

UNIVERSIDAD DEL VALLE



ASPIRANTE A TÍTULO DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS:
NATALIA ARAGÓN VÉLEZ

TITULO DEL PROYECTO

“Infección congénita por virus del Zika perspectiva básica y clínica: efectos en el desarrollo craneofacial de niños del Valle del Cauca 2019-2021”

Santiago de Cali, Enero de 2023

UNIVERSIDAD DEL VALLE



ASPIRANTE A TÍTULO DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS:
NATALIA ARAGÓN VÉLEZ

TÍTULO DEL PROYECTO

“Infección congénita por virus del Zika perspectiva básica y clínica: efectos en el desarrollo craneofacial de niños del Valle del Cauca 2019-2021”

Director: Dr. Adolfo Contreras Rengifo

Co director: Dra. Beatriz Parra Patiño

Doctorado en Ciencias Biomédicas

Escuela de Ciencias Básicas

Facultad de Salud

Santiago de Cali, Enero de 2023



UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD - ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS
POSTGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS DOCTORAL
PROGRAMA ACADÉMICO DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS (9695)

Jurado calificador conformado por los doctores:

1. Prof. Javier Enrique Botero Torres.
2. Prof. Julio César Osorio Patiño.
3. Prof. Roger Mauricio Arce Muñoz.
4. Prof. Wilmar Saldarriaga Gil.

El día lunes 30 de enero/2023 a las 11:00 a.m. se lleva a cabo la Sustentación de la Tesis Doctoral presentada por la estudiante del Doctorado en Ciencias Biomédicas (9695): NATALIA ARAGÓN VÉLEZ – Código Estudiantil 201802413.

Título de la Tesis Doctoral: *Infección congénita por virus del Zika perspectiva básica y clínica: efectos en el desarrollo craneofacial de niños del Valle del Cauca 2019-2021.* Dirigida por Prof. Adolfo Contreras Rengifo (Director) y Prof. Beatriz Parra Patiño (Co-directora).

Prof. ADOLFO CONTRERAS RENGIFO
Director tesis doctoral

Prof. BEATRIZ PARRA PATIÑO
Codirectora tesis doctoral

De acuerdo con los resultados anteriores se determina que la sustentación de la Tesis Doctoral presentada por el estudiante es:

☒ Aprobada () Meritoria () Laureada () Reprobada

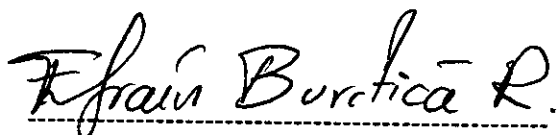
En caso de ser reprobada el estudiante debe acoger las recomendaciones del jurado y presentar nuevamente el documento ante el director del trabajo de grado.

() Requiere () No requiere nueva sustentación.

El plazo para la nueva sustentación y/o para presentación del documento final es de:

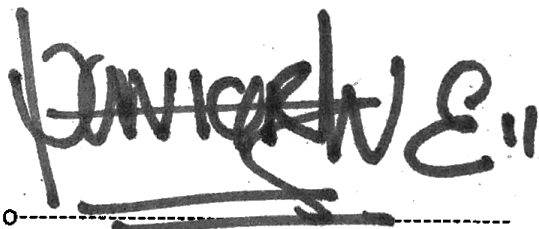
Otros comentarios:

El documento requiere una revisión juiciosa que debe ser revisada y aprobada por los tutores.



Prof. **EFRAÍN BURITICÁ RAMÍREZ**

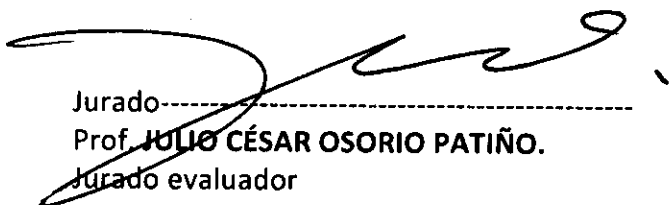
Director del Postgrado en Ciencias Biomédicas.



Jurado-----

Prof. **JAVIER ENRIQUE BOTERO TORRES.**

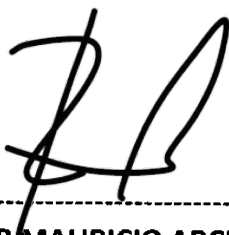
Jurado evaluador (conexión virtual)



Jurado-----

Prof. **JULIO CÉSAR OSORIO PATIÑO.**

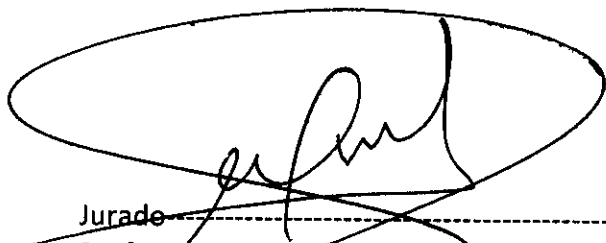
Jurado evaluador



Jurado-----

Prof. **ROGER MAURICIO ARCE MUÑOZ.**

Jurado evaluador (conexión virtual)



Jurado-----

Prof. **WILMAR SALDARRIAGA GIL.**

Jurado evaluador (conexión virtual)

DEDICATORIA

Esta Tesis Doctoral se lo ofrezco a Dios y a mi hija Salomé por quien hago todo en la vida, ellos son mi principal motor y les doy todo lo que soy.

A mis padres y a mis hermanos por su amor e incondicional apoyo en este proceso. Siempre he estado inspirada en sus vidas profesionales para seguir muy orgullosa de ser parte de esta familia.

Al Negrito, mi amigo, mi compañero coequipero en todo por su paciencia y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores, que yo se que Dios me los puso como el equipo perfecto en el momento perfecto, para enfrentar todos los retos durante todo el proceso formativo doctoral, fueron incondicionales, complementarios y muy profesionales durante el proceso; a ellos toda mi admiración y cariño.

A todas las personas que a lo largo de mi vida han sido mi inspiración y motivación para decidir hacer este doctorado y sacarlo adelante.

A todos los que no alcanzo a mencionar y que de alguna manera me tuvieron en sus oraciones y de diferentes formas hicieron posible para yo poder hacer todo lo necesario durante el camino para llegar a esta meta.

A mi Universidad del Valle (CI 1879-Financiación parcial), mi alma mater que me ha dado mucho en la vida y le seguiré siempre retribuyendo con mi trabajo y mis principios en gratitud.

Al Proyecto NEAS-NIH (Grant Fogarty NIH # R01 NS110122-01A1) por la financiación alterna para posibilitar el desarrollo de muchos de los experimentos.

A Catalina Diaz Restrepo y al profesor Alejandro Rodríguez Campos que me acompañaron en la ejecución satisfactoria del estudio clínico.

A Nelson Rivera y Diana López por el apoyo en todo el análisis bioinformático del transcriptoma.

Al personal de apoyo del Laboratorio Liliana Soto, Laura Quintero, Melisa Solarte y Erika Aristizábal.

Al Centro de Estudios de Infectología Pediátrica CEIP, por el apoyo para viabilizar el trabajo clínico. Especialmente al Dr. Eduardo López.

A los pacientes y sus familias por permitir realizar esta investigación y a la Escuela de Odontología por el apoyo continuo.

CONTENIDO

	Página
1. Resumen y palabras clave del Proyecto	1
2. Capitulo I: Introducción	4
3. Capítulo II: Infección congénita por virus del Zika: efecto en el desarrollo craneofacial en niños entre 3-5años	
3.1 Introducción	24
3.2 Metodología	42
3.3 Consideraciones éticas	49
3.4 Resultados y Discusión	50
3.5 Registro fotográfico	58
3.6 Conclusiones	58
3.7 Recomendaciones y limitaciones	59
3.8 Bibliografía	60
4. Capitulo III: Desarrollo de un modelo de infección de ZIKV en células embrionarias Pluripotenciales diferenciadas a linajes de neuroectodermo.	
4.1 Introducción	67
4.2 Metodología	76
4.3 Resultados y Discusión	79
4.4 Conclusiones	88
4.5 Recomendaciones y limitaciones	89
4.6 Bibliografía	89

5. Capítulo IV: Perfil transcripcional inducido por la infección del Virus Zika en células embrionarias NT-2: acercando la clínica de la infección congénita del Virus Zika con las ciencias Básicas.	
5.1 Introducción	95
5.2 Metodología	98
5.3 Resultados y Discusión	103
5.4 Conclusiones	117
5.5 Recomendaciones y limitaciones	117
5.6 Bibliografía	118
6. Anexos:	
6.1 Bibliografía adicional	126
6.2 Instrumento de recolección de datos	126
6.3 Aval del Comité de Ética	127
6.4 Artículo publicado Cleft Palate Journal 2021	128
6.5 Artículo Sometido Clinical Oral Investigations (en revisión)	129
6.6 Ponencias Nacionales	129
6.7 Premio Nacional	132
6.8 Ponencias Internacionales	133
6.9 Participación como revisora en una comunicación de la OMS	134
7. Material Suplementario	135

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura I-1. Expansión del ZIKV según los diferentes linajes en las diferentes regiones del mundo.

Figura I-2. Esquema espaciotemporal de identificación de brotes en las diferentes regiones del mundo, ZIKV.

Figura I-3. Morbilidad mundial del ZIKV durante períodos epidémicos.

Figura I-4. Distribución de casos de Zika según ciudad de procedencia. Colombia, INS 2017.

Figura I-5. Distribución de casos de Zika. Colombia, semanas epidemiológicas 01-52, 2017.

CAPÍTULO II

Figura II-1. Clasificación según el índice longitud y anchura cefálica (%): relación longitud y anchura expresada en porcentaje.

Figura II-2. Índice morfológico facial (%).

Figura II-3. Referencias anatómicas para medidas proporcionales de la cara.

Figura II-4. Referencias anatómicas para medidas proporcionales de la parte inferior de la cara.

Figura II-5. Perfil facial según el acople labial (45): (A) Escalón positivo, (B) Perfil labial normal y (C) Escalón labial negativo.

Figura II-6. Malformaciones corticales y alteraciones genéticas.

Figura II-7. Tipos de diagnóstico de microcefalia según su etiología.

Figura II-8. A. Distribución de los niños con Zika congénito y casos sanos según grupo y sexo. B. Procedencia de los casos de Zika congénito según sexo.

CAPÍTULO III

Figura III-1. Esquema de señalización genética de células de la Cresta Neural durante etapas premigratoria y migratoria.

Figura III-1. Esquema de señalización genética de células de la Cresta Neural durante etapas premigratoria y migratoria.

Figura III-3. Microscopia óptica del progreso del cultivo y diferenciación de las células NT-2 con AR.

Figura III-4. Caracterización de la población neuronal de NT-2 (NT-2N) diferenciada con AR.

Figura III-5. Carga viral del ZIKV en los tres grupos de cultivos de comparación NZ (A), NRAZ (B) y NZRA(C) determinada por los valores Ct (Cycle threshold).

Figura III-6. Caracterización de la infección con ZIKV en células NT-2 pluripotenciales y diferenciadas a linajes neurales y neuronas con AR.

Figura III-7. Caracterización de la infección con ZIKV en células NT-2 diferenciadas a linajes neurales y neuronas con AR.

Figura III-8. Modelo de la infección ZIKV en células madre embrionarias pluripotenciales (NT-2) y linaje neural y no neural.

CAPÍTULO IV

Figura IV-1. Análisis bibliométrico de publicaciones en línea de tiempo con búsquedas “Zika AND transcriptome OR transcriptomics”.

Figura IV-2. Principales vías afectadas según el transcriptoma de células primarias de retina infectadas con ZIKV

Figura IV-3. Flujograma de trabajo para cultivo, diferenciación, infección y extracción de RNA para ensayo de RNA-seq.

Figura IV-4. Fases del ensayo RNA-seq en el modelo de infección con ZIKV de células NT-2 embrionarias pluripotenciales y de linaje neural.

Figura IV-5. Path-line: plan de análisis de transcriptoma de muestras del modelo de infección con ZIKV de células NT-2 embrionarias pluripotenciales y de linaje neural.

Figura IV-6. Normalización de conteos en las diferentes categorías de comparación. A. Distribución de conteos crudos y B. Conteos normalizados con VST.

Figura IV-7. Análisis de Componentes principales (PCA), en células NT-2 según su diferenciación e infección con ZIKV.

Figura IV-8. Análisis funcional de la estimulación de las NT-2 con AR.

Figura IV-9. Diagrama de Venn. Número neto de genes que tuvieron valores de LogFold Change significativo para cada grupo de réplicas.

FIGURA IV-10. Volcano Plot (Azul= infraexpresión - Rojo= sobreexpresión). Genes con mayor expresión diferencial en las células indiferenciadas infectadas (NZ-N) (A). Genes con mayor expresión diferencial en las células diferenciadas infectadas (NRAZ-NRA) (B).

FIGURA IV-11. A. Enriquecimiento de genes relacionado con procesos moleculares de gene ontology (GO MF). B. Enriquecimiento de genes en el repositorio de variables en expresión génica clínica ClinVar. C. Enriquecimiento de genes relacionados con procesos biológicos en la base de datos Gene Ontology (GO BP).

Figura IV-12. A. Enriquecimiento de genes relacionado con procesos reportados en el repositorio Wikki pathways (WP). B. Enriquecimiento de genes en el repositorio de expresión biológica y clínica KEGG. C. Enriquecimiento de genes relacionado con procesos moleculares de Gene Ontology (GO MF). D. Enriquecimiento de genes relacionados con procesos biológicos en la base de datos Gene Ontology (GO BP).

Figura IV-13. Asociación patológica del SCZ y perfil de expresión genética obtenido en el análisis de transcriptoma de células embriológicas pluripotenciales y diferenciadas al linaje neural.

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO I

Tabla I-1. Factores que facilitan la interacción de ZIKV con las células huésped.

Tabla I-2. Genes relacionados con el desarrollo craneofacial.

Tabla I-3. Arcos faciales y estructuras a las que dan origen.

CAPÍTULO II

Tabla II-1. Genes relacionados con microcefalia Primaria

Tabla II-2. Anomalías asociadas a patógenos neurotrópicos asociados a síndrome congénito y microcefalia.

Tabla II-3. Definición Operacional de las variables

Tabla II-4. Características sociodemográficas maternas y gestacionales en niños con y sin infección congénita por ZIKV del período epidémico 2015-2017.

Tabla II-5. Características craneofaciales en niños con y sin infección congénita por ZIKV del período epidémico 2015-2017.

Tabla II-6. Características dentales y oclusales en niños con y sin infección congénita por ZIKV del período epidémico 2015-2017.

Tabla II-7. Características dentales y hábitos en niños con y sin infección congénita por ZIKV del período epidémico 2015-2017.

Tabla II-8. Características miofuncionales en niños con y sin infección congénita por ZIKV del período epidémico 2015-2017.

CAPÍTULO III

Tabla III-1. Marcadores en células NT-2 según su fenotipo de diferenciación.

Tabla III-2. Marcadores genéticos de linajes celulares característicos del neuroectodermo embrionario y de neurogénesis, en las células madre embrionarias pluripotenciales NT-2 (N) o diferenciadas con AR (NRA) e infectadas con ZIKV respectivamente (NZ y NRAZ).

CAPÍTULO IV

Tabla IV-1. Principales genes afectados y su relación clínica con el SCZ, según el transcriptoma de células hNPCs infectadas con ZIKV.

Tabla IV-2. Requerimientos Novogene corp® para el análisis de muestras de ARN por secuenciación masiva (idioma original).

Tabla IV-3. Muestras de RNA de cultivo y convenciones para las categorías de análisis.

Tabla IV-4. Comparación de genes netos expresados diferencialmente ($p < 0,05$) en las células NT-2 infectadas con el ZIKV según la diferenciación e infección.

Tabla IV-5. Genes con mayor magnitud de cambio de expresión tras la infección con ZIKV en NT-2 indiferenciadas (NZ) y diferenciadas (NRAZ).

Tabla IV-6. Conteos y comparación de la expresión génica de familias de genes relacionados con neurogénesis y desarrollo craneofacial.

ÍNDICE DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

ZIKV: Virus Zika (convención internacional).
SCZ: Síndrome Congénito por Virus Zika.
SNC: Sistema nervioso central.
TORCH: Toxoplasma, Rubeola, Citomegalovirus.
OMS: Organización Mundial de la Salud.
CCN: Células de la cresta neural.
CN: Cresta Neural
CMV: Citomegalovirus.
DENV: Virus Dengue.
INS: Instituto Nacional de Salud.
SIVIGILA: Sistema de vigilancia epidemiológica del INS.
MR766: Cepa de ZIKV de Micronesia aislada en el 2007.
H1PF12013: Cepa de ZIKV de Polinesia francesa aislada en el 2013.
SPH2015: Cepa de ZIKV de Brasil aislada en el 2015.
ADN: Ácido desoxirribonucleico
ARN: Ácido ribonucleico.
NS: proteína no estructural.
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
IgG: Inmunoglobulina G
IgM: Inmunoglobulina M
TUJ1-TUBB3: beta tubulina III, proteína intracelular de diferenciación neuronal temprana.
NESTIN: Proteína intracelular Nestina, marcador de inmadurez neuronal.
AR: Ácido Retinoico
WNT: familia de genes que regulan la diferenciación de las células de la cresta neural.
BMP: proteínas morfogénicas del hueso.
CIREH: Comité Institucional de Revisión ética animal y en humanos de la Universidad del Valle.
VIREM: Grupo de investigación en virus y enfermedades emergentes.
GMP: Grupo de Medicina Periodontal
LogFCH: LogFold-Change
DEG: Differential expression gene

TÍTULO

“Infección congénita por virus del Zika perspectiva básica y clínica: efectos en el desarrollo craneofacial y dental de algunos niños en el Valle del Cauca 2019-2021”

1. RESÚMEN:

Introducción: El virus del Zika (**ZIKV**) fue declarado pandemia pública por la OMS en febrero de 2016, luego de demostrar su neurotoxicidad. Durante los brotes de infección reciente en Brasil, Colombia y en las Américas - 2015, fue posible relacionar el ZIKV con graves consecuencias para la salud como fueron, la microcefalia, el síndrome congénito del Zika (**SCZ**) en los niños y el síndrome de Guillain-Barré, en adultos. En Colombia durante el periodo epidémico, el Valle del Cauca y Huila fueron los departamentos que mas reportaron casos de infección congénita por el ZIKV.

Se han identificado como signos y síntomas asociados al SCZ: bajo peso al nacer, neurodesarrollo deficiente que afecta la locomoción e independencia de los niños, alteraciones oculares, alteraciones en el lenguaje, retardo en el aprendizaje, disminución de la audición, epilepsia, disfagia, y calcificaciones cerebrales, entre otras. Teniendo en cuenta que los dientes y el tejido ecto-mesénquimal (esquelético, odontogénico, cartilaginoso y tejido conectivo) se originan también de células derivadas de la cresta neural, y que ellas son potencialmente susceptibles a la infección por ZIKV, se presume que los componentes del sistema estomatognático también están afectados. Sin embargo, se ha documentado mucho mejor el impacto en los tejidos derivados del Sistema Nervioso Central (**SNC**), y es muy escasa la información sobre los efectos del ZIKV en tejidos los derivados del ecto-mesénquima, así como de las consecuencias y los posibles efectos en los tejidos craneofaciales que se componen de tejido conectivo, huesos y dientes. Algunos estudios reportan alteraciones en el desarrollo de la oclusión y dentición., tales como el retraso en la erupción del primer diente temporal, hipoplasia del esmalte, anquiloglosia, diferencias en la anatomía del paladar, anomalías dentales de forma, número y cronología de la erupción. La presencia de mayor tasa de salivación, irritabilidad y mayores diastemas, también han sido descritos en niños con el SCZ. Por lo tanto, es crucial continuar expandiendo el conocimiento en el área para describir completamente, y así poder prevenir, las consecuencias deletéreas en el desarrollo craneofacial del SCZ.

Nos planteamos la siguiente pregunta de investigación: *¿cuáles son los efectos en el desarrollo craneofacial y dental en niños que fueron expuestos neonatalmente a ZIKV en el Valle del Cauca y podría el perfil de la transcriptómica de la infección ZIKV en un modelo in vitro de células embrionarias pluripotenciales dar nuevos indicios de los genes y vías moleculares implicados en los defectos craneofaciales del SCZ?*

Objetivo: Determinar los efectos de la infección congénita por el ZIKV sobre el desarrollo dental y craneofacial, desde una perspectiva básica y clínica.

