

33. Virología Molecular

Virus Zika: Desde la emergencia epidemiológica hacia el entendimiento de los mecanismos de patogénesis viral.

Dizanzo María Paula, Cavatorta Ana Laura, Fabbri Cintia, Leiva Santiago, Levis Silvana, Luppo Victoria, Morales María Alejandra, Marziali Federico, Gardiol Daniela.

dizanzo@ibr-conicet.gov.ar; cintiafabbri@yahoo.com.ar; leiva@ibr-conicet.gov.ar;
victorialuppo@yahoo.com.ar; morales.mariaalejandra@yahoo.com.ar; marziali@ibr-conicet.gov.ar;
cavatorta@ibr-conicet.gov.ar; slevis0@yahoo.com, gardiol@ibr-conicet.gov.ar.

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Universidad Nacional de Rosario

Resumen

La explosiva epidemia del virus Zika (ZIKV) en la región ha sido declarada una emergencia en Salud Pública. Los conocimientos acerca de los mecanismos moleculares de la infección y patogénesis por ZIKV son escasos al momento, y es necesario abordar su estudio.

Los virus son capaces de interferir con las uniones intercelulares y la polaridad como parte de sus mecanismos de patogénesis y las proteínas de polaridad son esenciales para garantizar las barreras para prevenir el paso de los virus. Así, planteamos estudiar qué efecto tiene la infección por ZIKV en la disrupción de tales barreras para que se establezca una infección y el desarrollo de patologías. Iniciamos investigando la potencial alteración de la proteína Disc Large 1 (DLG1) que conforma las uniones adherentes y regula la polaridad. Para ello, optimizamos la infección por ZIKV en células epiteliales. Los resultados obtenidos sugieren que el tiempo óptimo de infección es a las 48 horas. Hemos observado diferencias significativas en la producción viral para distintos aislamientos autóctonos o importados, por lo que podrían tener distintos comportamientos y citopatogénesis que merecen ser investigados. Estudios preliminares por inmunofluorescencia demostraron que la infección por ZIKV produce alteraciones en la expresión de DLG1, siendo la primera evidencia de la modificación de proteínas de polaridad en aislamientos regionales que podría tener implicancia en la diseminación del virus y el desarrollo de enfermedades.

Palabras clave: Virus Zika, polaridad celular, uniones intercelulares.

Introducción

El virus del Zika (ZIKV) es un arbovirus originalmente identificado en Uganda en 1947. Desde el 2007, varios brotes han sido documentados fuera de la región geográfica conocida como normal para el virus. Durante décadas, se pensó que su transmisión a los humanos a través de la picadura del mosquito *Aedes aegypti* causaba un síndrome febril leve y autolimitado. Sin embargo, recientemente ha sido asociado con complicaciones neurológicas tales como el síndrome de Guillain Barre y la microcefalia congénita (Hamel, 2016). Más aún, fueron determinadas otras vías de transmisión más allá del vector *Aedes*, como la vertical y la sexual (Musso D. C., 2015) (Musso D. A., 2016). Debido a la rápida diseminación del ZIKV y la corriente pandemia en América Latina y el Caribe, es ahora considerado como una enfermedad infecciosa emergente.

El ZIKV es un virus con genoma de ARN de simple hebra positiva perteneciente al género flavivirus (FV) de la familia *Flaviviridae*. Análisis filogenéticos y comparaciones genómicas de ZIKV han revelado dos principales linajes: asiático y africano (Hamel, 2016). El asiático es responsable de los recientes brotes. En Argentina, han sido confirmados casos autóctonos e importados.

Estructuras como las uniones intercelulares (UI) y complejos de

polaridad son necesarios para la homeostasis celular y forman una barrera muy importante para evitar el pasaje de los virus. FV neurotrópicos como el West Nile (WNV) y el virus de la encefalitis japonesa (JEV), interfieren con tales componentes celulares con consecuencias importantes en el desarrollo de patologías neuronales (Suen, 2014). Aún más, recientemente se ha demostrado que una proteína del ZIKV es capaz de interactuar con componentes de los complejos que forman las uniones intercelulares, en particular la uniones adherentes (UA), y esto tendría un gran impacto en el desarrollo de malformaciones durante la formación cerebral en mamíferos (Yoon Ki-Jun, 2017).

