando un fuerte tropismo hacia las células de glioma (Díaz-Coranguez et al, 2013; López-Ornelas et al, 2014). Este tropismo se debe a diversos factores, tales como el HGF, VEGF y zonulina (Díaz-Coránguez et al, 2013). En nuestro laboratorio implantamos de manera intracranial células de glioma en los cerebros de ratones inmunodeficientes para la generación de tumores cerebrales, y aprovechando la capacidad migratoria de las CTNs, inducimos la liberación de la proteína growth arrest specific 1 (Gas1) cuando estas células llegaban al sitio de lesión tumoral, generando una disminución muy significativa en el volumen del tumor, ocasionando arresto celular y apoptosis en las células de glioma. Sin embargo, se observa que una pequeña fracción del tumor mostró resistencia a esta terapia (López-Ornelas et al, 2014). También hemos observado que la línea celular empleada para generar los gliomas, forma gliomaesferas *in vitro*, y expresa marcadores de troncalidad, lo que sugiere la presencia de células iniciadoras de glioma, las cuales pensamos son las células que presentan resistencia a nuestro tratamiento.

En el presente trabajo, demostramos que las células de glioma expresan a los receptores para el ZIKV, y que se infectan por este virus. Así como lo reportó Zhu en el año 2017, postulamos que el ZIKV por medio de la proteína E reconoce de manera específica a las células iniciadoras de glioma. También encontramos que las expresan a la proteína E del ZIKV. Proponemos que el empleo de estas células modificadas genéticamente puede servir para detectar y tratar a las células iniciadoras de glioma.

8. Conclusión

Las células de glioma murino de la línea C6 expresan de manera diferencial a los receptores al ZIKV: Axl, Tyro3 y Tim1, lo que permite la entrada del ZIKV a estas células.

Las CTNs expresan de manera exógena a la región que codifica para la proteína E en el genoma del ZIKV, tanto a nivel de transcrito, como de proteína. La expresión de esta proteína hace posible que las CTNs puedan reconocer a las células iniciadoras de glioma mediante una interacción ligando receptor. Esto permite proponer las CTNs como vehículos de genes terapéuticos en modelos de reconocimiento de células troncales cancerosas en el SNC.

9. Perspectivas

- Corroborar la expresión en la membrana de la proteína E en las CTNs mediante ensayos de biotilación.
- Realizar un modelo de expresión estable de manera regulable por tetraciclina para la proteína E.
- Evaluar *in vitro* el reconocimiento de las CTNs que expresen a la proteína E sobre las células iniciadoras de glioma.

10. Referencias bibliográficas

Aboudy KS, Brown A, Rainov NG, Bower KA, Liu S, Yang W, Small JE, Herrlinger U, Ourednik V, Black PM, Breakefield XO, Snyder EY, 2000. Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: Evidence from intracranial gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 12846–12851.

Bao, S., Wu, Q., McLendon, R.E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A.B., Dewhirst, M.W., Bigner, D.D., Rich, J.N., 2006. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444, 756e760.

Beier, D., Hau, P., Proescholdt, M., Lohmeier, A., Wischhusen, J., Oefner, P.J., Aigner, L., Brawanski, A., Bogdahn, U., Beier, C.P., 2007. CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res.* 67, 4010e4015.

Das S, Srikanth M, Kessler JA, 2008. Cancer Stem Cells and glioma. *Nature Clinical Practice*. Doi:10.1038/ncpneuro0862.

Dirks, P.B., 2008b. Brain tumour stem cells: the undercurrents of human brain cancer and their relationship to neural stem cells. *Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci.* 363, 139e152.

Friedmann-Morvinski D, Bushong EA, Ke e, Soda Y, Marumoto T, Singer O, Ellisman MH, Verma IM, 2012. Dedifferentiation of Neurons and Astrocytes by Oncogenes Can Induce Gliomas in Mice. *Science*. 2012 Nov 23; 338(6110): 1080–1084.