Materiales y métodos: Para cumplir el objetivo se desarrollaron cuatro fases de estudio, desde la revisión de literatura (**Capítulo I**), un análisis exploratorio de casos con SCZ y un grupo de controles sanos, apareados por edad (**Capítulo II**), un modelo *in vitro* de infección con ZKV en células carcinoembrionarias pluripotenciales (**Capítulo III**) y finalmente un análisis comprensivo de genes y vías moleculares afectados en las células pluripotenciales embrionarias y las diferenciadas a linaje neural del modelo *in vitro* y su relación con fenotipos craneofaciales del SCZ (**Capítulo IV**)

En el estudio clínico odontológico se evaluaron 14 niños con infección congénita por ZIKV, expuestos durante la epidemia en Colombia (septiembre de 2015-Julio 2016) comparándolos con el desarrollo craneofacial en un grupo de 12 niños sanos con edad similar sin evidencia clínica y/o serológica de exposición al ZIKV durante su gestación. Se realizó una evaluación del desarrollo craneofacial con parámetros y medidas antropométricas extraorales, examen intraoral de tejidos duros y blandos. Además de los datos clínicos, se utilizaron como apoyo diagnóstico modelos dentales y fotografías estandarizadas. Todas las medidas se tomaron en los dos grupos para comparar las variables de estudio con las de los niños de la misma edad y procedencia. La información se consolidó en una base de datos de Excel y se realizó un análisis uni y bivariado con tablas de frecuencia y medidas estadísticas de acuerdo a la normalidad de los datos, con el software STATA 15®. Se desarrolló un modelo *in vitro* de infección por ZIKV con células carcinoembrionarias pluripotenciales NTERA2 (NT-2) con el fin de evaluar el tropismo viral en las células precursoras y en su progenie celular diferenciada por la vía del ácido retinoico (**AR**) a perfiles neural/mesenquimal y neuronas maduras. La infección se evaluó por el patrón de positividad viral en células neuronales y no neuronales, mediante tinción de inmunofluorescencia con anticuerpos específicos al ZIKV (anti-NS2B y E) y para un marcador específico de neuronas (Tubulin beta3 clase III). Posteriormente se realizó un análisis de RNAseq, de las infecciones que consistió primero en la optimización de un protocolo de purificación del RNA con los mejores estándares de calidad para estudios de transcriptómica. La secuenciación se contrató por encargo comercial (NOVOGEN®, USA) y el plan de análisis bioinformático fue desarrollado y ejecutado por la autora y el equipo asesor experto. Se estimó el cambio en la expresión génica (Log2FoldChange) de los grupos de cultivos infectados Vs los no infectados (NZ Vs N) y de los grupos diferenciados e infectados Vs los diferenciados no infectados (NRAZ Vs NRA). El análisis del transcriptoma incluyó tres replicas por condición de cultivo. Se evaluaron y reportan los genes de mayor cambio en su expresión y los relacionados con alteraciones craneofaciales.

Resultados: En el grupo de los pacientes con SCZ se encontró perímetro cefálico disminuido 43.5 cm compatible con microcefalia versus 49.5 cm en los controles $p \leq 0.05$, tercio facial superior disminuido, una relación molar temporal tipo escalón distal que predispone a una Clase II de Angle, mientras que los niños controles no tenían dicho escalón, la distancia Zg-Zg estaba incrementada en SCZ y la distancia glabella (Gla)- opistium (Op) disminuía, y presentaban perfil facial convexo, línea

pupilar asimétrica, músculos masticatorios hipertónicos, disfagia, dislalia, bruxismo, incompetencia labial, interposición lingual e hipersalivación, maxilar protruido y mandíbula retraída, parálisis cerebral, epilepsia, limitación de la alimentación y para caminar. La fórmula dental estuvo completa y con morfología dental normal, sin embargo, el patrón de erupción dental en algunos pacientes fue prematuro o tardío, y algunos presentaron caries dental y maloclusión en comparación con los niños sanos.

Los experimentos de infección in vitro confirman el tropismo marcado del virus por los precursores neuronales y neuronas inmaduras, un posible efecto deletéreo sobre los oligodendrocitos y una menor tasa de infección de precursores mesenquimales, mientras que las células madre embrionarias pluripotenciales NT-2 parecen ser más resistentes a la infección con ZIKV. El análisis funcional de los cambios de expresión génica se relacionan con el enriquecimiento de vías relacionadas con alteraciones de la conducción nerviosa, convulsiones, metabolismo y transporte de iones como el calcio y de la resistencia a la insulina. Los genes con mayor magnitud del cambio en su expresión se relacionaron con procesos patológicos frecuentemente identificados y reportados en el SCZ como la microcefalia (*ARL14EP*, *XRCC*, *NIPBL*, *GRIN2C*, *PTEN*, *CYP26A1* y *CEP170*), artrogriposis (*SMIM43*), espasticidad (*TMEM63C* y *DDHD2*), dislexia (*ZNF385D*), epilepsia (*KCJNJ13*, *GLIS1*, *ARV1*, *NTRK2*) y alteraciones oculares (*GRIN2C*, *C12orf42*, *HKDC1*, *DRAM2*, *CRB1*, *ADAR*, *SLC6A6*, *SHPRH*, *CRYBA4*, *KLHL20*).

Conclusión: No hay cambios en la fórmula y morfología de los dientes deciduos en ZIKV congénito, sin embargo, los principales problemas médicos fueron parálisis cerebral, limitación de la locomoción, hiperreflexia y disfagia y en las bucales; dificultades para masticar y hablar, bruxismo, sin cierre labial y protrusión lingual y mordida abierta anterior. Las células del linaje neural NT-2 se infectan mas por zika, esto explica la afección diferencial del sistema nervioso, comparado con los derivados mesenquimales en el desarrollo craneofacial. Las consecuencias neurodegenerativas del ZIKV son mayores que las consecuencias en otras estructuras y tejidos craneofaciales. A pesar de ser menos aberrantes, las alteraciones craneofaciales identificadas como consecuencia de la infección congénita del ZIKV deben seguir siendo entendidas y comunicadas a la comunidad científica y los profesionales de la salud, porque demanda servicios y oportunidad de respuesta.

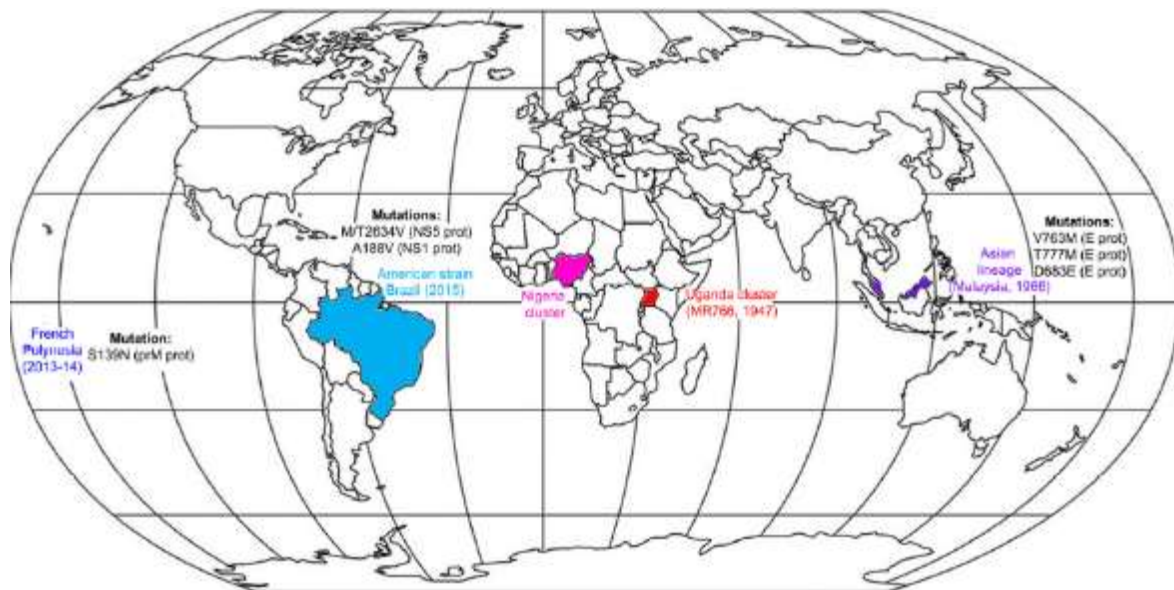
Palabras claves: Infección congénita por el virus del Zika, Síndrome congénito por ZIKV (SCZ), Desarrollo craneofacial, NTERA2/NT-2, Células progenitoras neurales, Zika virus, Transcriptoma/RNAseq.

2. CAPÍTULO I: Introducción

Virus Zika (ZIKV)

El ZIKV infecta mosquitos, monos y humanos. Es un *Flavivirus*, al igual que el virus dengue y el virus de la fiebre amarilla; y fue identificado en 1947 en Uganda en un mono (1,2).

Figura I-1. Expansión del ZIKV según los diferentes linajes en las diferentes regiones del mundo (3,4).



Filogenéticamente se ha identificado dos linajes del ZIKV asiático y africano, sin embargo, se ha demostrado que las dos emergen del este de África a fines del siglo XIX y al final del siglo XX (**Figura I-1**) (3–5). El linaje asiático se originó durante la migración del virus de África al sudeste de Asia, y se detectó por primera vez en Malasia, en humanos (5). A partir de ahí, el virus del Zika se propagó a las islas del Pacífico, siendo en el 2007 cuando se informó sobre el primer brote documentado de enfermedad por el ZIKV en Yap - Estados Federados de Micronesia (MR766). Se produjeron brotes subsecuentes en el sudeste asiático y el Pacífico occidental, como la Polinesia Francesa en el 2013 (H|PF|2013) (6); en mayo de 2015 la Organización Mundial de la Salud informó la primera transmisión local de ZIKV en la Región de las Américas, con casos autóctonos identificados en Brasil (SPH2015) (7).

El ZIKV es un virus un genoma ARN de sentido positivo de aproximadamente 11.000 pares de bases acomplejadas con múltiples copias de la proteína de la cápside, la cual está rodeada por una envoltura o cubierta seudo- icosaédrica que consiste en 180 copias tanto de la glicoproteína de la envoltura (E) (~ 500 aminoácidos) como de la membrana (M) proteína (~75 aminoácidos) en el virus

maduro o la proteína de la membrana precursora (prM) (~165 aminoácidos) anclada en una membrana lipídica en la partícula intracelular inmadura (8,9). La traducción del genoma viral resulta en una poliproteína compuesta por tres proteínas estructurales y siete proteínas no estructurales (NS): NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5. El ZIKV inicialmente se ensambla en el retículo endoplasmático como una partícula inmadura no infecciosa que consiste en 60 espículas de heterodímero E: prM triméricas (4,9–11). La partícula viral madura es infecciosa y consiste en 90 heterodímeros E: M diméricos (9,11,12) se produce en el entorno de pH bajo de la red trans-Golgi a través de cambios conformacionales de las glicoproteínas de superficie (13), y el subsecuente uso de las vías secretoras de la célula para su exostosis (4).

Los flavivirus generalmente se transmiten por mosquitos. El transmisor del ZIKV es el género *Aedes*. Diferentes especies se han reportado pueden transmitir ZIKV además de la más comúnmente conocida especie *aegypti*, dependiendo de su distribución geográfica y condiciones climáticas (1). Se han documentado otras vías de transmisión, que incluyen transfusiones de sangre, contacto sexual y transmisión vertical, de madre a hijo durante el embarazo (1,3,14,15).

El ZIKV no tiene un método de diagnóstico único, pues es necesario relacionar los signos y síntomas clínicos con las pruebas de laboratorio (1,16). El diagnóstico depende tanto de los resultados de los marcadores moleculares de infección por ZIKV, y se considera como la prueba oro, la identificación del virus a través de la reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) en un paciente sintomático (17). También se puede confirmar la infección por ZIKV por el análisis del perfil inmunológico en sangre (IgM, anticuerpos IgG neutralizantes), complementado por la caracterización y el seguimiento clínico (16,18,19). Existen otras pruebas contemporáneas de detección como la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), como una alternativa al RT-qPCR para ZIKV y otros arbovirus; ya que este método resulta más eficiente para la detección temprana de nuevos brotes en países en desarrollo (17).

El período de incubación del virus ocurre entre 3 y 12 días en humanos, y aparentemente es asintomática en 80% de los casos (18,19). Las manifestaciones clínicas de ZIKV son comunes con otros arbovirus, son erupción cutánea, inyección conjuntival, mialgia, artralgia y la fiebre, una imagen común entre el Dengue, el Chikungunya y la malaria (14). Sin embargo, en la reciente epidemia del 2013 en Polinesia Francesa, Brasil, Latinoamérica y el Caribe, la emergencia del ZIKV se asoció con aumento en la incidencia de complicaciones neurológicas como el síndrome de Guillan - Barré en adultos y microcefalia o el denominado síndrome congénito asociado a ZIKV (19–21). Siendo hasta hoy, el único virus transmitido por mosquito, cuya infección desencadena problemas al nacer con consecuencias aberrantes.

Durante el estudio del tropismo de este virus, se han identificado diferentes genes que codifican para proteínas que permiten la entrada del ZIKV en las células en las que se replica (22,23). El receptor actualmente identificado como uno de los

principales mediadores de la entrada del ZIKV a la célula es el AXL (receptor de la familia Tirosin-kinasa) (24). Las principales proteínas que interactúan con este receptor TAM son las proteínas Gas6 y Proteína S, que pertenecen a la familia de proteínas de la fosfatidil-serina (25). Recientes investigaciones han confirmado el papel de ligando que cumplen las proteínas Gas6 y PS para mediar la entrada del ZIKV, y a su vez, activando señales de los dominios TIM del receptor para la inhibición de la expresión del INF tipo 1 que media la respuesta inmune innata celular. Este mecanismo es crucial en la entrada del ZIKV en células progenitoras de neuronas pluripotenciales, células gliales y células nerviosas maduras, además de permitir que la infección llegue a ser productiva (24). Otros tipos de receptores de entrada del ZIKV han sido descritos, principalmente en células de tejidos en desarrollo pluripotencial, como células endoteliales o citotrofoblastos placentarios. Uno de estos receptores es la glicoproteína TIM1, expresadas en la envoltura viral (26). Las proteínas que se conocen hasta el momento reportadas en la literatura para la entrada del virus Zika a la célula se resumen en la **Tabla I-1** (27).

Tabla I-1. Factores que facilitan la interacción de ZIKV con las células huésped.

Proteína ZIKV	Proteína del huésped	Función
ENV	AXL	Altamente expresado en células gliales radiales humanas, astrocitos, células microgliales y endoteliales en el cerebro en desarrollo; promueve la entrada de ZIKV y modula las respuestas inmunitarias innatas.
	NCAM1	Da forma a la red neuronal durante el desarrollo; involucrado en la plasticidad sináptica y las funciones cognitivas; facilita la unión y la entrada de ZIKV en las células huésped.
	Integrina $\alpha v \beta 5$	Actor de internalización para ZIKV en células madre neurales humanas (hNSC) y células madre de glioblastoma (GSC).
	GRP78	Proteína chaperona GRP78 del retículo endoplásmico (ER); facilita el plegamiento adecuado de las proteínas nacientes; involucrado en el estrés del RE al mediar la vía de respuesta de proteína desplegada (UPR); media la entrada de ZIKV en las células huésped.
Cápside	Hsp70	Desempeña un papel esencial en la traducción, plegamiento, tráfico intracelular y degradación de proteínas; involucrado en la transducción de señales, apoptosis, regulación del ciclo celular e inmunidad innata; implicado en la replicación de varios virus; facilita la unión y la entrada del ZIKV en las células de los mamíferos, así como los procesos posteriores a la entrada, incluida la replicación y la salida
Desconocido	$\alpha 2,3$ -union ácido sálico	Receptor de entrada para varios virus; media la internalización de ZIKV

*Traducida de Komarasamy et al., 2022.

Los efectos virales del ZIKV, como las malformaciones cerebrales congénitas, la disfunción del tallo cerebral, las disfunciones motoras y sensoriales inexplicables y la microcefalia grave se han estudiado en algunas poblaciones del mundo (4,28–30). La deficiencia del crecimiento cerebral debido a la microcefalia se acompaña de una disfunción neurológica, que incluye hipertonía y hemiparesia, disquinesia / distonía, artrogriposis, disfagia, epilepsia y persistencia de reflejos primitivos, que pueden generar retraso mental y refinamiento de los movimientos motores reflejos y voluntarios (29,31). Los efectos de los trastornos neuromotores se han documentado con pruebas validadas de movimientos reflejos a una edad temprana, como la succión durante la lactancia(32). Además, algunas gestantes con sospecha de infección por ZIKV durante la gestación han tenido complicaciones en la formación fetal verificadas en los controles de ultrasonido, incluso se ha confirmado posteriormente la presencia del virus en los tejidos fetales y placentarias post parto (20,33), aunque es poca la evidencia publicada de este tipo de hallazgos.

Algunas investigaciones se han aproximado a explicar estos hallazgos clínicos a través de modelos animales e *in vitro*. Las observaciones de los modelos de infección congénita, con inoculación intracraneal directa de ZIKV en el período posnatal de ratones silvestres, generaron el agotamiento de las células madre pluripotenciales en el compartimiento la zona ventricular, así como alteración de las neuronas piramidales corticoespinales (34–36). La infección del ZIKV se ha comprobado en experimentos tanto en ratones, humanos y en primates (37); y se ha reconocido que la infección productiva a nivel de trofoblastos placentarios, posibilitan la transmisión vertical del virus (36). Adicionalmente, hay estudios con cultivos de neuroesferas u organoides humanos *in vitro* infectados con ZIKV, en donde se reduce el número de neuronas por mecanismos de autofagia inducida por el virus (37,38). Por otro lado, la infección de las CCN puede dar como resultado la producción de citoquinas inflamatorias que promueven procesos apoptóticos (39,40). En estudios con tejidos humanos, se ha detectado RNA de ZIKV tanto en tejidos maternos y fetales, incluida la sangre del cordón umbilical, varios tipos de células placentarias, líquido amniótico y el cerebro humano neonatal; como en el cerebro y la placenta de fetos humanos espontáneamente abortados en el primer y segundo trimestre (41).

Los niños con microcefalia asociada a ZIKV presentan varias características maxilofaciales, dentales y oclusales como, caras anchas y cortas, distancia intercantal disminuida, longitud nasal posterior corta, raíz nasal prominente, orejas largas y de implantación alta, tercio facial superior disminuido, forma del paladar estrecho, proyección anterior de la lengua, frenillos sobreinsertados, erupción tardía del primer diente, cronología de erupción dental alterada, alteraciones en la formación dental como agenesia (51,52,13,12). Otros reportes mas actuales, evidencian hallazgos complementarios al perfil clínico de niños con SCZ como aumento de la salivación, incompetencia labial, posición lingual alterada en reposo, posición mandibular alterada, paladar ojival y bruxismo (43).

Epidemiología del virus del Zika (ZIKV) en el mundo y Colombia:

En 1947, se realiza el primer aislamiento del virus en Uganda (África) a partir de un mono, y solo hasta el 2007 se registra un brote espontáneo en la isla de Yap; en el 2013 se presenta un brote similar en la Polinesia Francesa asociado con el síndrome de Guillain Barre. A finales de 2013 e inicios de 2014 se registra la llegada del ZIKV a Brasil y en mayo del siguiente año se confirma la diseminación del virus en todo ese país y un aumento en los casos de microcefalia. En julio de 2015 hubo un aumento en la detección de los desórdenes neurológicos y tres meses después, se observaron dos aspectos importantes: la propagación del virus a otros países, como Colombia; y un aumento inusual de los casos de microcefalia. En enero del 2016, se detecta ZIKV en tejido nervioso de niños recién nacidos. Finalmente, se registra que en el 2017 ya se había diseminado en 47 países de América (**Figura I-2**)(3,6).

En todo el mundo, se ha informado que los picos de la enfermedad transmitida por el vector se producen en áreas de mayor pobreza (14,44). De acuerdo con lo anterior, se sabe que el vector del ZIKV tiene la característica de reproducirse en áreas con aguas estancadas o humedales (44). Se han propuesto incluso la necesidad de realizar intervenciones para el control de vectores en las ciudades para reducir el impacto de las enfermedades transmitidas por vectores como una medida de global de salud pública (45).

Figura I-2. Esquema espaciotemporal de identificación de brotes en las diferentes regiones del mundo, ZIKV (3).