Por ello, nos propusimos abordar estudios focalizados en potenciales alteraciones de las UI de células que componen una de las principales barreras que el virus debe atravesar para una infección efectiva, como lo es la barrera epitelial. Una proteína muy importante en el control de la polaridad celular y las interacciones célula-célula a nivel de las UA es DLG1 (Roberts, 2012). Esta proteína pertenece a una familia de proteínas de andamiaje molecular conocida como guanilato quinatas de membrana o MAGUK (Roberts, 2012). En células epiteliales, DLG1 colocaliza con E-cadherina en las UA en asociación con el citoesqueleto,

desarrollando funciones estructurales y de transmisión de señales (Reuver SM, 1998).

El presente trabajo se basa en una colaboración inter-institucional entre el laboratorio de virus oncogénicos de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas-UNR/Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario-CONICET y el Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas Julio I. Maiztegui (INEVH)-ANLIS. En este último instituto se han podido aislar distintas cepas de ZIKV a partir de muestras de pacientes con diagnóstico clínico de ZIKV, tanto para casos importados como autóctono de Argentina, las cuales son empleadas en este trabajo.

Objetivos

La infección por el ZIKV se inicia cuando un mosquito inocular el virus enfatizando el rol crítico de los epitelios en su transmisión. El correcto funcionamiento del epitelio como barrera primaria depende de la formación de las uniones intercelulares, así como de la regulación de la polaridad celular que controla la arquitectura de los tejidos. Por este motivo, planteamos el análisis de la posible interferencia de la infección por ZIKV sobre la polaridad celular, específicamente sobre la proteína DLG1, en modelo de líneas epiteliales. Para ello proponemos como objetivos específicos de este trabajo:

- Optimización de la metodología de infección de modo de obtener replicación viral en ausencia de lisis total.
- Comparación de la tasa de replicación viral de distintos aislamientos.
- Evaluación de la morfología de la célula infectada.
- Análisis de la expresión de la proteína de polaridad DLG1 en la célula infectada.

Materiales y Métodos

Cultivo celular y stock virales:

Las células epiteliales de pulmón humano A549 (ATCC, CC-185) utilizadas para los ensayos de infección se cultivaron en DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) suplementado con 10 % v/v de suero fetal bovino (Internegocios S. A.) a 37 °C en atmósfera de 5 % de CO₂.

Los stocks virales provienen de la propagación en las células Vero E6 (ATCC® TL-1460) y los títulos han sido determinados mediante ensayo de recuento de placas de lisis en las mismas células de acuerdo a los procedimientos del INEVH (Webb, et al. 1969). Se usaron dos cepas virales de Zika de genotipo asiático: una importada y otra autóctona de Argentina.

Infección de células

Para la infección se sembraron células A549 en placas de cultivo (150.000 células/placas de 35 mm de diámetro), a las 24 horas se lavaron una vez con PBS (phosphate-buffered saline) y se enfrentaron a las cepas de ZIKV (autóctona o importada) diluidas a la multiplicidad de infección (MOI: número de genomas virales que infecta una célula) deseada. Las células enfrentadas a los virus se incubaron durante 1 hora a 37 °C y se agitaron suavemente cada 15 minutos. Luego, el inóculo se eliminó y las células se lavaron con PBS. Se agregó medio de cultivo y las células se incubaron a 37°C y 5 % de CO₂ por la duración del experimento.

PCR en tiempo real (qPCR):

En cada tiempo ensayado se extrajo el ARN total viral a partir de 150 µl del sobrenadante del cultivo celular utilizando el QIAmp Viral RNA kit (QIAGEN) según indicaciones del fabricante. Todas las RT-PCR se llevaron a cabo con 5 µl de ARN usando OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN),

siguiendo el protocolo del fabricante. Para la PCR en tiempo real se utilizaron dos set específicos de sonda/oligonucleótidos detallados en la Tabla 1 tomados de la literatura (Lanciotti Robert S., 2008).

Evaluación de la morfología celular

La morfología celular se evaluó por observación en microscopio invertido y registro fotográfico en cada condición evaluada con cámara digital para microscopía Nikon.