Goffart N, Kroonen J, Rogister B, 2013. Glioblastoma-Initiating Cells: Relationship with Neural Stem Cells and the Micro-Environment. *Cancers (Basel)*. 2013 Sep; 5(3): 1049–1071.

Gromowski GD, Firestone CY, Whitehead SS, 2015. Genetic determinants of Japanese encephalitis virus vaccine strain SA14-14-2 that govern attenuation of virulence in mice. *J Virol*; 89:6328–37.

Hemmati, H.D., Nakano, I., Lazareff, J.A., Masterman-Smith, M., Geschwind, D.H., Bronner-Fraser, M., Kornblum, H.I., 2003. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 15178e15183.

Kendall SE, Najbauer J, Johnston HF, Metz MZ, Li S, Bowers M, Garcia E, Kim SU, Barish ME, Aboody KS, Glackin CA, 2008. Neural stem cell targeting of glioma is dependent on phosphoinositide 3-kinase signaling. *Stem Cells* 26: 1575–1586.

Díaz-Coránguez M, Segovia J, López-Ornelas A, Puerta-Guardo H, Ludert J, Chávez Bibiana, Meraz-Cruz N, González-Mariscal L, 2013. Transmigration of Neural Stem Cells across the Blood Brain Barrier Induced by Glioma Cells. *PLoS ONE* 8(4): e60655. doi:10.1371/journal.pone.0060655.

Du R, Yin F, Wang M, Hu Z, Wang H, Deng F, 2015. Glycoprotein E of the Japanese encephalitis virus forms virus-like particles and induces syncytia when expressed by a baculovirus. *Journal of General Virology*, 96, 1006–1014. DOI 10.1099/vir.0.000052.

P. Garcez P, Correia Loiola E, Maderio da Costa E, M. Higa Luiza, Trindade P, Delvecchio R, Minardi Nascimento J, Brindeiro R, Tanuri Amilcar, K. Rehen Stevens, 2016. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science* VOL 352 ISSUE 6287 10.1126/science.aaf6116

Lathia, J.D., Gallagher J., Heddleston J.M., Wang J., Eyler C.E., Macswords J., Wu, Q., Vasanji A., McLendon R.E., Hjelmeland A.B., Rich J.N., 2010. Integrin alpha 6 regulates glioblastoma stem cells. *Cell Stem Cell* 6, 421e432.

Libermann, T.A., Nusbaum, H.R., Razon, N., Kris, R., Lax, I., Soreq, H., Whittle, N., Waterfield, M.D., Ullrich, A., Schlessinger, J., 1985. Amplification and overexpression of the EGF receptor gene in primary human glioblastomas. *J Cell Sci Suppl.* 3, 161-172.

Li H, Saucedo-Cuevas L, Regla-Nava JA, Teskikh AV, Shresta S, Glesson JG, 2016. Zika Virus Infects Neural Progenitors in the Adult Mouse Brain and Alters Proliferation. *Cell Stem Cell* 19, 1–6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2016.08.005>.

Liu X, Qu L, Ye X, Yi Ch, Zheng X, Hao M, Wang S, Yao Z, Chen P, Zhang S, Feng Y, Wang Q, Yan Q, Li P, Li H, Li F, Pan W, Niu X, Xu R, Feng L, Chen L, 2018. Incorporation of NS1 and prM/M are important to confer effective protection of adenovirus-vectored Zika virus vaccine carrying E protein. *npj Vaccines* (2018) 3:29 ; doi:10.1038/s41541-018-0072-6.

López-Ornelas A, Vergara P, Segovia J, 2014. Neural stem cells producing an inducible and soluble form of Gas1. *Cytotherapy*, 2014; 0: 1e14.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P, 2007. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol* (2007) 114:97–109.

Louis DN, Perry A, Reifenberger G, Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW, 2016. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* (2016) 131:803–820. DOI 10.1007/s00401-016-1545-1.