	1945	1955	1965	1975	//	2005	2010	//	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Africa	1947 Discovery of ZIKV in monkeys (Uganda)		1962-3 First human case (Uganda)							2015 Cape Verde outbreak*	2016 Guinea-Bissau outbreak* 2016-2017 Angola outbreak*			
Asia	1966 Detection of ZIKV in Asia (Malaysia) in mosquitos (<i>Aedes aegypti</i>)										2016 Singapore, Vietnam*, and Thailand* outbreaks		2018 India outbreak	
Pacific	2007 Yap Islands outbreak					2013-2014 French Polynesia outbreak* • Cluster of Guillain-Barré syndrome (GBS) • Maternal-fetal transmission identified • Detection of ZIKV in semen and asymptomatic blood donors 2014-2016 Spread in the Pacific					2016 Link established between ZIKV and GBS			
Americas	2008 Suspected sexual transmission after exposure to a returning traveler from Senegal					2015 Detection of ZIKV in Brazil* • Detection occurred in March • Increased numbers of microcephaly cases reported in October • Declaration of public health emergency in November					2017 Declining circulation		2018 Low-level circulation	
											2016 • WHO declares ZIKV a Public Health Emergency of International Concern (PHEIC) (February) • Pandemic spread to South America*, Central America*, and North America • Transmission in continental United States • Blood-transfusion-associated transmission confirmed • Link established between ZIKV and severe birth defects • Sexual transmission confirmed			

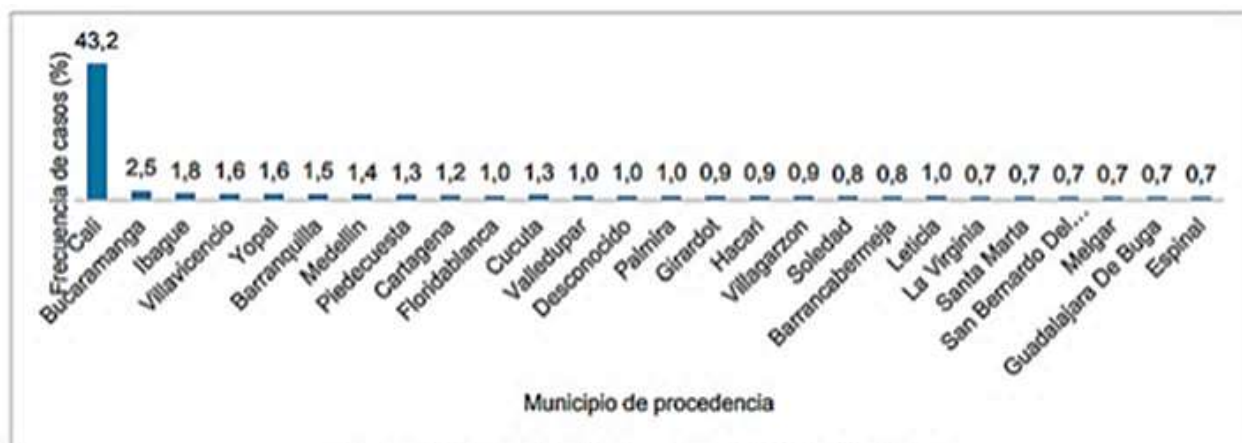
Figura I-3. Morbilidad mundial del ZIKV durante períodos epidémicos (46)



En la región del sureste asiático entre los años 2015 y 2016 se reportó con mayor frecuencia en países no insulares como Tailandia, Laos, Myanmar, Vietnam, Malasia y Camboya, comparado con países insulares como Indonesia, Singapur, Brunei, Timor Oriental y Filipinas. La situación en las regiones adyacentes al sudeste asiático como la región meridional de China y la parte más oriental de la India era diferente, pues hasta el año 2016 aún no se ha informado que el virus del Zika estuviera presente en esas áreas, pero siempre se consideró como un importante problema de salud pública (**Figura I-3**) (47). En menos de un año, los informes llegaron de 400,000 personas infectadas a 1,300,000 entre mayo de 2015 a febrero de 2016, en Brasil (15). Por esto, el acceso de las personas a los países de América del Norte, provenientes de las áreas afectadas, fue restringido. A pesar de estas restricciones migratorias, algunos estudios reportan que en los casos de microcefalia reportados en Hawaii, se pudo identificar qué parte del embarazo se había desarrollado en Brasil (1).

Para el año 2016, de los casi 100 mil casos sospechosos de infección con ZIKV, solamente 9.799 casos se confirmaron por laboratorio en Colombia durante la fase epidémica y endémica. Según el Instituto Nacional de Salud (INS), 953 casos de estos se confirmaron en el Valle del Cauca. Para el 2017, donde el sistema SIVIGILA lo incluye como evento notificable, se reportaron un total de 1901 casos confirmados, de los cuales el 50.7% fueron notificado en las principales ciudades del país, y de este porcentaje el 43% de los casos fueron reportados por la ciudad de Cali (**Figura I-4**), un total de 414 casos que incluyen en su mayoría mujeres y en edad fértil (48–50).

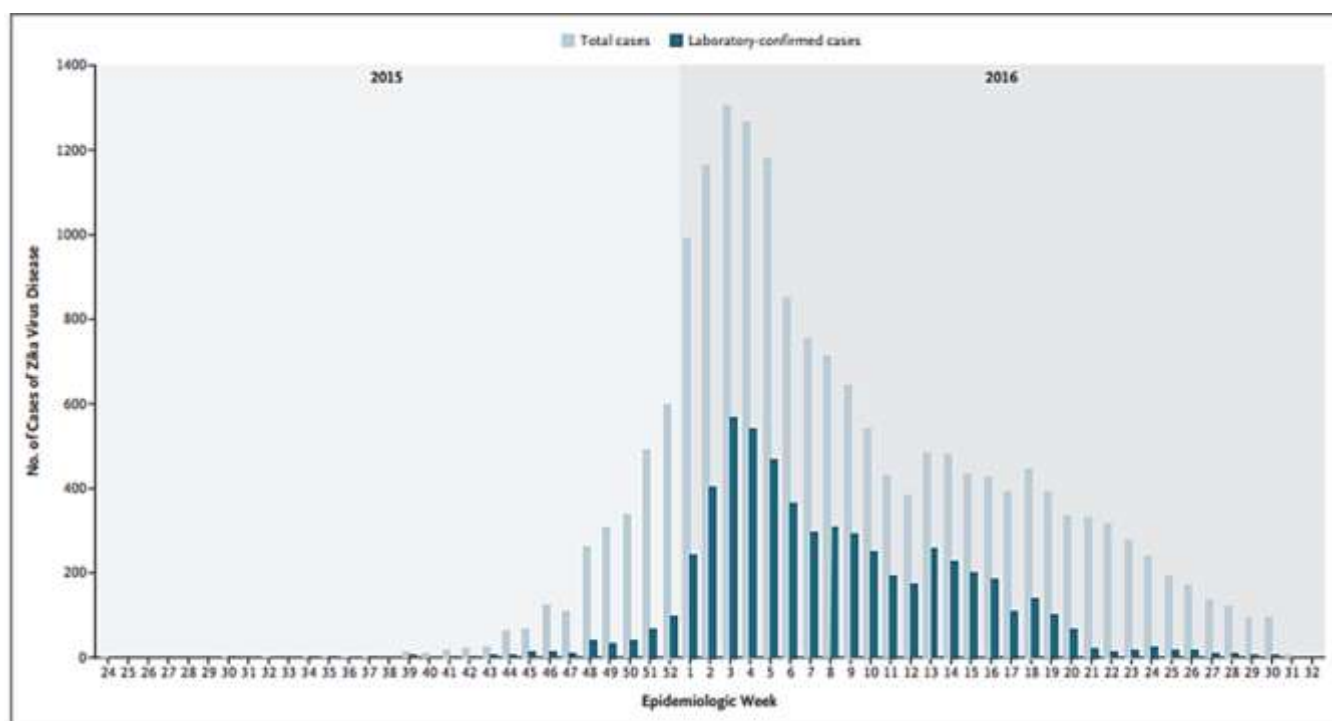
Figura I-4. Distribución de casos de Zika según ciudad de procedencia. Colombia, INS 2017.



Fuente: SiviGila. Instituto Nacional de Salud, Colombia, 2017

Según el último informe del INS (Marzo de 2019) en Colombia se confirmó que para abril del 2017 se habían notificado 1239 casos de infección congénita en SIVIGILA, de los cuales 858 se confirmaron como posible infección por Zika y 356 de estos, desencadenaron eventos como microcefalia o síndrome congénito asociado a Zika en los bebés, la mayoría de estos confirmados en el Valle del Cauca, zona de gran afluencia migratoria de muchas poblaciones del suroccidente colombiano (consultar <https://www.valledelcauca.gov.co/publicaciones/62572>). En Cali, hubo un total de 91 casos de niños con microcefalia de los 350, reportados para todo el país durante el período epidémico (51).

Figura I-5. Distribución de casos de Zika. Colombia, semanas epidemiológicas 01-52, 2017(52).



Del total de casos reportados como sospechosos, solo cerca del 40% de los casos se lograron confirmar con pruebas de laboratorio (52). Esto se convierte en un reto, debido al subregistro que hubo en todas las regiones del país que dificultan la identificación de las secuelas de la infección congénita y en otros grupos de edad (**Figura I-5**).

Embriogénesis y desarrollo craneofacial:

Las estructuras del desarrollo en gestación inician cuando el cigoto se implanta convirtiéndose en el blastocisto y termina diferenciándose como disco bilaminar al final de la segunda semana después de la fecundación. Desde ese momento se inician eventos importantes del desarrollo del embrión claves para la neurogénesis y la diferenciación celular (53). Las células de la cresta neural (CCN) se forman en la unión de la placa neural y el ectodermo epidérmico durante la neurulación. La formación de la Cresta Neural (CN) requiere múltiples vías de señalización y factores de transcripción que establecen un conjunto de células de la CN (CCN) premigratorias en las regiones dorsales de los pliegues neurales (54). La diferenciación de la CN a partir de la formación del tubo neural está mediada por genes específicos (p ej. FoxD3, Pax3/7, otros) (**Tabla I-2**) que resultan dando origen a la diferenciación de la lámina del ectodermo y da lugar a las células en etapa migratoria. Además, también se regulan positivamente para estabilizar este estado regulador, lo que resulta en el mantenimiento de una serie de genes orquestantes de la CN delaminante y migratoria (55).

Tabla I-2. Genes relacionados con el desarrollo craneofacial.

NOMBRE	FUNCIÓN	LOCI	INTERACCIÓN	REF.
WNT	Regulación de diferenciación celular SNC.	WNT1: Cromosoma 1 y 3 WNT5A: Cromosoma 3	Positiva: Msx1, Gbx2, Dlx5/6 Negativa: Otx2	NCBI (55,56)
BMP	Regulación de morfogénesis ósea, diferenciación de células precursoras (condroblastos y osteoblastos)	BMP2: Cromosoma 2 BMP4: Cromosoma 10 BMPR1B: Crom. 4	Positiva: Msx1, Gata2/3, Dlx5/6 Negativa: Otx2	NCBI (55,57)
PAX3/6/7	Desarrollo fetal, adhesión celular para diferenciación.	PAX3: Cromosoma 2 PAX7: Cromosoma 4	Positiva: Msx1, Gata2/3, Dlx5/6 Negativa: Otx2	NCBI (55,58,59)
DLX5/6	Factor de transcripción que codifica para la diferenciación y cicatrización del	DLX5/6: Cromosoma 7	Positiva: Six1, Ella 1/2.	NCBI (54,55)

	hueso (DLX5); y la formación del cerebro anterior y desarrollo craneofacial (DLX6).			
MSX1	Represor transcripcional durante. También tiene roles en la formación de extremidades, desarrollo craneofacial (ontogénesis) e inhibición del crecimiento tumoral.	Cromosoma 4	Positiva: Six1, Ella 1/2.	NCBI (55)
FOXD3	Involucrado en la producción de Cadherina 7, para la diferenciación celular, también se relaciona con reacciones autoinmunes.	Cromosoma 1	Positiva: Cad7, ItgB1	NCBI (54,55,58)
SOX9/10	Diferenciación de los condrocitos y, con factor esteroideogénico 1, regula transcripción de la hormona anti-Muelleriana (AMH)-SOX9. Involucrados en la regulación del desarrollo embrionario y determinación del destino celular. Proteína lanzadera núcleo citoplásmica y es importante para la cresta neural y el desarrollo del sistema nervioso periférico-SOX10.	SOX9: cromosoma 17 SOX10: cromosoma 22	Positiva: SOX9: Snail1/2, Zic1. SOX10: Cad7	NCBI
RUNX2	Factor de transcripción mediada por BMP2 para la osteogénesis.	Cromosoma 6	Positiva: BMP2 SMAD 1/5/9	NCBI (4)

Según algunos análisis in vitro, la elevación simulada de la señalización de WNT bloqueó la diferenciación neuronal de las CCN, sugiriendo que la señalización elevada de WNT dirige a las CCN hacia un destino mesodérmico. Se ha informado que la inducción neural del ectodermo requiere la inhibición de la señalización de WNT y que WNT3a regula la inducción del mesodermo paraxial, a expensas de los destinos neurectodérmicos (59).

Inicialmente, en la tercera semana inicia el período de gastrulación donde el disco bilaminar se convierte en trilaminar. El ectodermo (precursor de la formación del epitelio mucoso oral, esmalte, glándulas salivares y epidermis) se diferencia del mesodermo (precursor de formación del esqueleto facial, dermis facial, complejo dentinopulpar, periodonto, cráneo, tejido conectivo de la cabeza y músculos) y del endodermo (precursor de glándulas mayores submaxilar y sublingual, y la base de la lengua), dando como resultado de la maduración la membrana bucofaríngea, el nódulo primitivo y la membrana cloacal; que al final de la tercera semana dan origen a la línea primitiva, el surco neural y la placa neural (53). Entre la cuarta y quinta semana, el endodermo da origen al estomodeo que se separa de la faringe por medio de la lámina del estomodeo (que darán origen a las tonsilas) (53,60). También

se originan los arcos faríngeos que dan origen a las siguientes estructuras (53,60,61):

Tabla I-3. Arcos Faciales y estructuras a las que dan origen.

TIPO DE ARCO	DESCRIPCIÓN
Primero (protuberancia maxilar)	Originan mandíbula, músculos, 2/3 anteriores de la lengua (a partir del cartílago de Meckel), huesos yunque y martillo. Nervio trigémino (V par craneal).
Segundo (hioideo)	Parte del hueso hioides, hueso estribo, base de la lengua, músculos estilohioideos y vientre posterior del digástrico, músculos de la mímica. Nervio facial (VII par craneal).
Tercero	Parte del cuerpo del hioides, base de la lengua, músculo estilofaríngeo. Nervio del noveno par craneal (IX).
Cuarto	Cartílagos laríngeos, músculos cricotiroides, músculo constrictor de la faringe. Nervio Vago (Rama laríngea superior-X par craneal)
Quinto	Es rudimentario, se fusiona con el cuarto y el sexto arco faríngeo.
Sexto	Cartílagos laríngeos, músculos laríngeos intrínsecos, Nervio Vago (Rama laríngea recurrente – X par craneal).

Durante su maduración pos-migratoria temprana, posterior a la transición ectomesenquimal de las CCN (55,62), las células de la cresta neural en los arcos branquiales y los ganglios craneales muestran diferencias en la expresión génica, y la información de sus funciones e interacciones aún es limitada (54,63); sin embargo se conocen algunas interacciones genéticas como la sobreexpresión del gen SOX10 en la cresta neural migratoria y su misma regulación a la baja en zona de primer arco branquial; por el contrario el gen DLX2 activa su expresión al disminuir la de SOX10. También se conoce que la baja expresión del gen DLX2 se asocia con dismorfología craneofacial (63).

De la sexta a la octava semana de gestación se inicia la diferenciación de lámina dental y la lengua consolida su formación. Se forman los primordios nasales, los segmentos premaxilares, crece la mandíbula y labio inferior, aparecen las acciones como la deglución. Aparecen las 20 yemas de la dentición decidua (de naturaleza ectodérmica) (60,64), lo que da inicio a la morfogénesis dental. La primera manifestación consiste en la diferenciación de la lámina dental a partir del ectodermo; que tapiza la cavidad bucal primitiva o estomodeo. El epitelio ectodérmico bucal en este momento está constituido por dos capas: Una superficial de células aplanadas y otra basal de células altas, conectadas al tejido conectivo embrionario por medio de la membrana basal. Inducidas por el ectomesenquima subyacente, las células basales de este epitelio bucal proliferan a todo lo largo del borde libre de lo que serán los maxilares, dando lugar a la lámina vestibular y la

lámina dentaria. La lámina vestibular: sus células proliferan dentro del ectomensenquima, se agrandan y forman una hendidura que constituye el surco vestibular entre el carrillo y los dientes (65).

En la octava semana de gestación la lámina dentaria se forman 10 crecimientos epiteliales dentro del ectomensenquima de cada maxilar, en sitios predeterminados genéticamente, los que correspondientes a los 20 dientes deciduos. De la misma lámina, también se da origen los 32 gérmenes permanentes maso menos al quinto mes de gestación. El indicio del primer molar permanente existe ya en el cuarto mes de vida intrauterina. Los molares segundo y tercero comienzan su desarrollo después del nacimiento, alrededor de los 4 o 5 años de edad (66).

Los gérmenes dentarios surgen en su evolución una serie de etapas que, de acuerdo con su morfología, se denominan: Estadio de brote macizo (o yema) aparecen diez yemas o brotes en cada maxilar. Son engrosamientos de aspecto redondeado que surgen como resultado de la división mitótica de algunas células de la capa basal del epitelio. Estos serán los futuros órganos del esmalte que darán lugar al único tejido que deriva del ectodermo, el esmalte (64–66).

Durante la semana 9 de gestación se da el estadio de casquete, la proliferación desigual del brote a expensas de sus caras laterales determina una concavidad en su cara profunda. Su concavidad central encapsula una pequeña porción del ectomensenquima que lo rodea; es la que posteriormente se llamará papila dentaria, que dará origen al complejo dentinopulpar. De la semana 14 a la 18 de vida intrauterina se da el denominado estadio de campana, el epitelio interno y el estrato intermedio son los responsables de la formación del esmalte. Las células del epitelio interno (se diferencian en ameloblastos jóvenes), los ameloblastos jóvenes ejercen su influencia inductora sobre la papila dentaria. Las células superficiales ectomesenquimales indiferenciadas se diferencian en odontoblastos que comenzarán luego a sintetizar dentina. Al final del estadio de campana, los ameloblastos jóvenes se han transformado en ameloblastos secretores o maduros. En la papila dentaria se da la diferenciación de los odontoblastos lo cual se realiza a partir de las células ectomesenquimales de la papila que evolucionan transformándose en pre-odontoblastos, luego en odontoblastos jóvenes y para finalizar, en odontoblastos maduros o secretores (66). En su extremo proximal o libre (polo secretor) se diferencia una prolongación citoplasmática única o llamada proceso odontoblástico. Los odontoblastos Sintetizan las fibrillas colágenas tipo I (con pequeñas cantidades de colágeno tipo III) y los glicosaminoglicanos de la matriz orgánica de la dentina. Cuando se forma dentina, la porción central de la papila se transforma en pulpa dentaria. La zona central de la papila, se caracteriza ahora por presentar fibroblastos jóvenes (64,65).

En la etapa de campana se manifiesta el folículo dental que tiene dos capas de células, en su parte interna (células y vasos sanguíneos), y en su parte externa (fibras colágenas). De la capa celular, se forma el ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar. En la formación del patrón radicular, la vaina epitelial de Hertwig es una estructura que se origina de la unión del epitelio interno y externo del órgano

del esmalte sin la presencia del retículo estrellado, esta vaina epitelial desempeña un papel fundamental como inductora y modeladora de la raíz del diente (65,66).

De la semana 9 al a 13 aparecen las partes óseas. La porción intramembranosa da origen a huesos: frontal, occipital, nasales, maxilar superior, parietal, temporal, huesos palatinos y cuerpo de la mandíbula. La porción endocondral da origen a los huesos: etmoides, occipital, rama de la mandíbula, esfenoides y temporal. Se desarrolla la etapa de casquete donde se diferencian la papila dental, el saco dentario y el nudo primario del esmalte (60,64). En la semana 11 se forman los labios y la nariz y en la semana 12 se fusionan los procesos palatinos (formando el rafe medio) (53).

En el segundo trimestre, el complejo dentinopulpar se encuentra en etapa de “campana” con la mineralización activa por aposición y plegamiento del tejido dental interno. Remodelación ósea del arco cigomático, hueso maxilar y otras zonas por aposición (53). Se empiezan a consolidar movimientos de succión a lo largo del trimestre, y los ojos y las orejas van encontrando su posición. Alrededor de la semana 16 los músculos cervicales se encuentran erguidos y los músculos faciales empiezan a ejercer su función de “expresión”. La lengua se desarrolla por completo y es funcional. Entre las semanas 18 y 28 se da un crecimiento volumétrico del cerebro y se inician los movimientos oculares (60,64).

En el tercer trimestre se consolidan los movimientos de la deglución y de succión y los alveolos en los pulmones maduran en preparación para una futura respiración del aire. En la semana 33, se desarrollan los sentidos del gusto, tacto y oído. Durante la semana 36 el cerebro y la cabeza alcanzan su máximo tamaño y todos los órganos se encuentran maduros y funcionales (53).