Inmunofluorescencia:

Para cada tiempo post-infección ensayado, las células se fijaron usando paraformaldehído 4 % durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de dos lavados con PBS las células se permeabilizaron con Tritón X-100 0,1 % en PBS. Luego de dos lavados con PBS se incubaron durante toda la noche con el anticuerpo primario (anti-DLG1 (2D11) Santa Cruz Biotechnology, EE.UU). Luego de dos lavados con PBS las células se incubaron durante 1 hora a 37 °C en cámara húmeda con el anticuerpo

Secuencia sonda (5'-3')	Secuencia primer forward (5'-3')	Secuencia primer reverse (5'-3')
CGGCATACAGCATCAGGTGCAT AGGAG	TTGGTCATGATACTGCTGATTGC	CCTTCCACAAAGTCCCTATTGC
AGCCTACCTTGACAAGCAGTCA GACTCAA	CCGCTGCCCAACACAAG	CCACTAACGTTCTTTTGCAGAC AT

Tabla 1. Secuencias de Oligonucleótidos/Sondas empleadas para la reacción de PCR en tiempo real para ZIKV.

secundario (anti-ratón IgG cy3, Chemicon International, Temecula, CA, USA). Por último se lavaron dos veces con PBS y una vez con agua destilada. La expresión de la proteína fue analizada por un microscopio laser confocal de barrido invertido Zeiss LSM 880 (Zeiss Alemania).

Resultados y Discusión

Optimización de la infección con dos aislamientos regionales del ZIKV en células epiteliales.

Como fue descripto en la sección *Introducción*, el tejido epitelial es a menudo blanco de infecciones virales debido a que forma parte de una de las primeras líneas de defensa del organismo. En este caso, dada la capacidad de los mosquitos para inocular ZIKV en la piel humana durante su alimentación denota claramente la importancia de este tejido en los primeros estadios de la infección. Así, nos resultó de interés estudiar en cultivo *in vitro* de células epiteliales cual es el efecto de la infección con ZIKV sobre una proteína de polaridad, ya que estos tipos de proteínas son fundamentales para la estabilidad y correcto funcionamiento del epitelio.

El análisis propuesto debería efectuarse en las condiciones en que hay replicación viral pero las células no están completamente lisadas o en apoptosis para poder investigar la expresión de las proteínas de interés.

Así, fue necesario optimizar la MOI y las horas post-infección donde efectuar los estudios posteriores. En primer lugar, realizamos cultivos de células A549 y luego de 24 horas llevamos a cabo las infecciones con las cepas autóctonas e importadas del ZIKV a dos MOI: 0,1 y 0,01, como se detalla en *Materiales y Métodos*. A las 0, 24, 48 y 72 horas post-infección, extrajimos ARN viral del sobrenadante de cada una de las condiciones y realizamos ensayos de amplificación para el ARN del ZIKV como se describe en la sección *Materiales y Métodos*. En paralelo, tomamos fotografías de los cultivos celulares para registrar el estado morfológico celular.