Meertens L, Carnec X, Lecoin MP, Ramdasi R, Guivel F, Lew E, Lemke G, Schwartz O, Amara A, 2012. The TIM and TAM families of phosphatidylserine receptors mediate dengue virus entry. *Cell Host Microbe* 2012; 12:544–57.

Meertens L, Labeau A, Dejarnac O, Cipriani S, Sinigaglia L, Bonnet L, Le Carpentelier T, Hafirassou ML, Zamborlini A, Cao-Lormeau VM, Culpier M, Misse D, Jouvenet M, Tabibiazar R, Gressens P, Schwartz O, Amara A, 2017. Axl mediates ZIKA virus entry in human glial cells and modulates innate immune responses. *Cell Rep* 2017; 18:324–33.

Miner JJ, Diamond MS, 2017. Zika virus pathogenesis and tissue tropism. *Cell Host Microbe* 2017; 21:134–42.

Ming GL, Song H, 2011. Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. *Neuron*. 2011 May 26; 70(4): 687–702. doi:10.1016/j.neuron.2011.05.001.

Nowakowski TJ, Pollen AA, Di Lullo E, Sandoval-Espinosa C, Bershteyn M, Kriegstein AR, 2016. Expression analysis highlights AXL as a candidate zika virus entry receptor in neural stem cells. *Cell Stem Cell* 2016; 18:591–6.

Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, (...), 2008. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 2008 sep 26;321(5897):1807-12.

Rao, JS, 2013. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. *Nature reviews. Cancer*, 3(7), pp- 489-501.

Read, T.A., Fogarty, M.P., Markant, S.L., McLendon, R.E., Wei, Z., Ellison, D.W., Febbo, P.G., Wechsler-Reya, R.J., 2009. Identification of CD15 as a marker for tumor-propagating cells in a mouse model of medulloblastoma. *Cancer Cell* 15, 135e147.

Sánchez-Hernández L, Hernández-Soto J, Vergara P, González RO, Segovia J, 2018. Additive effects of the combined expression of soluble forms of GAS1 and PTEN inhibiting glioblastoma growth. *Gene Therapy*. <https://doi.org/10.1038/s41434-018-0020-0>.

Singh, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., Bonn, V.E., Hawkins, C., Squire, J., Dirks, P.B., 2003. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*. 63, 5821e5828.

Sirohi D, Kuhn RJ, 2017. Zika Virus Structure, Maturation and Receptors. *J of Infectious diseases* 2017; 216.

Souza BS, Sampaio G, Pererira CS, Campos GS, Sardi SL, Freitas LA, Figueira CP, Paredes BD, Nonaka CK, Azevedo CM, Rocha VP, Bandeira AC, Méndez-Otero R, Ribeiro dos Santos R, Soares MB, 2016. Zika virus infection induces mitosis abnormalities and apoptotic cell death of human neural progenitor cells. *Nature Scientific Reports* 6:39775. DOI: 10.1038/srep39775

Stiasny K, Heinz FX, 2006. Flavivirus membrane fusion. *Journal of General Virology* (2006), 87, 2755–2766. DOI 10.1099/vir.0.82210-0.

Tang H, Hammack Christy, Ogden S, (...), Jin P, Song H, Ming GL, 2016. Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. *Cell Stem Cell* 18, 587–590. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2016.02.016>.

Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, Ostrom QT, Lightner DD, Barnholtz-Sloan JS, Villano JL, 2014. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014 Oct;23(10):1985-96.

Tran B., Rosenthal M.A., 2010. Survival comparison between glioblastoma multiforme and other incurable cancers. *Journal of Clinical Neuroscience* 17 (2010) 417–421.

Zhu Z, Gorman MJ, McKenzie L, Chai JN, Hubert Ch, Prager BC, Fernandez E, Richner JM, Zhang R, Shan Ch, Tycksen E, Wang X, Shi P-Y, Diamong MS, Rich JN, Chheda MG, 2017. Zika virus has oncolytic activity against glioblastoma stem cells. *J. Exp. Med.* 2017 Vol. 214 No. 10 2843–2857. <https://doi.org/10.1084/jem.20171093>.