Desarrollo craneofacial y Zika:

Las CCN son un linaje de células multipotenciales, que contribuye a todos los tejidos faciales, incluidos los huesos, el cartílago, los dientes, los nervios y el tejido conectivo, entre otros (57). Un rol muy importante de la regulación de la señalización génica necesaria para la maduración y diferenciación de la CN son las proteínas WNT, las proteínas morfogénicas de hueso (BMP-por su sigla en inglés) y las Cadherinas (moléculas de adhesión); pues tienen efectos modificadores de la expresión génica cuando están ausentes (55,57,67). Este linaje de células multipotenciales una vez se da el selle del tubo neural, colonizan diferentes regiones del embrión con el fin de generar tipos celulares distintos como: neuronas periféricas y glía, neuronas hipotalámicas, condrocitos y osteoblastos craneofaciales, melanocitos, células de cromafines suprarrenal y también tipos de células del corazón, ojo y oído interno que contribuye a todos los tejidos faciales, incluidos los huesos, el cartílago, los dientes, los nervios y el tejido conectivo, entre otros (57,68). El potencial de diferenciación de las CCN está guiado por su posición original a lo largo del eje neural anterior-posterior, generando 5 subpoblaciones: craneales,

cardíacas, vagales, tronculares y sacras (68). La formación del complejo craneofacial es un evento complejo e intricado que ocurre en los humanos en las primeras 10 semanas de gestación (69). Los defectos en la orquestación de dichos procesos generan múltiples malformaciones congénitas que incluyen por ejemplo el labio y el paladar hendido o las craneosinostosis. A nivel mundial las hendiduras craneofaciales son unos de los mas comunes defectos del Nacimiento con una prevalencia de 1 en 700 nacimientos (70). Mientras estos defectos son reparables con cirugía maxilofacial, también causan múltiples problemas económicos, psicológicos y sociales a quienes los padecen y significan un problema de salud pública (71–73).

El buen patrón de desarrollo óseo va acompañado los tejidos relacionados con la formación y función del complejo craneofacial como son los vasos sanguíneos, músculos, y ligamentos, que a su vez necesitan de un correcto desarrollo del sistema nervioso para la conducción de estímulos de los que depende su función (31); y se hace clave considerar que todo el complejo craneofacial está involucrado en funciones como la capacidad de succionar, deglutir, masticar, hablar, entre otras; como también la relación de dichas funciones con el aprendizaje, la respiración, fonación, y relacionamiento social; pues la adquisición del lenguaje y la independencia al comer, están relacionados con el desarrollo armónico de la boca, la laringo-faringe, la nariz, y la lengua y de los nervios, vasos sanguíneos, músculos y tendones relacionados en la cabeza y el cuello (57,61,74). De tal modo que el diagnóstico prenatal, la prevención y la promoción son altamente deseables y los aspectos genéticos y ambientales, que deben ser tenidos en cuenta en las políticas de salud (75,76); sin embargo se desconoce mucho de la etiopatología de los desordenes craneofaciales hereditarios y menos de aquellos que son adquiridos como es el caso de síndrome congénito del Zika (SCZ) (77,78).

Algunas publicaciones documentan una mayor afectación en los tejidos derivados del SNC, poco se sabe sobre los efectos del ZIKV en tejidos los derivados del mesénquima; y tampoco se han descrito las consecuencias y la patogénesis en el conectivo, cartílago, hueso y dientes (31). Las proteínas virales y del huésped involucradas en el ciclo de vida del virus han servido como objetivos para el desarrollo de inhibidores del ZIKV en los diferentes niveles del ciclo infeccioso (46). Se conoce que la vía del interferón (IFN) es la que más se activa como respuesta a la infección por Zika, lo que induce estímulos de señalización de diferentes vías inductoras de apoptosis, que podrían explicar efectos patológicos del desarrollo tras la infección congénita (4,79). Muchas funciones del complejo craneofacial se ven afectadas en los niños con infección congénita por ZIKV (4,80).

Por lo anterior, los modelos in vitro se convierten en una estrategia útil para el desarrollo de experimentos que puedan aclarar hipótesis planteadas acerca de la afectación diferencial del ZIKV en el tejido del SNC respecto a derivados mesenquimales, a pesar de su origen común (36). Los modelos en células, y principalmente las células embrionarias pluripotenciales, permiten recrear el comportamiento embrionario (81) y generar evidencias más cercanas a los efectos patogénicos de la infección (36,48,82,83); razón por la que el conocimiento sobre la

inmunopatogénesis del ZIKV continua construyéndose a nivel global, dado que se desconocen otros efectos relacionados con la naturaleza de este virus en caso de un nuevo brote en zonas del trópico como Colombia, Brasil u otras partes del mundo. La continua investigación respecto a la infección con ZIKV en biomodelos, permite incrementar la evidencia de esta enfermedad y entender mejor sus secuelas, los principios de diagnóstico y manejo clínico; pues existe una necesidad inminente de movilizar apoyo y mejorar la capacidad en los países de bajos y medianos ingresos para responder a las futuras epidemias de ZIKV y los próximos patógenos emergentes (3).

Por esto, se han planteado la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuáles son los efectos en el desarrollo craneofacial y dental en niños que fueron expuestos neonatalmente a ZIKV en el Valle del Cauca y podría el perfil de la transcriptómica de la infección ZIKV en un modelo *in vitro* de células embrionarias pluripotenciales dar nuevos indicios de los genes y vías moleculares implicados en los defectos craneofaciales del SCZ?

Hipótesis Nula:

No hay afectación del desarrollo craneofacial, ni estomatognático, en niños expuestos congénitamente a Zika en el Valle del Cauca, ni se identifican en un modelo de infección *in vitro* cambios en la expresión de genes del desarrollo craneofacial que puedan explicar el fenotipo clínico del SCZ.

Objetivo General

Determinar los efectos de la infección congénita por el ZIKV sobre el desarrollo dental y craneofacial, desde una perspectiva básica y clínica.

Objetivo específico #1

Describir características clínicas y morfológicas del desarrollo craneofacial en niños expuestos congénitamente al ZIKV.

Objetivo específico #2

Establecer un modelo *in vitro* que recree la infección ZIKV en células embrionarias pluripotenciales y del linaje neural, en términos de la infectividad/tropismo y/o afectación de la diferenciación hacia el linaje neural (neuronas, astrocitos y oligodendrocitos) y no neural.

Objetivo Especifico #3

Identificar genes y vías moleculares en la infección ZIKV *in vitro* en estadio embrionario, progenie neural y no neural; relacionados con los fenotipos craneofaciales alterados en niños expuestos congénitamente a la infección con ZIKV.

Para dar respuesta a la pregunta de investigación se desarrollaron los siguientes capítulos de el presente estudio. El **Capítulo II** se enfoca en la evaluación clínica de niños con infección congénita con ZIKV durante el periodo epidémico en Colombia y comparar referentes de crecimiento y desarrollo craneofacial con niños sanos entre 3 y 5 años de edad. En el **Capítulo III** se desarrolló un modelo *in vitro* de infección con ZIKV de células embrionarias pluripotenciales (Ntera2), que se diferenciaron a tejido neuronal y otros derivados tras el estímulo de las condiciones de cultivo con Acido Retinoico (AR). Finalmente se realizó el análisis de la expresión diferencial de genes de embriogénesis y desarrollo craneofacial, a través de un ensayo de secuenciación masiva RNA-seq de transcritos genéticos en el **Capítulo IV** que intentó integrar el espectro clínico encontrado en la evaluación de pacientes del Capítulo II, los hallazgos del desarrollo del modelo de infección celular con ZIKV del Capítulo III, lo reportado en la literatura y cómo los cambios de expresión genética explicados por la infección, pueden darnos mayor conocimiento sobre la patogénesis congénita del ZIKV.

2.1 Bibliografía

1. Plourde AR, Bloch EM. A literature review of Zika virus. *Emerg Infect Dis*. 2016;22(7):1185.
2. Qian X, Nguyen HN, Jacob F, Song H, Ming G. Using brain organoids to understand Zika virus-induced microcephaly. *Development*. 2017;144(6):952–7.
3. Musso D, Ko AI, Baud D. Zika virus infection—after the pandemic. *N Engl J Med*. 2019;381(15):1444–57.
4. King EL, Irigoyen N. Zika Virus and Neuropathogenesis: The Unanswered Question of Which Strain Is More Prone to Causing Microcephaly and Other Neurological Defects. *Front Cell Neurosci*. 2021;371.
5. Kuno G, Chang G-J. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Arch Virol*. 2007;152(4):687–96.
6. Musso D, Nilles EJ, Cao-Lormeau V. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(10):O595–6.
7. Zanluca C, Melo VCA de, Mosimann ALP, Santos GIV dos, Santos CND dos, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(4):569–72.
8. Sirohi D, Chen Z, Sun L, Klose T, Pierson TC, Rossmann MG, et al. The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. *Science* (80-). 2016;352(6284):467–70.

9. Herrada CA, Kabir M, Altamirano R, Asghar W. Advances in Diagnostic Methods for Zika Virus Infection. *J Med Device*. 2018;12(4).
10. Saxena SK, Elahi A, Gadugu S, Prasad AK. Zika virus outbreak: an overview of the experimental therapeutics and treatment. *Virusdisease*. 2016;27(2):111–5.
11. Zhang Y, Corver J, Chipman PR, Zhang W, Pletnev S V, Sedlak D, et al. Structures of immature flavivirus particles. *EMBO J*. 2003;22(11):2604–13.
12. Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev S V, Corver J, Lenches E, et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*. 2002;108(5):717–25.
13. Yu I-M, Zhang W, Holdaway HA, Li L, Kostyuchenko VA, Chipman PR, et al. Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science* (80-). 2008;319(5871):1834–7.
14. Atif M, Azeem M, Sarwar MR, Bashir A. Zika virus disease: a current review of the literature. *Infection*. 2016;44(6):695–705.
15. Hennessey M, Fischer M, Staples JE. Zika virus spreads to new areas—region of the Americas, May 2015–January 2016. *Am J Transplant*. 2016;16(3):1031–4.
16. Tahotná A, Brucknerová J, Brucknerová I. Zika virus infection from a newborn point of view. *TORCH or TORZiCH? Interdiscip Toxicol*. 2018;11(4):241.
17. Silva SJR da, Pardee K, Pena L. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for the Diagnosis of Zika Virus: A Review. *Viruses*. 2020;12(1):19.
18. Parra B, Lizarazo J, Jiménez-Arango JA, Zea-Vera AF, González-Manrique G, Vargas J, et al. Guillain–Barré syndrome associated with Zika virus infection in Colombia. *N Engl J Med*. 2016;375(16):1513–23.
19. Iloos S, Mallet H-P, Goffart IL, Gauthier V, Cardoso T, Herida M. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Med Mal Infect*. 2014;44(7):302–7.
20. Oduyebo T, Igbinosa I, Petersen EE, Polen KND, Pillai SK, Ailes EC, et al. Update: interim guidance for health care providers caring for pregnant women with possible Zika virus exposure—United States, July 2016. *Morb Mortal Wkly Rep*. 2016;65(29):739–44.
21. Lirio Pe. Jamieson DJ, Powers AM, Honein MA. Zika virus. *N Engl J Med*. 2016;374(16):1552–63.
22. Amara A, Mercer J. Viral apoptotic mimicry. *Nat Rev Microbiol*. 2015;13(8):461–9.
23. Gratton R, Agrelli A, Tricarico PM, Brandão L, Crovella S. Autophagy in Zika virus infection: a possible therapeutic target to counteract viral replication. *Int J Mol Sci*. 2019;20(5):1048.
24. Meertens L, Labeau A, Dejarnac O, Cipriani S, Sinigaglia L, Bonnet-Madin L, et al. Axl mediates ZIKA virus entry in human glial cells and modulates innate immune responses. *Cell Rep*. 2017;18(2):324–33.
25. Bhattacharyya S, Zagórska A, Lew ED, Shrestha B, Rothlin C V, Naughton J, et al. Enveloped viruses disable innate immune responses in dendritic cells by direct activation of TAM receptors. *Cell Host Microbe*. 2013;14(2):136–47.

26. Tabata T, Pettitt M, Puerta-Guardo H, Michlmayr D, Wang C, Fang-Hoover J, et al. Zika virus targets different primary human placental cells, suggesting two routes for vertical transmission. *Cell Host Microbe*. 2016;20(2):155–66.
27. Komarasamy TV, Adnan NAA, James W, Balasubramaniam VRMT. Zika Virus Neuropathogenesis: The Different Brain Cells, Host Factors and Mechanisms Involved. *Front Immunol*. 2022;13:773191.
28. Muniz BC, Gasparetto EL, Marchiori E. Congenital involvement of the central nervous system by the Zika virus in a child without microcephaly-spectrum of congenital syndrome by the Zika virus. *J Neuroradiol*. 2018;45(2):152–3.
29. Schuler-Faccini L, Roehe P, Zimmer ER, Quincozes-Santos A, de Assis AM, Lima EOC, et al. ZIKA virus and neuroscience: the need for a translational collaboration. *Mol Neurobiol*. 2018;55(2):1551–5.
30. Besnard M, Eyrolle-Guignot D, Guillemette-Artur P, Lastère S, Bost-Bezeaud F, Marcelis L, et al. Congenital cerebral malformations and dysfunction in fetuses and newborns following the 2013 to 2014 Zika virus epidemic in French Polynesia. *Eurosurveillance*. 2016;21(13):30181.
31. Leal MC, van der Linden V, Bezerra TP, de Valois L, Borges ACG, Antunes MMC, et al. Characteristics of dysphagia in infants with microcephaly caused by congenital Zika virus infection, Brazil, 2015. *Emerg Infect Dis*. 2017;23(8):1253.
32. Botelho ACG, Neri LV, Silva MQF da, Lima TT de, Santos KG dos, Cunha RMA da, et al. Presumed congenital infection by Zika virus: findings on psychomotor development-a case report. *Rev Bras Saúde Matern Infant*. 2016;16:39–44.
33. Pinheiro TJ, Guimarães LF, Silva MTT, Soares CN. Neurological manifestations of Chikungunya and Zika infections. *Arq Neuropsiquiatr*. 2016;74(11):937–43.
34. Huang W-C, Abraham R, Shim B-S, Choe H, Page DT. Zika virus infection during the period of maximal brain growth causes microcephaly and corticospinal neuron apoptosis in wild type mice. *Sci Rep*. 2016;6:34793.
35. Miner JJ, Diamond MS. Zika virus pathogenesis and tissue tropism. *Cell Host Microbe*. 2017;21(2):134–42.
36. Hickman HD, Pierson TC. Zika in the brain: new models shed light on viral infection. *Trends Mol Med*. 2016;22(8):639–41.
37. Shaily S, Upadhy A. Zika virus: Molecular responses and tissue tropism in the mammalian host. *Rev Med Virol*. 2019;29(4):e2050.
38. Garcez PP, Loiola EC, da Costa RM, Higa LM, Trindade P, Delvecchio R, et al. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science (80-)*. 2016;352(6287):816–8.
39. Bayless NL, Greenberg RS, Swigut T, Wysocka J, Blish CA. Zika virus infection induces cranial neural crest cells to produce cytokines at levels detrimental for neurogenesis. *Cell Host Microbe*. 2016;20(4):423–8.
40. Gratton R, Tricarico PM, Agrelli A, Colaço da Silva HV, Coêlho Bernardo L, Crovella S, et al. In Vitro Zika Virus Infection of Human Neural Progenitor Cells: Meta-Analysis of RNA-Seq Assays. *Microorganisms*. 2020;8(2):270.

41. Bhatnagar J, Rabeneck DB, Martines RB, Reagan-Steiner S, Ermias Y, Estetter LBC, et al. Zika virus RNA replication and persistence in brain and placental tissue. *Emerg Infect Dis*. 2017;23(3):405.
42. Ribeiro RA, Mattos A, Meneghim MDC, Vedovello SAS, Borges TMD, Santamaria M. Oral and maxillofacial outcomes in children with microcephaly associated with the congenital Zika syndrome. *Eur J Orthod*. 2021;43(3):346–52.
43. Silva LV de O, Hermont AP, Magnani IQ, Martins CC, Borges-Oliveira AC. Oral alterations in children with microcephaly associated to congenital Zika syndrome: A systematic review and meta-analyses. *Spec Care Dent*. 2022;
44. Gyawali N, Bradbury RS, Taylor-Robinson AW. The global spread of Zika virus: is public and media concern justified in regions currently unaffected? *Infect Dis poverty*. 2016;5(1):37.
45. Bermudez-Tamayo C, Mukamana O, Carabali M, Osorio L, Fournet F, Dabiré KR, et al. Priorities and needs for research on urban interventions targeting vector-borne diseases: rapid review of scoping and systematic reviews. *Infect Dis poverty*. 2016;5(1):104.
46. Wang L, Liang R, Gao Y, Li Y, Deng X, Xiang R, et al. Development of Small-Molecule Inhibitors Against Zika Virus Infection. *Front Microbiol*. 2019;10.
47. Wiwanitkit V. The current status of Zika virus in Southeast Asia. *Epidemiol Health*. 2016;38.
48. Black A, Moncla LH, Laiton-Donato K, Potter B, Pardo L, Rico A, et al. Genomic epidemiology supports multiple introductions and cryptic transmission of Zika virus in Colombia. *BMC Infect Dis*. 2019;19(1):1–11.
49. Padilla JC, Lizarazo FE, Murillo OL, Mendigaña FA, Pachón E, Vera MJ. Epidemiología de las principales enfermedades transmitidas por vectores en Colombia, 1990-2016. *Biomédica*. 2017;37(2):27–40.
50. Towers S, Brauer F, Castillo-Chavez C, Falconar AKI, Mubayi A, Romero-Vivas CME. Estimate of the reproduction number of the 2015 Zika virus outbreak in Barranquilla, Colombia, and estimation of the relative role of sexual transmission. *Epidemics*. 2016;17:50–5.
51. Morris J, Orioli IM, Benavides-Lara A, de la Paz Barboza-Arguello M, Tapia MAC, de França GVA, et al. Prevalence of microcephaly: the Latin American network of congenital malformations 2010–2017. *BMJ Paediatr Open*. 2021;5(1).
52. Ospina ML, Tong VT, Gonzalez M, Valencia D, Mercado M, Gilboa SM, et al. Zika Virus Disease and Pregnancy Outcomes in Colombia. *N Engl J Med*. 2020;383(6):537–45.
53. Keith L, MOORE P, VN T, TORCHIA MG. *DEVELOPING HUMAN: Clinically Oriented Embryology*, 9e. Elsevier India; 2013.
54. McKeown SJ, Wallace AS, Anderson RB. Expression and function of cell adhesion molecules during neural crest migration. *Dev Biol*. 2013;373(2):244–57.
55. Simões-Costa M, Bronner ME. Establishing neural crest identity: a gene regulatory recipe. *Development*. 2015;142(2):242–57.

56. Keith M, Persaud TVN. Embriología clínica. 5 ta. 2008;
57. Graf D, Malik Z, Hayano S, Mishina Y. Common mechanisms in development and disease: BMP signaling in craniofacial development. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2016;27:129–39.
58. Yan Y, Zhang X, Wang G, Cheng X, Yan Y, Fu Y, et al. Zika virus induces abnormal cranial osteogenesis by negatively affecting cranial neural crest development. *Infect Genet Evol.* 2019;69:176–89.
59. Tonge PD, Andrews PW. Retinoic acid directs neuronal differentiation of human pluripotent stem cell lines in a non-cell-autonomous manner. *Differentiation.* 2010;80(1):20–30.
60. Enlow DH, TR SAPIÑA RENARD S. Crecimiento maxilofacial. 1984.
61. Fish JL. Evolvability of the vertebrate craniofacial skeleton. In: *Seminars in cell & developmental biology.* Elsevier; 2019. p. 13–22.
62. Naqvi S, Hoskens H, Wilke F, Weinberg SM, Shaffer JR, Walsh S, et al. Decoding the Human Face: Challenges and Progress in Understanding the Genetics of Craniofacial Morphology. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2022;
63. McKeown SJ. The genetic control of neural crest development in early craniofacial morphogenesis. 2004.
64. Jaramillo DC. Fundamentos de odontología: Odontología pediátrica [Internet]. 5ta ed. Biológicas C para I, editor. Bogotá; 2017. Available from: <http://www.ebooks7-24.com.bd.univalle.edu.co/?il=6035>
65. de Ferraris MEG, Muñoz AC. Histologa, embriologa e ingeniera tisular bucodental/Histology, embryology and oral tissue engineering. Ed. Médica Panamericana; 2009.
66. Bordoni N, Escobar A, Mercado RC. Odontologia pediatria/Pediatric Dentistry: La salud bucal del nino y el adolescente en el mundo actual/The Oral Health of Children and Adolescents in Today's World. Ed. Médica Panamericana; 2010.
67. Romero DM, Bahi-Buisson N, Francis F. Genetics and mechanisms leading to human cortical malformations. In: *Seminars in cell & developmental biology.* Elsevier; 2018. p. 33–75.
68. Bérubé-Simard F-A, Pilon N. Molecular dissection of CHARGE syndrome highlights the vulnerability of neural crest cells to problems with alternative splicing and other transcription-related processes. *Transcription.* 2019;10(1):21–8.
69. Larsen WJ, Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, Francis-West PH. *Larsen's human embryology.* Churchill Livingstone; 2009.
70. Mossey P. Global strategies to reduce the healthcare burden of craniofacial anomalies. *Br Dent J.* 2003;195(10):613.
71. Boulet SL, Boyle CA, Schieve LA. Health care use and health and functional impact of developmental disabilities among US children, 1997-2005. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2009;163(1):19–26.
72. Wehby GL, Cassell CH. The impact of orofacial clefts on quality of life and

healthcare use and costs. *Oral Dis.* 2010;16(1):3–10.