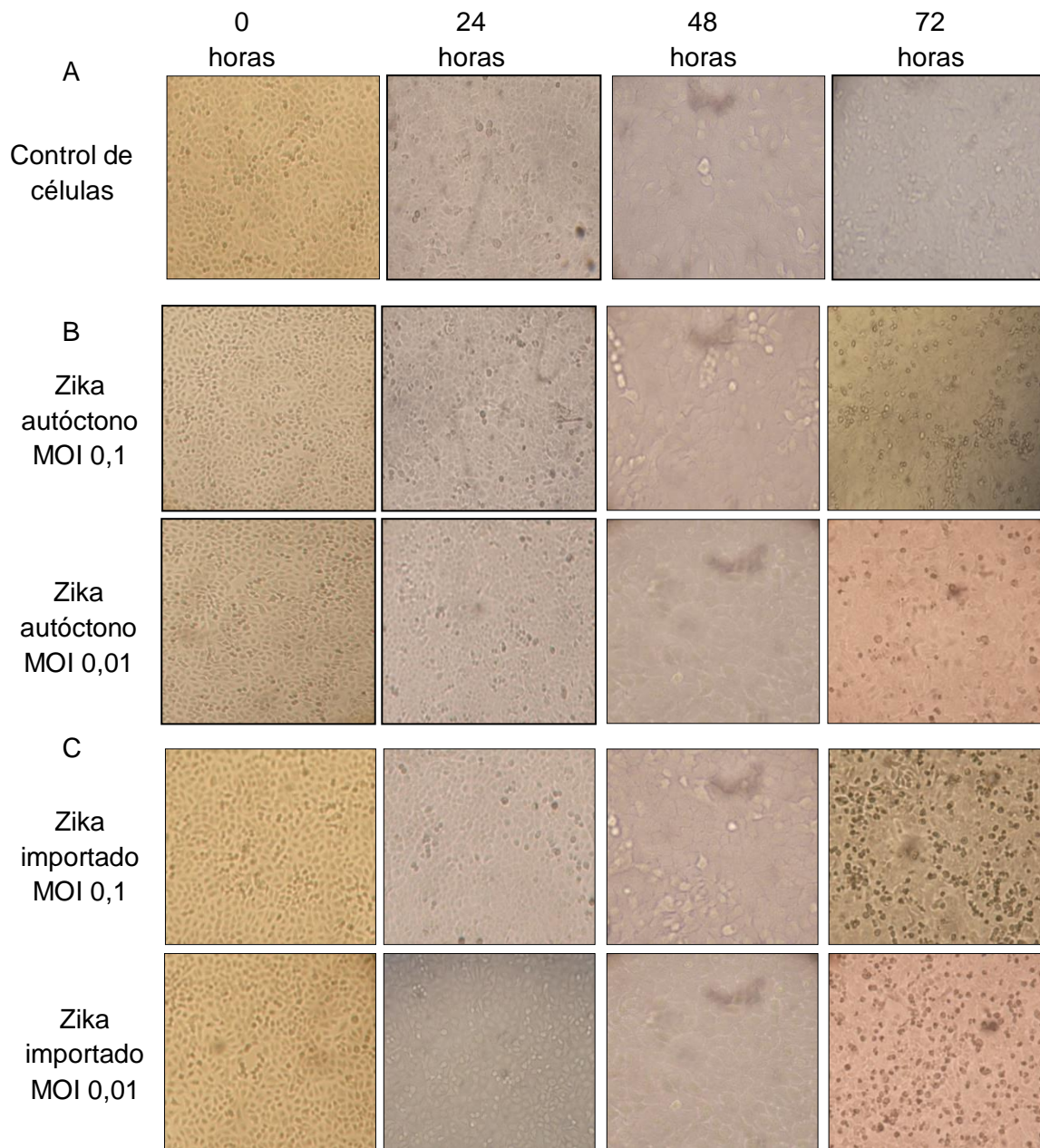


Figura 1. Análisis de la morfología de las células epiteliales infectadas por ZIKV. Imágenes de cultivos sin infectar (control) e infectados con MOI de 0,1 y 0,01 con las distintas cepas del ZIKV a 0, 24, 48 y 72 horas, según se indica. Las imágenes fueron tomadas con una cámara digital para microscopía Nikon. A. Micro-fotografías del cultivo celular control sin infectar a los diferentes tiempos. B. Micro-fotografías del cultivo celular infectado con la cepa proveniente del aislamiento autóctono a diferentes tiempos. C. Micro-fotografías del cultivo celular infectado con la cepa proveniente del aislamiento importado a los diferentes tiempos.

El registro fotográfico de los cultivos (Figura 1) demuestra un claro efecto de la infección sobre la morfología celular, aumentando el daño celular al llegar a las 72 horas post infección (hpi). Este efecto es más marcado para el caso de la cepa importada del ZIKV, comparando la cepa autóctona (Figura 1.B y 1.C). En este sentido, se puede definir para ambas cepas que a 72 hpi no sería adecuado realizar análisis sobre las uniones intercelulares (Figura 1.B y 1.C) ya que se observa un daño celular muy significativo. Además, se observa que al infectar con MOI 0,1 ó 0,01 el daño sobre las células no varía significativamente, indicando que la replicación viral no depende de la cantidad inicial inoculada al menos a los MOI ensayados (Figura 1.B y 1.C).

Los resultados obtenidos de la amplificación del ARN viral por RT-qPCR para las diferentes condiciones se muestran en la Figura 2. Los datos evidencian que comienza a haber replicación viral (tanto para la cepa autóctona como importada) a las 24 horas post-infección. En ambos casos la cantidad de ARN viral presente en el sobrenadante de los cultivos infectados aumenta a medida que aumentan las horas post-infección. Además, en la Figura 2 puede observarse que la disminución de la MOI utilizada no produce diferencias importantes en la cantidad de ARN a lo largo de las horas

ensayadas, lo cual se condice con las observaciones sobre la morfología celular (Figura 1). Sin embargo, de manera muy interesante puede notarse que la cepa de ZIKV importada posee una mayor capacidad de replicarse que el aislamiento autóctono (Figura 2). Para poder dilucidar a que se deben estas diferencias planteamos a futuro realizar la

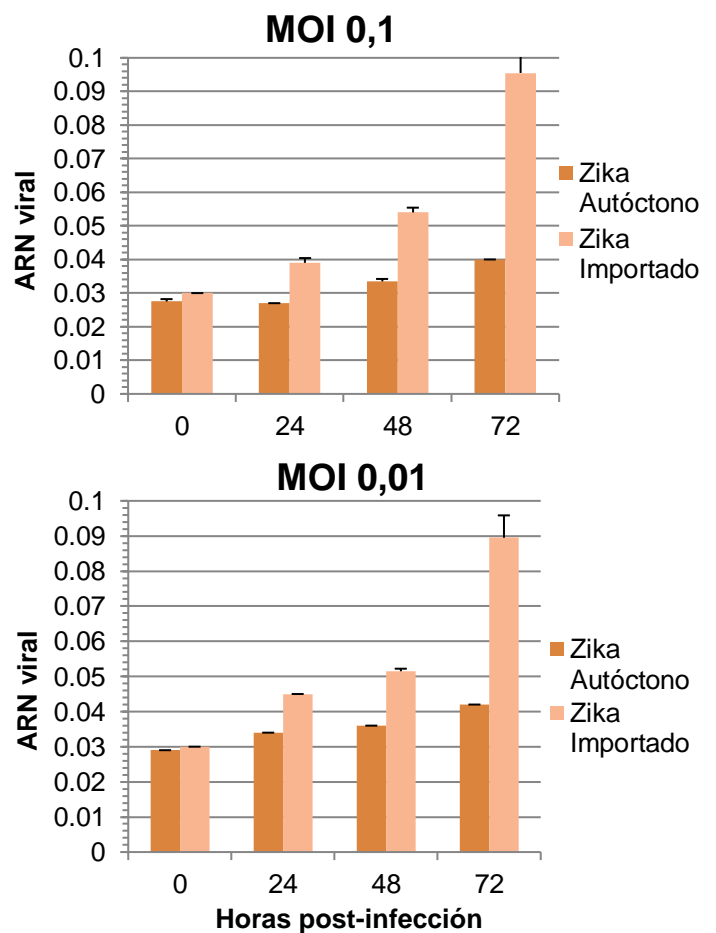


Figura 2. Análisis de la capacidad replicativa de ambas cepas virales (Zika autóctono e importado) ARN viral proveniente de cada condición en función de las horas post-infección. Se muestra a MOI 0,1 y 0,01.

secuenciación de ambas cepas como se discute en las conclusiones.

Estos resultados nos permiten determinar que el tiempo óptimo para los estudios de las proteínas de polaridad celular bajo una infección con ambas cepas de ZIKV utilizadas en este trabajo, es a 48 hpi ya que en esta condición no hay graves efectos sobre la morfología celular (Figura 1.B y 1.C) y hay buena actividad viral (Figura 2).

La infección por ZIKV induce alteraciones en la expresión de DLG1

Como fue mencionado en la sección *Introducción*, DLG1 lleva a cabo funciones importantes en varios procesos biológicos, entre ellos la regulación de la polaridad apico-basal de células epiteliales

(Roberts, 2012). Han sido reportados variaciones importantes en las uniones intercelulares tras la infección con otros flavivirus (Suen, 2014). Debido a esto, nos resultó interesante estudiar si la infección con el ZIKV producía algún cambio sobre su expresión.

En la Figura 3 se muestran los resultados obtenidos de los ensayos de inmunofluorescencia a las 48 hpi con ambas cepas virales. Las micrografías muestran que en las células sin infectar DLG1 localiza en los bordes celulares en las áreas de contacto célula-célula como reportado (Reuver SM, 1998). Sin embargo, la infección por ZIKV induce una deslocalización de DLG1 en infecciones con Zika autóctono e importado a las 48 hpi. Esto podría estar sugiriendo que,