73. Rittler M, Cosentino V, López-Camelo JS, Murray JC, Wehby G, Castilla EE. Associated anomalies among infants with oral clefts at birth and during a 1-year follow-up. *Am J Med Genet Part A.* 2011;155(7):1588–96.
74. Hernández CP. Terapia miofuncional en los síndromes craneofaciales. *Boletín de AELFA.* 2012;12(2):54–60.
75. Groesen D, Chevrier C, Skytthe A, Bille C, Mølsted K, Sivertsen Å, et al. A cohort study of recurrence patterns among more than 54 000 relatives of oral cleft cases in Denmark: support for the multifactorial threshold model of inheritance. *J Med Genet.* 2010;47(3):162–8.
76. Groesen D, Bille C, Petersen I, Skytthe A, von Bornemann Hjelmberg J, Pedersen JK, et al. Risk of oral clefts in twins. *Epidemiology.* 2011;22(3):313.
77. Beaty TH, Marazita ML, Leslie EJ. Genetic factors influencing risk to orofacial clefts: today's challenges and tomorrow's opportunities. *F1000Research.* 2016;5.
78. Ludwig KU, Böhmer AC, Bowes J, Nikolić M, Ishorst N, Wyatt N, et al. Imputation of orofacial clefting data identifies novel risk loci and sheds light on the genetic background of cleft lip±cleft palate and cleft palate only. *Hum Mol Genet.* 2017;26(4):829–42.
79. Baggiani M, Dell'anno MT, Pistello M, Conti L, Onorati M. Human neural stem cell systems to explore pathogen-related neurodevelopmental and neurodegenerative disorders. *Cells.* 2020;9(8):1–31.
80. Moore CA, Staples JE, Dobyns WB, Pessoa A, Ventura C V, da Fonseca EB, et al. Congenital Zika syndrome: characterizing the pattern of anomalies for pediatric healthcare providers. *JAMA Pediatr.* 2017;171(3):288.
81. Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, Bell GW, Regev A, et al. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet.* 2008;40(5):499–507.
82. Simão D, Terrasso AP, Teixeira AP, Brito C, Sonnewald U, Alves PM. Functional metabolic interactions of human neuron-astrocyte 3D in vitro networks. *Sci Rep.* 2016;6(1):1–12.
83. Wei W-J, Shi B, Guan X, Ma J-Y, Wang Y-C, Liu J. Mapping theme trends and knowledge structures for human neural stem cells: a quantitative and co-word biclustering analysis for the 2013–2018 period. *Neural Regen Res.* 2019;14(10):1823.

3. CAPÍTULO II: Infección congénita por virus del Zika: efecto en el desarrollo craneofacial en niños entre 3-5años

3.1 INTRODUCCIÓN

El ZIKV fue declarado como pandemia pública por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en febrero de 2016, luego de demostrar su neurotoxicidad (1). Durante los brotes recientes de infección en Brasil, Colombia, Venezuela y América en 2015 fue posible relacionar el virus con consecuencias notables y no identificadas previamente, como la microcefalia y el síndrome de Guillain-Barré, que mostraron un aumento hasta de 20 veces, en su frecuencia (2–4). Los brotes que tuvieron el mayor impacto poblacional entre 2015 y 2016 fueron Brasil y Colombia (5,6). En el año 2016, hubo 9.799 casos confirmados de infección por Zika en Colombia según el Instituto Nacional de Salud (INS), de los cuales se reportaron en el Valle del Cauca 953 (7). Para el 2017, donde el sistema SIVIGILA lo incluye como evento notificable, se reportaron un total de 1901 casos confirmados de Síndrome congénito por Zika (SCZ), de los cuales el 50.7% fueron notificado en las principales ciudades del país, y de este porcentaje el 43% de los casos fueron reportados por la ciudad de Cali (Valle del Cauca), un total de 414 casos que incluyen en su mayoría mujeres y en edad fértil (7,8). Para el año 2019, el último informe del INS confirmó que para abril del 2017 se habían notificado 1239 casos de infección congénita en SIVIGILA, de los cuales 858 se confirmaron como posible infección por Zika y 356 de estos, desencadenaron eventos como microcefalia o síndrome congénito asociado a Zika en los bebés, la mayoría de estos confirmados en el Valle del Cauca (consultar <https://www.valledelcauca.gov.co/publicaciones/62572>).

Los efectos virales del ZIKV, como las malformaciones cerebrales congénitas, la disfunción del tronco del encéfalo, las disfunciones motoras y sensoriales inexplicadas y la microcefalia grave, se han estudiado en algunas poblaciones del mundo (9–11). La deficiencia del crecimiento cerebral debido a la microcefalia se acompaña de disfunción neurológica, que incluye hipertonía y hemiparesia, discinesia / distonía, artrogriposis, disfagia, epilepsia y persistencia de reflejos primitivos, que pueden asociarse con parálisis cerebral, discapacidad mental y deficiencias en el refinamiento de los movimientos motores reflejos y voluntarios (12,13). Sin embargo, estos efectos también se pueden presentar cuando la severidad de la infección no es evidente, e incluso cuando no se presentó la microcefalia (9,10). Estos hallazgos se podrían explicar por dosis de infección y/o carga viral, la duración de la exposición del feto al ZIKV durante el embarazo, el tipo y la virulencia de la cepa viral (9), el grado de tropismo neurológico del virus (14,15) y quizá otros factores relacionados con el sistema inmune y la susceptibilidad genética del binomio madre-feto, entre otras. Hoy se especula sobre el papel protector o agravante de las consecuencias de la infección por ZIKV, de las infecciones previas por otros flavivirus y/o la posibilidad que existan coinfecciones entre ZIKV-dengue, ZIKV - rubeola, ZIKV– CMV (16,17).

El síndrome neonatal se refiere a otros signos clínicos asociados con el ZIKV, por ejemplo: bajo peso al nacer, bebés con neurodesarrollo deficiente, calcificaciones cerebrales, entre otras (9,10). El mayor esfuerzo de investigación sobre la patogénesis del ZIKV se ha centrado en 1) la microcefalia y su complicación fundamentalmente neurológica relacionada con el recién nacido con infección por ZIKV y, 2) las complicaciones neurológicas en adultos (18). Las consecuencias neurológicas de la infección por ZIKV congénito están relativamente estudiadas y se describen en otros estudios (19,20).

Algunos de los aspectos de la patogénesis por el ZIKV se desconocen. No se han descrito los efectos de la infección congénita del ZIKV en el mediano o largo plazo, y menos se conocen los protocolos de rehabilitación de las secuelas de la infección y si la discapacidad generada por la infección congénita es autolimitada y existe la posibilidad de recuperar las funciones alteradas o perdidas, que garanticen la incorporación a la sociedad de aquellos afectados. Muchas las disciplinas deben interactuar para definir y promover los adecuados protocolos de rehabilitación (13,21,22); sin dejar de lado la importancia del autocuidado y la toma de medidas de protección para evitar las picaduras del mosquito entre las embarazadas (23); pues a pesar de que el ZIKV solo tiene efectos leves para la mayoría de pacientes adultos, el ZIKV se torna peligroso por su capacidad de interrumpir severamente el desarrollo de los recién nacidos tras la infección de madre a hijo o durante las relaciones sexuales, lo que aumenta el riesgo para la población en general (21). Además, la mayoría de personas del mundo no han estado expuestas al virus, lo que deja muchas regiones del mundo en riesgo si hay un resurgimiento de la epidemia; razón por la que hay que dirigir esfuerzos en investigación entorno a este tema (6,21).

El Sistema Nervioso Central (SNC), el cráneo, la cara y la interfase facial - bucal proviene de las Células de la Cresta Neural (CCN) que al diferenciarse originan ectomesenquima cefálico en el embrión incluyendo los tejidos blandos y duros en la maxila -mandíbula, la dentición decidua y permanente, los arcos faríngeos y los huesos de la nariz, el paladar, y los tejidos de protección periodontal como las encías, el hueso, el cemento, el ligamento periodontal, el esmalte dental y procesos faciales (24,25). Las CCN tienen la característica de diferenciarse según su ambiente extracelular en células premigratorias multipotenciales que dan origen a tejido neuronal del SNC o de morfología mesenquimal que dan origen a tejidos musculo esqueléticos, dentales y neuronales periféricos. El desarrollo mediado por las CCN está regulado espacialmente por una serie de fenómenos epigenéticos y la expresión inducida por el ambiente extracelular de genes específicos (p ej. WNT3, FoxD3, Pax3/7, AR, Notch, entre otros) (25,26). Se han descrito hallazgos diferenciales según las mutaciones de los genes y el nivel en donde se presenta la alteración. Algunas de alteraciones se deben a discrepancias mitóticas durante la condensación cromosómica, disfunción entre el centrosoma y la matriz pericentriolar, defectos de división celular, malformación del tubo neural, disrupción de la diferenciación y migración neuronal, entre otras (27).

El ZIKV con su tropismo neurológico tiene como células blanco las células neuronales pluripotenciales, astrocitos inmaduros y células neuronales maduras (15,28). La infección a nivel celular genera alteración de la división celular, inducción de muerte celular y variación funcional (15,26). Hay reportes que sugieren que hay cepas del Zika más neurotrópicas que otras (29).

Muchos de los efectos patogénicos a pueden seguir siendo estudiados, toda vez que los pacientes afectados durante la epidemia del 2015 tienen entre los 3 - 5 años de edad (13). Es también limitada la información disponible acerca de las alteraciones dentales y aquellas relacionadas con la audición, deglución, fonación, masticación y otras más complejas como el desarrollo del lenguaje y el aprendizaje en los niños expuestos durante la gestación al ZIKV (30,31). Existen hallazgos que sugieren una afectación diferencial en los tejidos precursores del SNC y los precursores mesenquimales y sus tejidos derivados (32,33), a pesar de su origen embriológico común. Los modelos *in vitro* se han convertido en una buena opción de ensayos para seguir construyendo la historia natural de la patogénesis del ZIKV (34) y desde la perspectiva transdisciplinar, poder incrementar la evidencia de esta enfermedad para entender mejor sus secuelas, los principios de diagnóstico y manejo clínico (6).

Reportes recientes en modelos animales y algunos en humanos documentan que hay alteraciones de desarrollo óseo, muscular, dental y nervios periféricos relacionados con la infección por el ZIKV (16,32,33,35). Los tejidos craneofaciales, la lámina dental, los gérmenes dentales, la mandíbula, el paladar, la lengua y los tejidos blandos y duros que son derivados de las células ectodérmicas precursoras podrían estar afectados como consecuencia de la infección ZIKV (32).

Adicionalmente, un buen patrón de desarrollo craneofacial va acompañado de una buena función que incluye nervios, arterias, músculos y ligamentos, que a su vez requieren del correcto desarrollo del sistema nervioso para la conducción de estímulos de los que depende su funcionamiento (30). El complejo craneofacial está involucrado con funciones complejas como son la succión, deglución, masticación, respiración, alimentación, audición, fonación, desarrollo del lenguaje, aprendizaje, y aquellas más sutiles como son el relacionamiento social y la expresión con emociones entre ellas quizá las más frecuentes sean el llanto y la sonrisa entre los humanos (36,37).

Por otra parte, es escasa la evidencia sobre los efectos en el desarrollo de la dentición primaria y permanente; además del tamaño, patrones miofuncionales y el curso del desarrollo craneofacial en niños infectados congénitamente por el ZIKV (33,35,38). Tampoco se entiende muy bien la reconocida diferencia de efectos de la infección congénita entre tejidos del SNC y los derivados de las CCN de morfología mesenquimal (8,13,32,33).

Evaluación clínica del desarrollo craneofacial

Medición antropométrica:

La antropometría es una técnica de medición muy usada como una medida para describir los cambios en las dimensiones y proporciones de las estructuras del cuerpo y de las regiones craneofaciales en diferentes etapas de la vida. La antropometría craneofacial se utiliza en etapas tempranas para describir cómo es desarrollo de las estructuras craneofaciales en las tres dimensiones del espacio frontal, sagital y vertical (39).

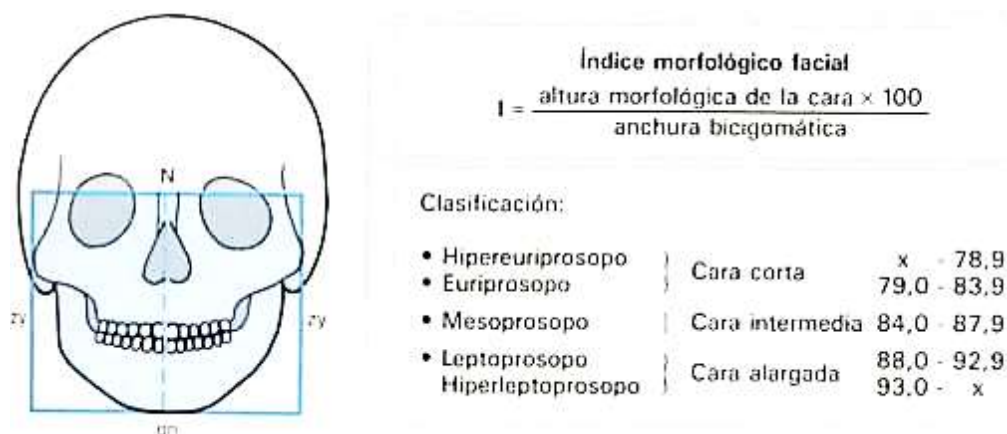
Índice Morfológico Facial:

En la morfología facial se evalúa la forma del cráneo y de la cara cuantitativamente,. Para esto, miden en el paciente puntos anatómicos específicos que con la ayuda de una operación matemática, se obtiene un valor numérico que nos acerca a hallazgos del crecimiento y desarrollo craneofacial del paciente en ese momento para detectar si hay alteraciones durante su crecimiento (40,41). El índice de longitud y anchura cefálica está basado en los diámetros máximos que se toman de La altura facial que va desde el punto Nasion a punto Gnation, y la anchura que es la unión de los dos puntos bicigomáticos, respectivamente. De esta manera se clasifica un cráneo alargado, en la norma o equilibrado, corto o muy corto. (**Figura II-1**) (42). Según Bedoya y Osorio en 2013 se puede clasificar al paciente tomando las mismas medidas y la misma operación matemática en Clase 1,2,3 o 4 dependiendo del resultado (**Figura II-2**) (42,43).

Figura II-1. Clasificación según el índice longitud y anchura cefálica (%): relación longitud y anchura expresada en porcentaje. (41,42)

Índice longitud/anchura cefálicas	
$I = \frac{\text{máxima anchura cefálica} \times 100}{\text{máxima longitud cefálica}}$	
Clasificación:	
• Dolicocefalia (cráneo alargado)	x - 75,9
• Mesocefalia	76,0 - 80,9
• Braquicefalia (cráneo corto)	81,0 - 85,4
• Hiperbraquicefalia	85,5 - x

Figura II-2. Índice morfológico facial (%) (41,42).



A partir de los puntos antropométricos a partir de los que se calcula el Índice Morfológico Facial expresado en porcentaje. (Zy: cigomático - gn: gonion - N: nasion).

Medición de anchura (40,44):

- a. **Perímetro cefálico:** Es la distancia circunferencial tomada entre bregma y la eminencia occipital.
- b. **Forma del cráneo:** Dolicocéfalo (contorno oval, alargado de adelante a atrás) Braquicéfalo (su anchura equivale aproximadamente a su largo) braquicéfalo (cráneo asimétrico por cierre unilateral de sutura coronal).
- c. **Frente:** Punto más lateral de la frente. Se deben palpar las dos prominencias laterales del hueso frontal como punto de referencia, luego se toma la medida con cinta flexible.
- d. **Bicigomática:** Distancia entre anchura de la cara superior Zigión-Zigión, Zg-Zg.
- e. **Cara inferior:** Distancia entre el punto Gonion-Gonion, Go-Go
- f. **Intercantal externa:** Distancia entre los cantos externos de los ojos ex - ex.
- g. **Intercantal interna:** Distancia entre los cantos internos de los ojos. In-In
- h. **Palpebral:** Se mide desde el canto interno al canto externo del mismo ojo.
- i. **Nariz:** Distancia entre el punto más lateral del ala de la nariz de cada lado (alar-alar).
- j. **Columnela:** Distancia entre ambos bordes de la columnela.
- k. **Filtrum:** Medida entre los dos pilares cph-cph
- l. **Boca:** Distancia intercomisural se mide entre los ángulos de ésta (Que-Que) punto más lateral de la comisura labial.

Análisis de tejidos blandos

La evaluación de los tejidos blandos permite determinar la forma, tamaño y posición que pueden modificar el perfil facial del paciente, lo que puede repercutir en el diagnóstico y pronóstico estético del tratamiento de ortopedia maxilar. Todas estas estructuras tienen influencia genética, pueden variar según la etnia del paciente, a su vez esta es variable según la edad, si es género masculino o femenino. Dentro

de los tejidos blandos independientes se consideran la lengua, los labios, todas las estructuras de participación miofuncional facial, intra y extraoral.

Medición de altura (40,44):

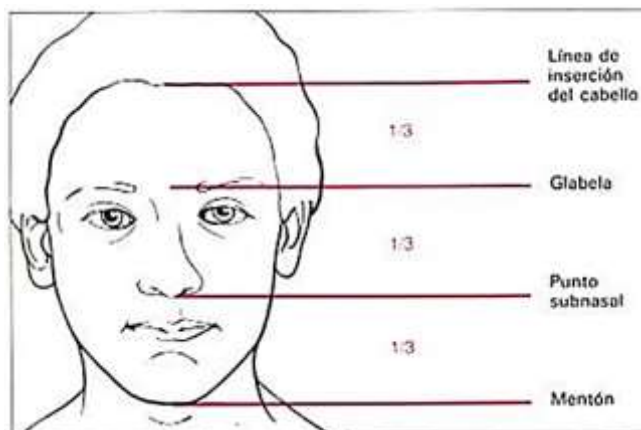
- a. **Craneofacial total:** Distancia existente entre el vértex y Gnation en el plano vertical.
- b. **Facial anterior:** Distancia existente entre (n-gn) en el plano vertical.
- c. **Nariz:** Distancia medida entre el punto nasion-subnasal
- d. **Longitud columnela:** La columnela es la estructura que divide ambas narinas.
- e. **Longitud filtrum:** Se mide desde la base de la nariz o subnasal (sn) hasta el borde superior del labio superior o bermellón (vm).

Medición de profundidad (40,44):

- a. **Longitud Anteroposterior de la cabeza:** Distancia tomada entre (G-Op) Glabella-Opistion.
- b. **Maxilar:** Distancia entre (t-sn) tragus-subnasal
- c. **Mandíbula:** Distancia entre (t-gn) tragus-gnation

Frente: La forma de la frente La altura de la frente se mide trazando una línea horizontal desde la inserción del cabello hasta la glabella, (en un paciente con armonía facial esta medida debería ser una tercera parte de la longitud total de la cara, en el paciente adulto esta medida debería de ser igual que la medida entre glabella y subnasal, de igual forma debe de medir igual de subnasal a mentón). Para clasificar la frente en ancha o estrecha esta se compara con el ancho bicigomático, y se puede clasificar también según su contorno en sentido lateral siendo una frente plana, prominente u oblicua (**Figura II-3**) (44,45).

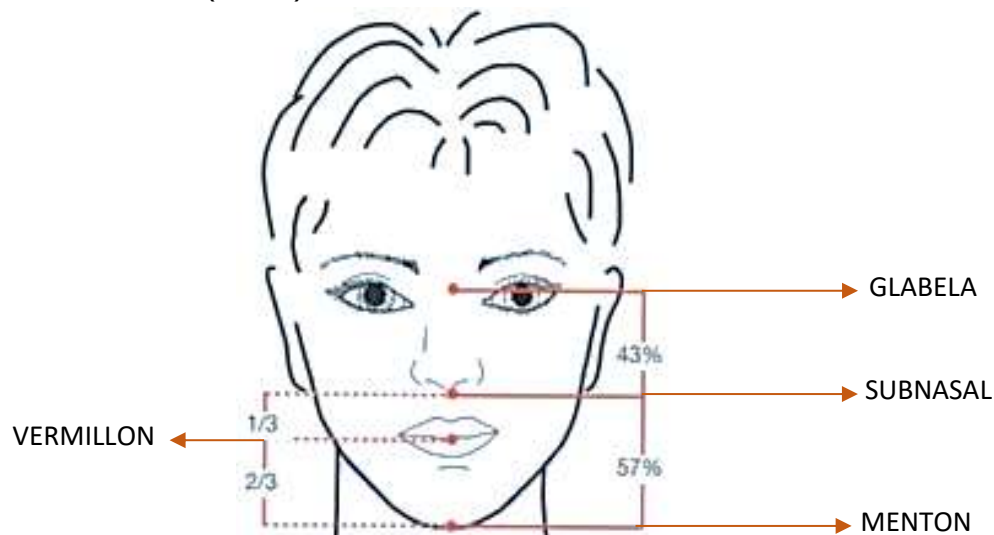
Figura II-3. Referencias anatómicas para medidas proporcionales de la cara (44,45).