Anti-DLG1

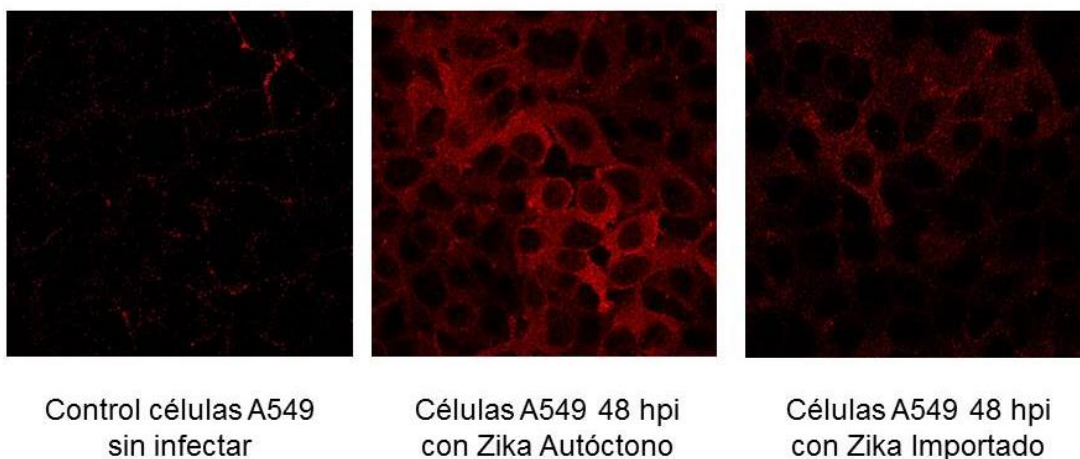


Figura 3. Estudio de la expresión de la proteína de polaridad DLG1 en células epiteliales tras 48 hpi de ZIKV. Imágenes de microscopía de fluorescencia confocal de cultivo de células epitelial A549 a las 48 hpi con cepas de ZIKV provenientes de aislamiento autóctono e importado. Se muestra en rojo la proteína de polaridad DLG1.

como parte de su mecanismo de infección en epitelios, el ZIKV generaría alteraciones sobre las uniones intercelulares que podrían llevar, entre otros efectos, a la desorganización del tejido permitiendo la entrada del virus al organismo.

Conclusiones

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que existen importantes diferencias en las cepas aisladas a partir de un caso autóctono e importado (Figura 1); mostrando éste último una capacidad de replicarse en células epiteliales A549 más eficiente que la cepa autóctona (Figura 2).

La condición de 48 hpi resulta ser, según nuestros análisis, el tiempo óptimo para el estudio de proteínas de polaridad. En esta condición ambas cepas muestran buena replicación y las células aún conservan su morfología (Figura 1 y 2). Por el contrario, a las 72 hpi se observaron importantes tasas de lisis celular, lo cual fue más notorio al infectar con la cepa importada (Figura 1.C).

La diferencia observada es muy llamativa e interesante para seguir investigando las causas moleculares implicadas. Así, estamos actualmente clonando regiones del genoma viral de ambos aislamientos que codifican para proteínas importantes en la replicación del virus con el fin de identificar variaciones genéticas que

puedan explicar estas diferencias. Además, los resultados podrían relacionarse con posibles desigualdades citopatogénicas y quizás patogenicidad en los hospedadores.

Otro dato interesante es que a partir de un análisis preliminar de la expresión de la proteína DLG1 en cultivo de células epiteliales se observan alentadores resultados en cuanto a la alteración de esta proteína. El control de células sin infectar nos permite ver que DLG1 en células A549 se encuentra localizada en los bordes celulares, lo cual coincide con sus funciones en el control de la polaridad celular y la formación de uniones intercelulares, como ha sido reportado (Reuver SM, 1998) (Figura 3). Sin embargo, a las 48 hpi con cepas de ZIKV provenientes de aislamientos regionales se evidencia una deslocalización de DLG1, con un aumento de la misma en el citoplasma celular (Figura 3).

En este sentido, se ha reportado que DLG1 es blanco de varias proteínas viales, entre ellas la proteína E6 de los Papilomavirus Humanos (HPV) de alto riesgo oncogénico asociados al desarrollo de cáncer cervical (Gardiol, 1999). En nuestro grupo de investigación se ha estudiado la carcinogénesis cervical asociada a la infección por HPV de alto riesgo mediante el uso de sistemas de cultivo celular *in vitro* que permiten reproducir la infección en un contexto

fisiológico (cultivos organotípicos *raft*). Observamos una deslocalización celular de DLG1 desde los bordes celulares al citoplasma (Valdano, 2016), aún más, esto coincide con estudios previos utilizando biopsias de pacientes con lesiones precursoras de carcinoma cervical (Cavatorta, 2004). Por lo tanto, podríamos indicar un posible mecanismo de patogénesis viral conservado que involucra la alteración de proteínas de polaridad y de las uniones intercelulares.