Nariz: Para la valoración de la nariz se debe tener en cuenta historia de traumatismos previos, analizar tamaño y forma tanto del dorso de la nariz como de los conductos nasales, evaluar posibles desviaciones del tabique nasal. Todo lo anterior nos puede ayudar a descartar posibles alteraciones en la respiración nasal. La medida de la nariz en sentido vertical es un tercio de la altura total de la cara. El contorno de la nariz puede ser recto, convexo. Los orificios nasales por lo general son de forma ovalada y simétricos (42,45).

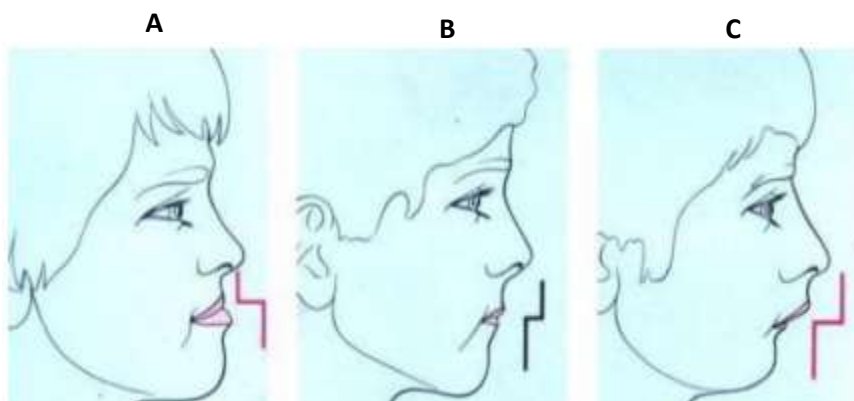
Labios: El labio superior en su longitud debe de ser un tercio de la altura inferior de la cara, pero el mentón y el labio inferior son dos tercios de la altura inferior de la cara. La posición del labio superior también está influenciada por la posición que tienen los incisivos superiores. Los labios pueden tener diferencias en su forma y posición, esto en respuesta a hábitos como la respiración oral, succión digital, succión labial, entre otros. Podemos encontrar labios armónicos, cortos e incompetentes (**Figura II-4**) (42,45).

Figura II-4. Referencias anatómicas para medidas proporcionales de la parte inferior de la cara (42,45).



Korkhaus define el perfil labial de la siguiente manera: 1. Escalón labial positivo (Se evidencia un adelantamiento del labio inferior comparado con el labio superior). 2. Perfil labial normal (Labio superior se encuentra algo por delante del labio inferior en el plano horizontal). 3. Escalón labial negativo (Labio inferior retraído con respecto al labio superior)(**Figura II-5**).

Figura II-5. Perfil facial según el acople labial (44): (A) Escalón positivo, (B) Perfil labial normal y (C) Escalón labial negativo



Mentón: La forma del mentón no solo depende de su estructura ósea sino del tejido blando que lo recubre y de la tonicidad del musculo mentoniano. La valoración del contorno del mentón se realiza teniendo en cuenta la posición del labio inferior y el pliegue mentolabial, ya que el perfil tanto del labio inferior como del surco nasolabial depende de los tejidos blandos del mentón. El crecimiento y desarrollo del mentón va a influir sobre el perfil del paciente y se puede clasificar el mentón en prominente (donde se encuentra el surco mentolabial pronunciado y perfil labial retraído), desarrollo negativo del mentón (donde no se observa surco mentolabial y perfil labial prominente) (44).

Lengua: Se hace la valoración de la forma, color, posición en reposo y durante la deglución y el tamaño. La lengua puede ser estrecha, ancha o larga. Se evalúa de igual forma su movimiento ya que se puede presentar alteraciones en este cuando la inserción del frenillo lingual es corta (44).

Frenillo labial y malar: Un frenillo labial que se encuentre sobre insertado puede ocasionar un diastema en los incisivos, lo que es más frecuente en el frenillo labial superior. De igual forma es importante hacer la valoración de los frenillos malares (44).

Encía: Al momento de hacer la valoración de la encía es importante tener en cuenta lo siguiente: El biotipo periodontal si es fibrosa, dura o delgada. Si existe presencia de inflamación gingival o alteraciones mucogingivales. Todo lo anterior es importante ya que cuando evidenciamos una lesión localizada puede ser muestra de una respiración oral, problemas oclusales o funcionales y en muchos casos por ingesta de medicamentos que tienen efectos secundarios en las encías (44).

Mucosa y paladar: Se valora el color, forma, consistencia y presencia de alteraciones tanto en mucosas como en paladar blando, duro, amígdalas y espacio faríngeo. También es importante evaluar las rugas palatinas y el tamaño y forma del

paladar duro si es profundo o no. Todo lo anterior puede influenciar en la posición de la lengua y la respiración del paciente (44).

Articulación temporomandibular: El examen debe ser lo más amplio posible, incluyendo una evaluación completa de la articulación temporomandibular (ATM).

- a. *Evaluación:* Durante apertura y cierre, movimientos de la mandíbula hacia los lados, cuestionar si hay dolores frecuentes en cabeza, músculos u oídos, presencia de ruidos durante la masticación, presencia de hábitos parafuncionales, preguntar si existe historia de trauma en la cabeza, el cuello o la mandíbula, dolor y fatiga muscular durante la masticación.
- b. *Examen extraoral:* Movimiento condilar durante la apertura / cierre de la boca (simétrico / no simétrico, sincronizado / no sincronizado). Auscultación de la ATM (presencia / ausencia de ruidos). Palpación de los músculos masetero y temporal (volumen y tonicidad). La palpación en la región de la ATM.
- c. *Examen intraoral:* Relación molar y canina. Presencia o ausencia de mordida cruzada. La pérdida prematura de dientes temporales. Desviación de la mandíbula. Overbite y Overjet. Apertura bucal (44).

Técnicas de evaluación de desarrollo craneofacial:

Los cefalogramas o radiografías cefálicas laterales estandarizadas, se emplean en el estudio del crecimiento y desarrollo craneofacial para describir en 2D la anatomía de los huesos craneales, los dientes y los tejidos blandos (46,47). Hacia el futuro, estudios cefalométricos en población latinoamericana, estratificados con parámetros diferentes del de la edad cronológica o basados en tomografía axial computarizada (TAC) en 3D y antropometría con fotografía en 3D, serán indispensables para describir más adecuadamente los cambios que se presentan en estas etapas del desarrollo humano (47).

Fotografías intraorales y extraorales: La fotografía clínica es una herramienta de diagnóstico, cada fotografía da valores clínicos que nos permiten identificar ciertas anomalías y patología. Podemos evaluar el perfil, morfología facial, análisis de tercios y quintos faciales, de igual forma evaluar posición de la cabeza, análisis de la sonrisa, asimetrías faciales y demás análisis que nos ayudan a llegar a un diagnóstico definitivo del paciente (48).

Estudios radiológicos: La radiografía panorámica nos permite realizar una evaluación de las siguientes estructuras anatómicas: Órbitas, Seno maxilar, Pared posterior del Maxilar, Apófisis coronoides, Canal infraorbitario, Techo del paladar, Cóndilos mandibulares, Cavidad nasal, Piso del Seno Maxilar, Borde Anterior del Seno Maxilar, Proceso Malar, Paladar Duro, Espina Nasal Anterior, Tuberosidad del maxilar, Línea oblicua, Septo nasal, Fosa Nasal, Apófisis pterigoides, Canal mandibular, Cornete nasal inferior, Fosa pterigo-palatina, Foramen mentoniano, Hueso Cortical del Borde inferior, Reborde Mentoniano, Angulo Mandibular, Borde Anterior de la Rama, Borde Posterior de la Rama, Fosa Glenoidea, Escotadura Sigmoides. Se realiza una descripción y

comparación del lado izquierdo con el derecho para descartar posibles alteraciones de forma, tamaño, al igual que cambios en la radiolucidez o radioopacidad de cada estructura anatómica. También nos ayuda a evaluar posición y ruta de erupción de dientes permanentes, dientes supernumerarios o agenesias (48).

Anomalías dentales (44,49):

1. Anomalías en la iniciación y proliferación o etapa de brote:

a. Por falta de desarrollo: Ausencia congénita de dientes.

- Anodoncia (ausencia de todos los dientes temporales o permanentes)
- Oligodoncia (ausencia de 6 dientes sin contar el tercer molar)
- Hipodoncia (ausencia de 1 o varios dientes)
- Agenesia (ausencia de 1 diente)

a. Por exceso de desarrollo:

- Dientes supernumerarios: Exceso de número de dientes, se puede presentar en dientes temporales y permanentes, no tiene un sitio específico de la boca, pero se da con una mayor frecuencia en la maxilar zona anterior y región de molares. Se pueden catalogar supernumerarios cuando la anatomía se asemeja a la de un diente normal.

2. Anomalía en la Histodiferenciación:

a. Por falta de desarrollo:

- Amelogénesis imperfecta: (Hipoplásico: el esmalte no alcanza su espesor completo, se observa superficie rugosa o lisa. Hipomineralizado: el esmalte presenta pocos minerales y se observa moteado. Hipomaduro: defecto del esmalte cualitativo, pero no tan severo como el hipomineralizado, el esmalte se fractura fácilmente).
- Dentinogénesis imperfecta: (Tipo I: se presenta junto con la osteogénesis imperfecta. Tipo II: solo afecta a la dentina, se asocia a defectos en el colágeno tipo IV. Tipo III: denominados dientes en concha).

b. Displasia de la dentina: Formación de coronas dentales con estructura anormal de la dentina.

- Displasia de la dentina tipo I (se forman dientes sin raíz y con mineralizaciones globulares en la pulpa)
- Displasia de la dentina tipo II (dientes con raíces cortas que se obliteran rápidamente, son dientes con movilidad y que se exfolian rápidamente).

3. Anomalía en la Morfodiferenciación: Alteración en tamaño y forma.

- a. Por falta de desarrollo: *Microdoncia* (menor tamaño de los dientes, puede ser un diente o de manera generalizada)
- b. Por exceso de desarrollo: *Macrodoncia* (mayor tamaño de los dientes)
- c. Perlas del esmalte: Formaciones en gota de esmalte ectópico que pueden estar sobre el esmalte o sobre el cemento.
- d. Dens evaginatus: Crecimiento hacia afuera del órgano del esmalte dando como resultado una cúspide en la superficie oclusal de premolares.
- e. Dens invaginatus: Invaginaciones del tejido durante la morfodiferenciación dental. Estas pueden ser coroneales o radiculares.
- f. Incisivos en forma de pala: Anomalía que se caracteriza por depresión del lóbulo medio de los incisivos superiores.
- g. Hiper cementosis: Desarrollo excesivo del cemento sobre la superficie radicular.
- h. Geminación: De un germen se origina un diente doble.
- i. Dilaceraciones radiculares: Pueden ser dilaceraciones radiculares o corono-radiculares. Son el resultado de trauma mecánico severo y agudo.
- j. Taurodontismo: Mayor altura apico-coronal de la cámara pulpar, esta no presenta la constricción en la unión amelocementaria. Coronas altas.
- k. Fusión: La fusión es la unión de dos gérmenes dentales separados en desarrollo y como resultado se forma una sola estructura dental grande. Puede ocurrir entre dos dientes normales o entre uno normal y un supernumerario.
- l. Concrescencia: Tipo de fusión dentaria en dientes ya formados adyacentes unidos por cemento.

Estadios de Nolla:

Las diversas etapas de la formación de las piezas dentarias permanentes han sido descritas por la Dra. Carmen Nolla (1960), que distingue diez fases, con una fase 0, ausencia de cripta al examen radiográfico, hasta la fase 10 que significa cierre apical. De acuerdo con el grado de maduración observado en el germen permanente seleccionado, la edad dentaria, será hallada por medio de una tabla de referencia, individualizada según el sexo: es la tabla de maduración de Carmen Nolla. Este estudio se basa en la observación radiográfica en una imagen radiológica panorámica de los maxilares (50,51).

Cronología y secuencia de erupción dental:

La erupción dental es variable entre un paciente y otro ya que en este proceso hay influencia de factores como la raza, el sexo, la nutrición, enfermedades sistémicas, entre otros. La exfoliación de los dientes deciduos y la posteriormente erupción de los permanentes forma parte del continuo proceso de crecimiento del cuerpo. La erupción de los dientes temporales se inicia al sexto mes y termina a los dos años aproximadamente, por otro lado, los dientes permanentes, en la medida que reemplazan a los temporales, erupcionan desde los seis años hasta los 12 años, sin contar a los terceros molares, ya que la agenesia e impactación hace que su erupción presenta una amplia variabilidad que va desde los 16 años hasta los 25

años. No obstante, el ritmo de crecimiento y desarrollo determinado por la relación entre la genética y el patrón étnico, la distribución geográfica, tipo de alimentación y las enfermedades dentales y sistémicas pueden afectar la cronología y, en menor grado, la secuencia de erupción de los dientes temporales y permanentes, bien retrasando o adelantando la erupción (52).

Evaluación de la maloclusión:

Maloclusión transversal:

Índice de Bogue: Este índice evalúa el espacio del arco dental en sentido transversal, está compuesto por dos reglas: primero la distancia que existe entre la cúspide palatina del primero molar temporal derecho hasta la cúspide palatina del primer molar temporal izquierdo (30mm); si es menor se considera micrognatismo transversal y si es mayor habrá sobre expansión. La segunda: a los 5 años deben estar presentes diastemas entre los incisivos o como lo cataloga Baume un arco abierto o arco tipo I. Su ausencia es producto de macrodoncia en dentición primaria y micrognatismo transversal de ambos maxilares (45,53).

Arcos abiertos o cerrados: (Baume 1950)

Arco tipo I: Con presencia de espacios en la región anterior o abierto.

Arco tipo II: Ausencia de espacios o cerrado.

Estos espacios los llamó primates; situados entre los incisivos laterales y los caninos superiores y entre caninos y los primeros molares inferiores; tienen especial importancia en el cambio de la dentición porque permiten el movimiento mesial de los dientes posteriores cuando hacen erupción los primeros molares permanentes y facilitan posición normal de oclusión. Estudios demuestran que los espacios interincisivos no aumentan con el crecimiento y por el contrario, tienden a disminuir. La falta de espacios primates puede ser por micrognatismo transversal del maxilar o a dientes de volumen mayor de lo normal, y son indicios de anomalías futuras en la dentición permanente, especialmente apiñamiento de sector anterior (45,53). La oclusión funcional es donde las superficies oclusales al momento de contactar unas con otras no presentan interferencias para los movimientos mandibulares. Las maloclusiones son un conjunto de alteraciones donde el sistema estomatognático se encuentran en desarmonía con los segmentos dentarios (54). En Colombia, según el ENSAB IV en 2014, la población de 5 años presentó una relación molar de plano terminal recto en más del 70%, el escalón mesial bilateral se encontró en el 21%. Se evidenció que el 71% de los niños presentaba una sobre mordida horizontal normal, el 12.5% se encontraba aumentada, y el 3.7% presentaban una mordida cruzada anterior; además, casi el 3.9% presentaba mordida cruzada posterior bilateral (55).

Relación molar: Para clasificar la oclusión en la dentición primaria, se utiliza como guía los planos terminales (relación anteroposterior), siendo la relación mesodistal entre las superficies distales de los segundos molares primarios superior e inferior cuando estos contactan entre sí:

- *Plano terminal recto* (la superficie distal de los segundos molares deciduos superiores e inferiores están al mismo nivel o en un plano vertical).
- *Escalón mesial* (la superficie distal de los segundos molares deciduos inferiores está más hacia mesial con respecto a la superficie distal del segundo molar deciduo superior)
- *Escalón distal* (la superficie distal de los segundos molares deciduos inferiores está más hacia distal con respecto a la superficie distal de los segundos molares deciduos superiores) (53,56).

Clasificación de Angle: Angle clasificó las maloclusiones en dentición permanente de la siguiente manera:

- Clase I (normoclusión): Cúspide mesovestibular del primer molar permanente superior ocluye en el surco mesovestibular del primer molar inferior.
- Clase II (distoclusión) Cúspide mesovestibular del primer molar permanente superior ocluye en la vertiente distal del segundo premolar inferior.
- Clase III (mesoclusión) Se presenta cuando en oclusión habitual el primer molar inferior permanente se encuentra en sentido mesial en relación con el primer molar permanente superior (57,58).

Relación canina: Se clasifica la relación canina según la posición de la cúspide del canino deciduo superior con respecto al canino inferior y el primer molar deciduo:

- Clase I: La cúspide del superior coincide en el plano vertical con la superficie distal del canino inferior.
- Clase II: La cúspide superior está anterior a la cara distal del canino inferior.
- Clase III: La cúspide superior está posterior a la cara distal del canino inferior.

El plano terminal y la relación canina se mantienen durante el período de la primera dentición y todo cambio se debe a factores extrínsecos ambientales. La relación canina permanece también constante después de la alteración del plano terminal en la erupción de los primeros molares permanentes (53,59).

Oberjet-Oberbite: Normalmente los incisivos primarios son casi perpendiculares al plano oclusal con una ligera sobremordida. Se puede considerar como normal y la más común, cuando los incisivos superiores cubren un tercio de la corona de los inferiores. Si inmediatamente después de erupcionados todos los dientes se observa que esta medida se excede, deben sospecharse alteraciones de la relación vertical. El grado de sobremordida en la dentición primaria parece ser uno de los factores determinantes en la formación de la sobremordida en la dentición permanente. Si es severa en la dentición el pronóstico es desfavorable, mientras que si leve generalmente sigue siendo así en la dentición mixta, sin mayores

consecuencias desfavorables. Se considera que el overbite está bien, cuando el borde incisal de los centrales inferiores contacta la superficie palatina del incisivo central superior temporal en oclusión; borde a borde cuando había contacto de los bordes incisales; y aumentado, cuando se cubría más del 20% del incisivo inferior. Se registra mordida abierta cuando hay espacio entre los bordes incisales. El overjet se reporta como ideal, cuando la relación de los incisivos superior e inferior en sentido horizontal no exceda los 2 mm; aumentado, si excede los 2 mm bordes a borde; y cruzado cuando el borde incisal del inferior estaba por delante del borde incisal del superior (60).

Hábitos nocivos: El hábito nocivo o deletéreo está definido como un comportamiento que es adquirido por el paciente que genera un estado de plenitud y satisfacción. Cuando se realiza de manera continua se convierte en algo automático y de forma inconsciente. Este genera patrones de contractura muscular que pueden cambiar el patrón de crecimiento facial del paciente y generar maloclusiones. El hábito va a ocasionar más daño dependiendo de la cantidad de tiempo en que el paciente lo realice, su intensidad, frecuencia, posición de los dedos u objetos y como tal de las características del objeto utilizado. Estos hábitos nocivos pueden ser: biberón, succión de chupo y digital, succión o mordida de objetos, succión y mordida del labio, onicofagia, succión de lengua; deglución atípica, respiración oral, entre otros (61).

Alteraciones congénitas del desarrollo

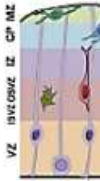
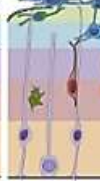
Las CCN gran plasticidad por factores perjudiciales durante el desarrollo embrionario, este proceso principalmente mediado por genes específicos como WNT3, FoxD3, Pax3/7 y otros (Tabla II-1), diferencian la lámina del ectodermo y se regulan positivamente para estabilizar este estado específico de diferenciación que resulta en el mantenimiento de una serie de genes condicionantes en la cresta neural delaminante y migratoria (25). El desarrollo del cráneo y la cara también ocurre en relación con el cerebro anterior medio y rombencéfalo (24,62). La mayoría de las malformaciones congénitas involucran tejidos craneofaciales, y la señalización BMP es una de las vías de señalización clave que regulan su desarrollo (30,36). Las CCN se ven afectadas por mutaciones en la vía BMP (30). El desarrollo dental, la mineralización dental y el desarrollo de la raíz dental se relacionan con interacciones epitelio-mesenquimales mediadas por la señalización de BMP igual que la morfogénesis del paladar. Por todo esto las mutaciones en la vía BMP, en el contexto con mecanismos celulares y moleculares comunes, proporcionan una perspectiva para futuras direcciones de investigación, incluida la ingeniería de tejidos (36).

Microcefalia como desorden congénito

La microcefalia es una afección definida como el menor tamaño de la circunferencia de la cabeza presente al nacer (microcefalia congénita) o más adelante en la vida (microcefalia postnatal o adquirida). Los niños con microcefalia postnatal tienen un

tamaño normal de cabeza al nacer y luego no logran tener un crecimiento normal de la cabeza (63). Se categoriza la severidad de la microcefalia como **moderada** si la medida está por debajo de 2 SD del promedio de la población y **severa** por debajo de 3 SD por debajo del promedio de la población (26,63). El diagnóstico clínico de la microcefalia comúnmente se realiza identificando alteraciones fenotípicas a través de ultrasonografía (64) y con imágenes de resonancia magnética (65). Los estudios de genética han caracterizado varios de las alteraciones génicas y sus efectos con alteraciones específicas durante el desarrollo embrionario (**Figura II-6**) (26):

Figura II-6. Malformaciones corticales y alteraciones genéticas (26).