Como perspectivas proponemos explorar que sucede con otras proteínas de polaridad importantes en la conformación de las uniones intercelulares como ZO-1 y ocludina, como marcadores de las uniones *tight* y E-caderina para UA. Considerando la capacidad de este virus de provocar complicaciones neurológicas y atravesar barreras como la barrera hematoencefálica y placenta (Miner D. , 2016a) (Miner J. J., 2016b), como otra perspectiva de este trabajo llevaremos a cabo estudios en líneas celulares modelo de trofoblastos (células de placenta) y endoteliales. De esta manera, podremos contribuir a entender la diseminación de ZIKV en el organismo y su relación con las patologías asociadas

La emergencia en el último tiempo de los arbovirus ha representado un gran desafío para la salud pública. La abundancia del mosquito *Aedes* en Latinoamérica sugiere que el ZIKA, por ejemplo, podría

convertirse en una infección endémica en la región; esto sumado a la probable propagación del virus a través de viajeros y nuevas rutas de transmisión, remarca la urgencia de abordar con mayor compromiso estudios sobre el tema. En especial considerando la población con mayor riesgo, como las mujeres embarazadas, dada la transmisión vertical y las malformaciones identificadas en los fetos o neonatos de madres infectadas. La importancia de este tema y sus futuras aplicaciones se pone en evidencia. Así, la información obtenida a partir de estos y nuevos ensayos podría servir de base para desarrollar estrategias útiles en diagnóstico o tratamiento de una infección de alto impacto nacional, regional y mundial.

Bibliografía:

- Beaty, e. a. (1989). In Schmidt, Emmons (eds): Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections. *Arboviruses 6th ed, Am. Public Health Association, Washington, DC, 797-856.*
- Cavatorta, F. (2004). Differential expression of the human homologue of *Drosophila* Disc Large oncossuppressor in histologic samples from Human Papillomavirus-associated lesions as a marker for progression to malignancy. *Int. J. Cancer, 111, 373–380.*

- Daniela Gardiol, C. K. (1999). Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the discs large tumour suppressor for proteasome-mediated degradation. *Oncogene* 18, 5487-5496.
- Hamel, R. F. (2016). Zika virus: epidemiology, clinical features and host-virus interactions. *Microbes Infect*, 18(7-8): 441-449.
- Lanciotti Robert S., e. a. (2008). Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated withan Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerging Infectious Diseases*, 14, 1232-1239.
- Miner, D. (2016a). Understanding How Zika Virus Enters and Infects Neural Target Cells. *Cell Stem Cell*, 18, 589.
- Miner, J. J. (2016b). "Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise.". *Cell*(165), 1081-1091.
- Musso, D. A. (2016). Detection of chikungunya virus in saliva and urine. *American Society for Microbiology.*, 102.
- Musso, D. C. (2015). Detection of Zika virus in saliva. *J Clin Virol* 68, 53-55.
- Reuver SM, G. C. (1998). E-cadherin mediated cell adhesion recruits SAP97 intothe cortical cytoskeleton. *J Cell Sci*, 111 (Pt 8), 1071 -1080.
- Roberts, S. D. (2012). The PDZ prote in discs -large (DLG): the "Jekyll and Hyde" of the epithelial polarit y proteins. *Febs J*, 279, 3549–3558.
- Suen, W. W. (2014). Mechanism of West Nile Virus neuroinvasion: A critical appraisal. *Viruses* 6(7), 2796-2825.
- Valdano, C. M. (2016). Disc large 1 expression is altered by human papillomavirus E6/E7 proteins in organotypic cultures of human keratinocytes. *J Gen Viro*, 96, 453-462.
- Yoon Ki-Jun, G. S. (2017). Zika-Virus-Encoded NS2A disrupts mammalian cortical neurogenesis by degrading adherens junction proteins. *Cell Stem Cell* 21, 1-10.
- Agradecimientos.** María Paula Dizanzo es Becaria Doctoral de CONICET.
- Financiamiento** Subsidio PICT 2016-1725. *Virus Zika: desde la emergencia epidemiológica hacia el entendimiento de los mecanismos de patogenesis viral.*
- Investigador Responsable: Dra. Daniela Gardiol.**
- Subsidio UIVERSIDAD NACIONAL DE ROSTIO. BIO 519.
- Investigador Responsable: Dra. Daniela Gardiol.**