	Normal/ Control	Cobblestone Lissencephaly	PVH Heterotopia	Subcortical Band Heterotopia (SBH)	Agyria Lissencephaly	Congenital Microcephaly	Microcephaly with Lissencephaly
MRI							
CM schema							
Genes		FKTN, POMT1, POMT2, POMGNT1, POMGNT2, POMK, PKRP, LAROE, LAMBT, TMTC3, ISPD, TMEM5, B4GAT1, GPR56, B3GALNT2, DAG1	FLNA, ARFGEF2, C6orf70, FAT4, DCHS1, LRP2, NEDD4L	DCX, KIF2A, LIS1, TUBA1A, TUBB1 (EML1-atypical)	LIS1, DCX, ARX, TUBA1A, TUBB3, TUBG1, CDK5, VLDLR, ACTG1, ACTB With microcephaly: DYNC1H1, RELN	ASPM, CKSRAP2, MCPH1, CEPF, WDR62, STX, RNL1, CEP150, CDK6, CEP152, CEP63, KIF2A, TUBB, TUBB3, DYNC1H1, RTTN, EOMES, PAX6, RAB3GAP1, RAB3GAP2, RAB11	WDR62, NDE1, TUBB3, CIT, KIF5C, CDK5, TUBA1A, TUBB8, KIF11, LIS1
General mechanism							

VZ= zona ventricular, ISVZ/OSVZ= Zona subventricular interna/externa, IZ= zona interna, CP= plano cortical y MZ= zona marginal.

Se sabe modificaciones genéticas que pueden tener como resultado la alteración congénita, sin embargo, la mutación o la modificación génica puede ser singular, pero tiene un efecto desencadenante en la codificación de otros genes con los que el principal tiene interacción (25,27,66). Para la microcefalia primaria hay revisiones que han caracterizado los principales genes como causa principal de la patología congénita (**Tabla II-1**) (27). La microcefalia primaria autosómica recesiva, está asociada con mutaciones de un solo gen que dan como resultado una microcefalia aislada con imágenes de resonancia magnética (MRI) a menudo normales y ningún otro hallazgo del examen físico. La incidencia actual varía de 1.3-1.5 / 100,000 dependiendo del nivel de consanguinidad de la población. A diciembre de 2016, se han identificado 17 genes (MCPH1-17), 12 de estos se presentan en la Tabla 3 (63). Las mutaciones involucradas son a menudo codones de parada prematuros que provocan la interrupción de la progresión del ciclo celular, causando anomalías en los centrómeros que conducen a una apoptosis temprana (27,63,67). Algunas de las alteraciones genéticas son discrepancias mitóticas durante la condensación

cromosómica, disfunción entre el centrosoma y la matriz pericentriolar, defectos de división celular, malformación del tubo neural, disrupción de la diferenciación y migración neuronal, entre otras (27,68).

Tabla II-1. Genes relacionados con microcefalia Primaria (27).

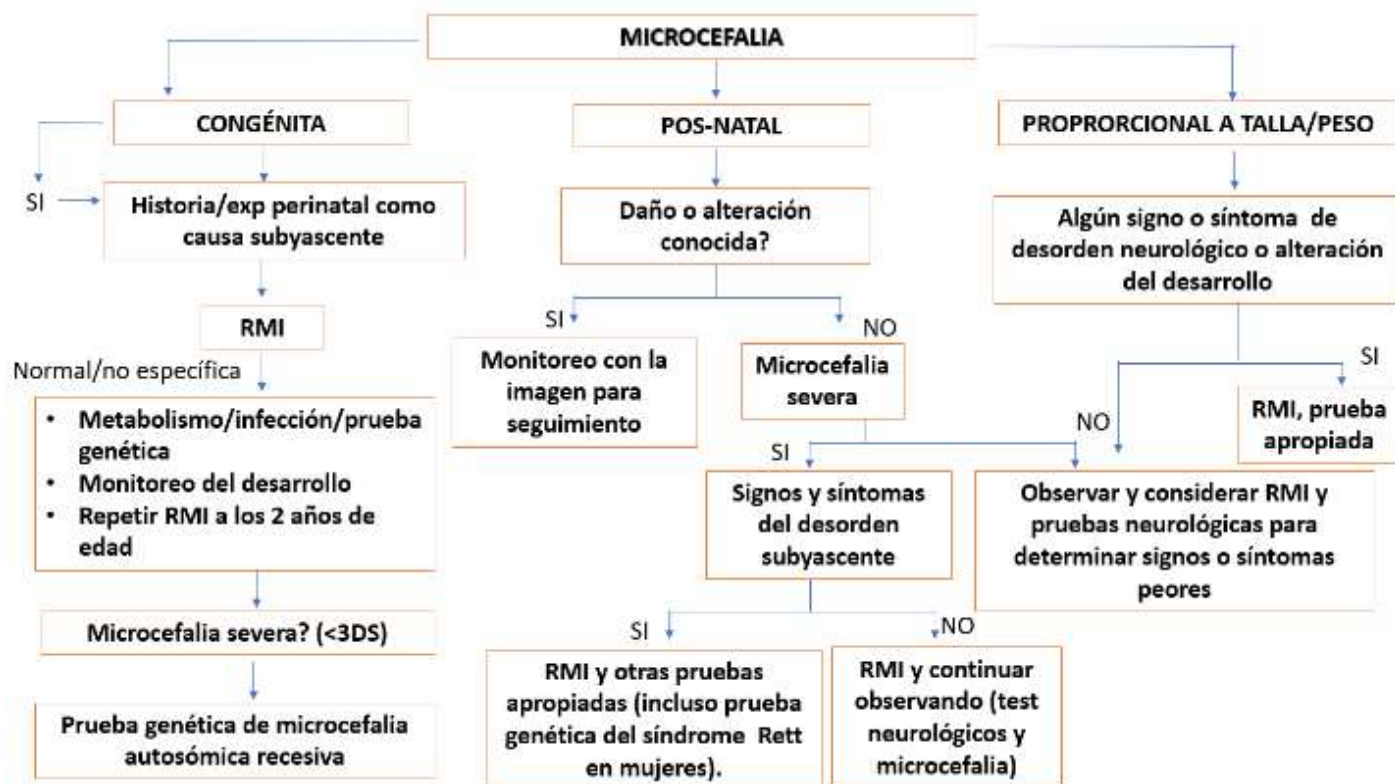
SIGLA	NOMBRE	LOCUS	LOCALIZACIÓN INTRACELULAR	FUNCIÓN
MCPH1	Microcephalin	8p23.1	Núcleo	Condensación cromosómica, mejora la producción de neuronas tempranas, que comprenden capas profundas (IV-VI), y reduce las neuronas tardías, que producen la capa de corteza externa más delgada (II-III).
MCPH2	WDR62	19q13.12	Núcleo/Centrosoma/ Precursores neuronales/neuronas Post-mitóticas	Desarrollo cortical cerebral, proliferación y migración de precursores neuronales, la mutación en WDR62 afecta su papel en la proliferación y migración de precursores neuronales y causa malformaciones cerebrales graves..
MCPH3	CDK5RAP2	9q33.2	Centrosoma	Regula la función de los microtúbulos, la mutación en CDK5RAP2 reduce el conjunto de progenitores/disminuye el número de neuronas y reduce la supervivencia celular.
MCPH4	CASC5	15q15.1	Cinetocoro	Vital para el punto de control del huso del ciclo mitótico, CASC5 subraya el papel de la integridad del cinetocoro en el desarrollo volumétrico adecuado del cerebro humano.
MCPH5	ASPM	1q31.3	Pericentrosoma	Orientación de los husos mitóticos durante la neurogénesis embrionaria, las mutaciones ASPM pueden disminuir el tamaño del cerebro al influir en la orientación del huso mitótico.
MCPH6	CENPI	13q12.12	Centrosoma/neuroepitelio de corteza frontal	Controla la longitud del centríolo/función de microtúbulos, su eliminación causa una mayor incidencia de múltiples polos del huso, apoptosis y detención de la mitosis
MCPH7	STIL	1p33	Pericentrosoma	Regulador de la apoptosis / progresión del ciclo celular, su mutación en el pez cebra causa un defecto letal embrionario, y los ratones inactivados con STIL (Sil - / -) exhiben numerosas anomalías del desarrollo / disminución del tamaño / tubo neural defectuoso en la línea media.
MCPH8	CEP135	4q12	Centrosoma	Mantiene la organización / estructura del centrosoma, la caída de CEP135 mostró una disminución de la tasa de crecimiento / microtúbulos desorganizados.
MCPH9	CEP152	15q21.1	Centrosoma	La duplicación del centríolo / forma a célula / polaridad / motilidad, la conversión de glutamina en prolina altera el dominio de proteínas en espiral en espiral / tamaño de cabeza reducido.
MCPH10	ZNF335	20q13.12	Núcleo	La división / diferenciación de células progenitoras, el gen ZNF335 mutado causa la degeneración de las neuronas, la caída de ZNF335 causó un tamaño cerebral pequeño con una corteza ausente / proliferación interrumpida y diferenciación de las células neuronales.
MCPH11	PHC1	17p13.31	Núcleo	Regula el ciclo celular, la mutación PHC1 destaca el papel de la remodelación de la cromatina en la patogénesis de la microcefalia primaria.
MCPH12	CDK6	7q21.11	Citoplasmático/ nuclear	Controla el ciclo celular / organiza los microtúbulos, la mutación CDK6 afecta la proliferación de células precursoras neuronales apicales / reduce el conjunto de progenitores / disminuye la producción neuronal / microcefalia primaria.

Existen otros tipos de microcefalia secundarios a otras condiciones que se dan durante el embarazo, que cada vez se esclarecen más con los avances de secuenciación de exomas; hay más de 800 síndromes conocidos con microcefalia como asociación conocida y más de 900 condiciones de herencia mendeliana en línea en el hombre (OMIM) relacionadas con la microcefalia. Las alteraciones ambientales durante el embarazo incluyen lesiones hipóxicas, anomalías metabólicas maternas como la fenilcetonuria (PKU), la exposición al teratógeno y las infecciones pueden interferir con el desarrollo del cerebro y provocar microcefalia congénita (63). La microcefalia asociada a infección materno-fetal es diferencial en origen, pero la fisiopatología es muy similar, pues se relacionan básicamente con formación disminuida de la masa cerebral (principalmente cortical), debido a las alteraciones de mecanismos de diferenciación y patrones alterados de migración neuronal (**Figura II-7**) (27,63,69,70).

Los patógenos principalmente asociados a microcefalia son los neurotrópicos intracelulares, que pueden infectar varios tipos de células del sistema nervioso

central causando daño tanto en etapas del desarrollo como en la edad adulta, Tabla II-2 (69).

Figura II-7. Tipos de diagnóstico de microcefalia según su etiología (63).



Las infecciones congénitas que causan microcefalia se conocen como infecciones TORCH (toxoplasmosis, otras infecciones (sífilis, varicela zoster, parvovirus B-19), rubéola, citomegalovirus (CMV) y virus del herpes). Además de la microcefalia, los niños con estas infecciones intrauterinas a menudo tienen otros hallazgos clínicos anormales que pueden incluir hepatoesplenomegalia, erupciones cutáneas, coriorretinitis y calcificaciones intracraneales (**Tabla II-2**) (63,69). Recientemente, un aumento en el número de infecciones prenatales por el ZIKV se ha relacionado con la microcefalia y otras anomalías cerebrales graves. En la siguiente tabla se muestran las consecuencias de este grupo de patógenos comparadas con las del ZIKV (69):

Tabla II-2. Anomalías asociadas a patógenos neurotrópicos asociados a síndrome congénito y microcefalia.

	ZIKV	CMV	Rubella virus	T.gondii
Microcefalia	+	+	+	
Restricción del crecimiento IU	+	+	+	
Calcificaciones cerebrales	+	+	+	
Pérdida de audición sensorial	+	+	+	
Hidroencefalo, hidrocefalia o ventriculomegalia	+	+	-	
Displasia cortical	+	+	+	
Hipoplasia o aplasia cerebelar	+	+	-	
Encefalitis o meningoencefalitis	+	+	-	
Microftalmia	+	+	+	
Atrofia del nervio óptico	+	+	+	
Cataratas	+	-	+	
Disfunción hepática	-	+	+	
Tipo de Virus	Flavivirus(RNA)	Herpesvirus(DNA)	Togavirus(RNA)	Protozoan(intracelular)
*Agentes clásicos TORCH				

Tabla adaptada de artículo: Keighley, C. L., Skrzypek, H. J., Wilson, A., Bonning, M. A., & Gilbert, G. L. (2019). Infections in pregnancy. *The Medical Journal of Australia*.

La destrucción de los tejidos se da tanto por la infección del patógeno como por la respuesta inflamatoria que inducen: adelgazamiento de la masa cortical del cerebro, hipoplasia o incluso aplasia de algunas partes del SNC como el cuerpo calloso o cerebelo. La pérdida de tejido cerebral se acompaña de otras características como consecuencia: ventriculomegalia, hidrocefalus, hidrencefalia o microcefalia (4).

Alteraciones dentales y de tejidos blandos asociadas al Virus del Zika:

Recientemente estudios realizados en Brasil han evidenciado retraso en la erupción dental temporal, de igual manera se encontró alteración en la secuencia de erupción dental, en la valoración de la lengua encontraron una mala posición, paladar estrecho, frenillo labial y lingual sobreinsertados (71).

En 2019 reportes de un estudio hablan sobre manifestaciones orales durante la etapa de erupción dental en estos pacientes, encontraron un aumento en la salivación que puede ser normal durante este proceso, cambios de ánimo como irritabilidad y prurito o malestar en las encías (38). Se realizó la descripción de cronología y secuencia en la erupción de los dientes deciduos en niños con microcefalia debido a la exposición fetal al virus Zika en este artículo se encontró un retraso en la cronología de erupción en los dientes temporales teniendo un tercio de la población con la erupción del primer diente a los 11 meses, y de los demás dientes con un promedio entre 17.9 a 20.4 meses en el maxilar y en la mandíbula fue de 11.5 y 20.2. Por otra parte, la secuencia de erupción se dio en el orden 64-51-62-61-52-54- 53-63 para el maxilar y 71-72-82-84-81-74-73-83-82 para la mandíbula (72). Se registró la descripción de las alteraciones presentes en cavidad oral en niños con síndrome congénito por Zika (SCZ) y se evidenció alteración en la cronología de erupción en 46,9% de los casos, se presentó anquiloglosia en un solo paciente, paladar de forma ojival y alteración en el esmalte como lo es la hipoplasia en el 28,1% de los pacientes (73).

En resumen, las características craneofaciales del SCZ descritas en la literatura, además de la microcefalia son anatómicas como: alteración en la cronología de la erupción dental, micrognatia, maloclusión, inserción baja de las orejas, anquiloglosia y paladar ojival; además de otras que son funcionales como: posición alterada de la lengua en reposo, sialorrea, incompetencia labial y bruxismo (74–76).

Desde una perspectiva clínica, en este Capítulo se pretende describir el desarrollo craneofacial, dental, oclusal en un grupo de niños con infección congénita por ZIKV en el Valle del Cauca y compararlo con niños de edad similar, sanos y nacidos en el Valle del Cauca.

3.2 Metodología

Tipo de estudio:

Fue un estudio observacional descriptivo con un análisis exploratorio de casos y controles transversal de los niños con y sin exposición congénita al ZIKV en el Valle del Cauca-Colombia durante el período epidémico, entre septiembre de 2015 a julio de 2016.

Población y muestra

La población universo fueron los hijos de madres expuestas durante el período epidémico del ZIKV, septiembre de 2015 a julio de 2016 en Valle del Cauca-Colombia.

Para el cálculo del tamaño de muestra se tuvo en cuenta datos reales notificados en Brasil y algunas cifras reportadas en Colombia. Tomando una estimación de un total de 5.500.000 habitantes aproximadamente en riesgo para los departamentos del Valle del Cauca y Cauca, una frecuencia anticipada de 28,7% de casos positivos según los reportes del INS en Colombia, un error aceptado del 5% y un DEFF=1, a través de la fórmula de estimación de la frecuencia en una población finita con la ecuación:

$$n = [EDFF * Np(1-p)] / [(d^2/Z^2_{1-\alpha/2} * (N-1) + p * (1-p)]$$

Proporción de casos= 28%

Proporción de controles expuestos= 72%

OR estimado= 6.61

Confianza 95%

Poder 80%

Proporción de caso por cada control= 1

La población de estudio calculada fue 20 niños de madres expuestas con un grupo control de 20 niños de madres no expuestas al ZIKV durante su periodo de gestación, con confirmación con IgM/IgG y/o confirmación clínica, de una cohorte

de niños de la Secretaría de Salud del Valle del Cauca, manejada en una IPS de infectología pediátrica de la ciudad de Cali (77). El grupo de análisis finalmente fueron 14 niños del grupo con Síndrome Congénito por virus del Zika (SCZ) y 12 niños sanos apareados por edad y procedencia (con infección congénita por ZIKV u otra exposición sindrómica o congénita de riesgo descartada); debido a dificultades presentadas durante el período de aislamiento en la pandemia por Covid-19. Ambos grupos de niños asistirán a control en el Servicio de Odontopediatría de las Clínicas de la Escuela de Odontología de la Universidad del Valle, una vez se termine el estudio.

Criterios de selección

Criterios de inclusión

- Hijos de madres con infección por ZIKV durante el embarazo, en período epidémico en Colombia; confirmada o descartada con laboratorios.
- Niños de madres que acepten participar del estudio, firmen consentimiento informado y en caso de ser menor de edad: el asentimiento informado con padres que firmen el consentimiento informado.

Grupo de comparación

- Hijos de madres sin infección congénita por el ZIKV ni alguna exposición congénita de riesgo, nacidos en la época epidémica del ZIKV en Colombia.

Criterios de exclusión

- Hijos de madres con síndromes diferentes como los patógenos del complejo TORCH.

Trabajo De Campo

1. Se evaluaron en la sección inicial del formato la información sociodemográfica de la población del estudio, el periodo de exposición al **ZIKV** y otros anexos de la historia clínica gestacional que aportaban los acudientes.
2. Evaluación clínica dental y fonoaudiológica de los parámetros determinantes del desarrollo craneofacial y de la dentición de los niños en estudio (78). La realizó un residente de Odontopediatría y un Fonoaudiólogo de la Universidad del Valle con el acompañamiento de uno de los investigadores del proyecto. Se llevó a cabo en un consultorio de la Escuela de Odontología de la Universidad del Valle.
3. Los puntos antropométricos se evaluaron para determinar el desarrollo óseo craneofacial y los patrones de crecimiento con ángulos y medidas; y el acoplamiento dental.
4. Radiografía panorámica donde se analizaron las estructuras del maxilar superior e inferior y evaluó la cronología de la erupción dental según las etapas descritas por Nolla. Este análisis lo realizó un residente de Odontopediatría de la Universidad del Valle y los investigadores principales.

La toma se hizo en un Centro Radiológico Oral habilitado con altos estándares de calidad. La interpretación de las imágenes la realizó la Residente de Odontopediatría. Sólo fue posible realizarlo en tres casos ya publicados (79).

5. Análisis funcional de la masticación, el patrón de deglución, la fonación, y la adquisición y uso del lenguaje mediante entrevistas a los niños y sus madres, se realizaron videos estandarizados para el análisis. Esta evaluación la realizó un residente de Odontopediatría y un Fonoaudiólogo de la Universidad del Valle con el acompañamiento de uno de los investigadores del proyecto.
6. Evaluación de la oclusión en sentido transversal, sagital, y vertical por medio de análisis de modelos de yeso y fotografías intraorales. Además de la sobremordida horizontal y vertical.

Variables

Tabla II-3. Definición Operacional de las variables

Nombre	Definición	Tipo	Definición	Valores posibles
SOCIODEMOGRAFICAS				
Edad gestacional	Variable cuantitativa	Numérica discreta	Semanas de gestación cumplidas	1-40
Tipo de parto	Variable	Nominal categórica	Tipo de parto	1: Parto vaginal 2: Parto cesárea
Sexo	Variable independiente	Nominal Categórica	Sexo biológico	1: Masculino 2: Femenino
Edad	Variable independiente	Numérica discreta	En meses cumplidos	1-90
Lugar de nacimiento	Variable cualitativa	Nominal categórica	Ciudad de origen	Nombre de la ciudad
Control ecográfico primer trimestre	Variable	Nominal categórica	Control prenatal ecográfico	1: Si 2: No
Edad de la madre	Variable independiente	Numérica discreta	En años cumplidos	20-40
Escolaridad de la madre	Variable independiente	Nominal categórica	Nivel de escolaridad	1: Bachiller 2: Técnico 3: Tecnólogo 4: Universitario 5: Posgrado

Estado civil de los padres	Variable cualitativa	Nominal categórica	Estado civil de los padres	1: Soltero 2: Casado 3: Unión libre 4: Separado
Tipo de etnia	Variable cualitativa	Nominal categórica	Tipo de etnia a la que pertenece	1: Mestizo 2: Afrodescendiente 3: Indígena 4: Otro
Síntomas durante el embarazo	Variable cuantitativa discontinua	Nominal categórica	Sintomatología presente durante el embarazo	1: Fiebre 2: Salpullido 3: Conjuntivitis 4: Dolor muscular 5: Dolor de cabeza 6: Todos los anteriores 7: Ninguna de las anteriores
Antecedentes médicos del paciente	Variable cualitativa	Ordinal	Patologías previas	1. Si ¿Cuál? 2. No
Diagnóstico médico del paciente	Variable cualitativa	Nominal categórica	Diagnostico medico actual del paciente	1. Si ¿Cuál? 2. No
ANÁLISIS CRANEOFACIAL				
Cara	Variable dependiente	Nominal Categórica	Evaluación de asimetrías.	1.Simétrica 2.Asimétrica
Biotipo	Variable dependiente	Nominal Categórica	Evaluación del biotipo facial	1.Mesocefálico 2. Dolicocefálico 3.Braquiocefálico
Perfil	Variable dependiente	Nominal Categórica	Evaluación del perfil facial	1.Recto 2.Cóncavo 3.Convexo
Posición del Maxilar	Variable dependiente	Nominal Categórica	Evaluación de la posición del maxilar	1.Normal 2.Protruido 3.Retraído 4.Desviado
Posición de la Mandíbula	Variable dependiente	Nominal Categórica	Evaluación de la posición de la mandíbula	1.Normal 2.Prognatismo 3.Retrognatismo 4.Desviada 5.Posición en reposo: Normal____ Descenso____

Índice Morfológico Facial	Variable Dependiente	Numérica continua	Clasificación según el índice longitud y anchura cefálica	1.Cara corta: Hipereuriprosopo (x-78,9) _____ Euriprosopo (79,0-83,9) _____ 2.Cara intermedia: Mesoprosopo (84,0-87,9) _____ 3.Cara larga: Leptoprosopo (88,0-92,9) _____ Hiperleptoprosopo (93,0-x) _____
Análisis de tercios faciales	Variable Dependiente	Numérica continua	Medida en mm de los tercios faciales	1: Tercio superior 2: Tercio medio 3: Tercio inferior
Análisis implantación orejas	Variable dependiente	Nominal Categórica	Evaluación de simetría implantación orejas	1: Simétricas 2: Asimétricas
Línea bipupilar	Variable	Nominal Categórica	Evaluación de simetría línea bipupilar	1: Simétrica 2: Asimétrica
Medidas antropométricas	Variable Dependiente	Numérica continua	Medida en cm-mm	1.Perímetro cefálico 2.Distancia Pa-Pa 3.Distancia Bicigomática 4.Distancia Nasion a Gnation 5.Distancia tragus a Subnasal 6.Distancia de tragus a Gnation 7.Distancia de Gonion a Gonion 8.Distancia de Glabella a Opistion
Evaluación de los labios	Variable dependiente	Nominal dicotómica	Alteración de tamaño, forma, color y posición de los labios	Presencia o ausencia de la alteración 1.Labios armónicos 2.Cortos 3.Incompetentes
Evaluación del paladar	Variable dependiente	Nominal dicotómica	Alteración de forma, color y tamaño	Presencia o ausencia de la alteración

Evaluación de la lengua	Variable dependiente	Nominal dicotómica	Alteración del tamaño, forma y color	Presencia o ausencia de la alteración
Evaluación inserción de frenillos	Variable dependiente	Nominal dicotómica	Alteración en la inserción de los frenillos	Presencia o ausencia de la alteración
DESARROLLO OCLUSAL				
Tipo de arco (BAUME)	Variable independiente	Nominal Categórica	Arcos con o sin espacios fisiológicos.	1.Tipo I 2.Tipo II
Estadio de dentición	Variable dependiente	Nominal Categórica	Formula dental (estadios Nolla) (50,51)	0-10 Para cada diente
Relación molar	Variable independiente	Nominal Categórica	Interrelación sagital de segundos molares superiores e inferiores deciduos (57)	Dentición decidua: 1: Escalón mesial 2: Escalón distal 3: Plano terminal recto
Relación canina	Variable independiente	Nominal Categórica	Interrelación sagital de caninos superiores e inferiores (57)	1: Clase 1 2: Clase 2 3: Clase 3
Overjet/ Overbite	Variable dependiente	Numérica continua	Valor en milímetros (sobremordida vertical y horizontal)	Valor en mm o en %
Maloclusiones transversales	Variable independiente	Nominal Categórica	Alteraciones encontradas en el plano transversal.	1: Mordida cruzada posterior 2: Mordida en tijera
Maloclusiones verticales	Variable independiente	Nominal Categórica	Alteraciones que encontramos en el plano vertical (57,80)	1: Mordida abierta 2: Mordida profunda
Maloclusión anteroposterior	Variable independiente	Nominal categórica	Alteración en el plano anteroposterior	Mordida cruzada anterior 1: Si 2: No
Índice de Bogue	Variable Dependiente	Numérica continua	Evalúa el espacio del arco dental en sentido transversal	1.Micrognatismo transversal /Sobre expansión. 3.Arco abierto / Arco cerrado.
ALTERACIONES DENTALES				

Anomalías dentales	Variable dependiente	Nominal Categórica	Presencia de anomalías dentales	Presencia o ausencia 1: Numero 2: Forma 3: Estructura
Cronología y secuencia de erupción	Variable dependiente	Númerica continua	Evaluación de la cronología y secuencia de erupción	Edad de inicio de la erupción dental
Presencia de caries	Variable dependiente	Nominal categórica	Categoría según el diagnostico de caries	0: Sano 1-2: Primer cambio visible en esmalte (lesión de mancha blanca y/o café) 3: Ruptura localizada del esmalte, sin dentina expuesta visible 4: Sombra subyacente de dentina 5-6: Cavidad detectable en esmalte opaco o decolorado con dentina visible
HABITOS				
Hábitos deletéreos	Variable dependiente	Nominal Categórica	Presencia, frecuencia, intensidad, tipo de hábito parafuncional (81)	Presencia o ausencia Frecuencia Intensidad
Hábitos de higiene oral	Variable dependiente	Nominal categórica	Presencia, frecuencia cepillado dental	Numero de cepilladas al día
Bruxismo	Variable dependiente	Nominal categórica	Presencia o ausencia	1: Si Diurno Nocturno 2: No
Función de ingesta del alimento	Variable dependiente	Nominal Categórica	Alteración de las fases de la formación del bolo alimenticio, tipo de alimentación que ingiere (82)	1: Adecuada 2. Inadecuada
ANALISIS FUNCIONAL				

Desarrollo del lenguaje	Variable dependiente	Nominal Categórica	Presencia de Balbuceo, palabras, frases, sonrisa (83)	1. Si 2. No
Función de fonación	Variable dependiente	Nominal dicotómica	Alteración de la emisión de la voz (82)	1. Si 2. No
Funciones de la articulación de la Palabra	Variable dependiente	Nominal dicotómica	Alteración en la articulación de sonidos y consciencia fonológica (82)	1. Si 2. No
Posición de la lengua en habla	Variable dependiente	Nominal dicotómica	Alteración en la posición de la lengua	1. Si 2. No

Recolección de la Información:

Se recolecto la información clínica en un formulario de Google Forms (Google online apps suite of tools) bajo el convenio institucional de la Universidad del Valle con acceso ilimitado de Gb de almacenamiento y en tiempo real alimentar una base de Datos en Microsoft Excel®. La información que se custodia en un computador de la Escuela de Odontología garantizando el anonimato de la identidad de los pacientes del estudio clínico; garantizando el buen manejo de la información, y se custodia una copia por seguridad en el Departamento de Microbiología de la Universidad del Valle.

Análisis de la información:

Las variables se tabularon en Excel® y se elaboraron tablas de frecuencia y figuras en análisis univariado y bivariado a través de la prueba χ^2 para variables categóricas y; KSmirnov y T-test para variables numéricas comparando los grupos (74,84).

3.3 Consideraciones éticas

Acta de aprobación N° 010-2018, código 074-018.

El Consejo de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle, ha establecido el Comité Institucional de Revisión de Ética Humana (CIREH), el cual está regido por la Resolución 008430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud; los principios de la Asamblea Médica Mundial expuestos en su Declaración de Helsinki de 1964, última revisión en 2002; y el Código de Regulaciones Federales, título 45, parte 46, para la protección de sujetos humanos,

del Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos 2000. (**Anexo 6.2**)

3.4 Resultados y Discusión

Características sociodemográficas de la población estudio

Del total de niños evaluados en el grupo de SCZ, ocho casos fueron niñas y provenían de la Ciudad de Santiago de Cali (**Figura II-8A**); y el resto provino de los municipios de Jamundí (n=1), Ginebra (n=1), El Cerrito (n=2) y Cartago (n=1), también hubo un caso nacido en Venezuela e hijo de inmigrantes de venezolanos (**Figura II-8B**). Trece de los niños con SCZ fueron considerados de etnia mestiza, y uno fue afrodescendiente. Las madres de niños del grupo SCZ, en su mayoría tenían educación básica secundaria y conviven en unión libre; mientras el nivel educativo de las madres en el grupo control fue significativamente mayor (**Tabla II-4**). Aunque no se presentaron diferencias en la mayoría de las variables sociodemográficas, hubo un mejor nivel de escolaridad de la madre en el grupo de niños sanos y el periodo de gestación fue menor en número de semanas en el grupo SCZ. El entorno social y familiar fue más complejo en SCZ, toda vez que las mujeres viven en unión libre y su escolaridad es más baja que en el grupo control (16,85).

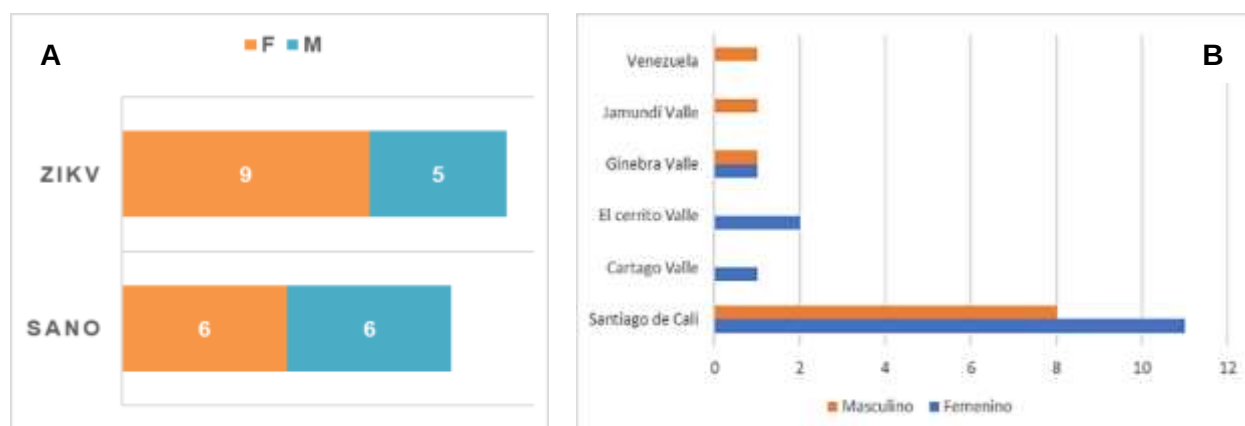


Figura II-8. A. Distribución de los niños con Zika congénito y casos sanos según grupo y sexo. **B.** Procedencia de los casos de Zika congénito según sexo.

El promedio de gestación en el grupo SCZ fue de 37.9 semanas y los partos fueron vaginales en 10 casos, con al menos una ecografía al final del primer trimestre del embarazo; y en 12 casos, las madres, presentaron síntomas relacionados con la infección por ZIKV como fiebre, y salpullido con prurito. En el grupo control, el promedio de semanas de gestación fue 38.4 semanas, seis madres tuvieron parto vaginal y seis por cesárea, con ecografía en el primer trimestre y ninguna presento síntomas de infección por ZIKV durante su embarazo (**Tabla II-4**).

Tabla II-4. Características sociodemográficas maternas y gestacionales en niños con y sin infección congénita por ZIKV del período epidémico 2015-2017.

Tipo de caso	ZIKV	Sano (G.control)	Total	(p)
Edad Promedio de las madres	32.4 (26.9-36.8)	33.7 (29.5-37.9)	32.7 (28.1-37.3)	0.984
Sexo de los niños				
NIÑAS	9	6	15	0.462
NIÑOS	5	6	11	
Escolaridad de la madre				
Básica secundaria	10	4	14	0.028*
Técnico	0	1	1	
Universitaria	4	2	6	
Posgrado	0	5	5	
Estado civil				
Casada	3	2	5	0.884
Soltera	3	2	5	
Unión libre	8	8	16	
Semanas de gestación (media)	37.9 (34.5-41.3)	38.4 (36.9-39.9)	38.3 (35.7-40.9)	0.552
Tipo de Parto				
Vaginal	10	6	16	0.239
Cesárea	3	6	9	
No sabe	1	0	1	
Ecografía 1er trimestre				
SI	12	12	24	0.234
NO	2	0	2	
Síntomas de ZIKV en el embarazo				
SI	12	0	12	0.000*
NO	2	12	14	
TOTAL	14	12	26	

* $p < 0.05$, χ^2 Fisher-Kolmogorov-Smirnov

El control prenatal incluyó en el 90% de los casos, la ecografía del primer trimestre de embarazo y que pudo revelar alteraciones fetales mayores. En ninguno de los reportes se identificó la microcefalia ni tampoco se recomendó un aborto por indicación médica, a pesar de que un 41.38% de las madres del grupo SCZ presentaron síntomas clínicos relacionados con la infección por ZIKV; pero dichos síntomas, no fueron signos de alarma durante los controles prenatales y por lo tanto no se ordenaron pruebas específicas de laboratorio prenatales para comprobar una infección por el ZIKV (86,87).

Características craneofaciales

Trece de los 14 niños en el grupo SCZ nacieron con microcefalia; mientras que, un niño del grupo control tuvo un perímetro cefálico reducido al nacer, que se resolvió durante el primer año de vida. El promedio del perímetro cefálico en SCZ fue 43.5 cm mientras que en los controles sanos fue de 49.5 cm ($p=0.001$). Esta medida en los niños con ZIKV fue menor que lo reportado como parámetros de crecimiento y desarrollo en niños colombianos de la misma edad (85,88) y el que presentaron los controles ($p=0.001$) (**Tabla II-5**), siendo un hallazgo esperado por ser la consecuencia mas reportada en la infección congénita por el ZIKV(89).

El índice morfológico facial (IMF) es un índice que tiene como estudio base una población colombiana (90) y para el grupo SCZ, el IMF fue clase 3, mientras que el grupo de comparación tuvieron un IMF clase 4. El biotipo facial predominante en SCZ fue dolicocefálico, mientras aquel de los niños sanos fue mesencefálico (**Tabla II-5**). El patrón de IMF clase 4 y de biotipo mesencefálico hace parte del promedio de lo reportado para niños colombianos de la misma edad (85,90).

Once pacientes SCZ tenían el maxilar protruido y nueve la mandíbula retraída mientras que; la mayoría de los pacientes sanos tenían un desarrollo maxilar normal ($p=0.001$). En SCZ el tercio inferior estuvo incrementado sagital mente, que comúnmente se asocia con interposición lingual y posición baja de la lengua, rotación de la mandíbula en sentido horario que genera el aumento de la dimensión del tercio inferior de la cara y mordida abierta anterior (69,87).

En nueve niños del grupo SCZ, la línea pupilar fue asimétrica mientras que en el grupo sano, solo fue un caso. El borde inferior de las orejas fue asimétrico en 7 casos con SCZ, mientras que los pacientes del grupo control sano solo 2 pacientes presentaron esta asimetría (**Tabla II-5**). Al compararse los tercios faciales, el grupo SCZ presento el tercio superior más pequeño con un promedio de 20.8 mm; comparado con en el grupo sano que fue de 23.1 mm, el tercio facial inferior en SCZ tuvo un promedio más bajo y fue de 25.1 mm mientras que; aquel en el grupo sano fue 28.2mm. En relación con las medidas antropométricas craneofaciales, la medida anteroposterior del maxilar superior (t-Sn) fue mayor en el grupo control o sano con un promedio de 11.9 mm, seguido del ancho de la frente (Pa-Pa) promedio 11.6 cm, el ancho bicigomático (Zg-Zg) fue 8.6 cm siendo significativamente menor al grupo de SCZ ($p=0.015$), la altura facial (N-Gn) fue 12 cm. La distancia de (Gn-Gn) en el grupo control sanos fue menor que la que presentó el grupo ZIKV, 8.2 cm. Por último, la distancia de (Gla-Op), 23,4 cm fue mayor para el grupo control de pacientes sanos, mientras que el grupo SCZ tuvo apenas 17.8 cm y fue la mayor diferencia identificada entre los dos grupos ($p=0.001$) (**Tabla II-5**). La medida antropométrica más reducida fue la distancia Gla-Op en los casos SCZ, al igual que la asimetría en el plano pupilar asociado con estrabismo (**Tabla II-5**), signo que ha sido reportado comúnmente en otros estudios clínicos de niños con infección congénita por ZIKV (76,91).

Tabla II-5. Características craneofaciales en niños con y sin infección congénita por ZIKV del período epidémico 2015-2017.

Tipo de caso		ZIKV	Sano (G. control)	(p)
Dx. Microcefalia al Nacer				
	SI	13	1	0.000*
	NO	1	11	
Perímetro Cefálico (media)		43.5 (39.5-47.5)	49.5 (47.7-51.3)	0.001*
IMF				
	Clase 2	3	1	0.086
	Clase 3	6	1	
	Clase 4	2	6	
	SIN DATO	3	4	
Biotipo Facial				
	Braquicefálico	0	1	0.104
	Dolicocefálico	10	3	
	Mesencefálico	3	5	
	SIN DATO	1	3	
Perfil Facial				
	Recto	1	4	0.127
	Cóncavo	0	0	
	Convexo	11	5	
	SIN DATO	2	3	
Maxilar				
	Normal	2	9	0.001*
	Protruido	11	0	
	Retruido	0	1	
	SIN DATO	1	2	
Mandíbula				
	Normal	3	8	0.031*
	Protruido	1	1	
	Retruido	9	1	
	SIN DATO	1	2	
Línea Bipupilar				
	Simétrica	3	7	0.014*
	Asimétrica	9	1	
	SIN DATO	2	4	
Borde inferior de orejas				
	Simétrica	3	5	0.228
	Asimétrica	7	2	
	SIN DATO	4	4	
Tercios Faciales				
	Superior	20.8 (7.98-33.7)	23.1 (7.3-38.9)	0.000*

Medio	26.0 (10.1-41.9)	22.8 (7.3-38.8)	0.000*
Inferior	25.1 (6.77-43.4)	28.2 (13.5-42.9)	0.000*
Medidas craneofaciales (media)			
Pa-Pa	11.4 (10.3-12.4)	11.6 (10.8-12.4)	0.936
Zg-Zg	9.5 (8.8-11.0)	8.6 (7.8-9.4)	0.015*
N-Gn	10.9 (10-11.6)	10.9 (10-11.6)	0.552
t-Sn	11 (9.7-12.3)	11.9 (11.1-12.7)	1.000
t-Gn	11.3 (10.4-12.2)	12 (11.1-12.9)	0.955
Go-Go	8.9 (7.5-10.3)	8.2 (7.2-9.2)	0.263
Gla-Op	17.8 (13.6-22)	23.4 (21.4-25.4)	0.001*

IMF: Índice morfológico facial

SIN DATO: No hay dato (en algunos pacientes no fue posible la toma de algunas medidas debido a alteraciones en el comportamiento)

* $p < 0.05$, Chi² Fisher-Kolmogorov Smirnov-T- test

Características dentales, oclusales y hábitos

Ocho de los niños con SCZ presentaron una relación molar temporal de escalón distal ($p=0,003$), que puede predisponer a maloclusión con relación molar de clase II en la dentición permanente(92). En 4 casos resultó imposible determinar la relación molar (NA) debido a que el segundo molar temporal (superior y/o inferior) no estaba bien erupcionado al momento de la valoración. Nueve del paciente con SCZ y 10 en el grupo control tuvieron una relación canina clase III. Solo tres casos del grupo ZIKV presentaron mordida abierta anterior mientras que solo uno en el grupo control; lo que podría relacionarse con el uso prolongado de biberón(92). Es común el reporte de que los hábitos de succión no nutricional durante la dentición decidua pueden generar mordida abierta anterior, aún sin tener en cuenta el patrón morfológico facial del paciente (93).

El ancho intercanino e intermolar maxilar, mandibular y el perímetro de arco superior se encontró mayor en el grupo SCZ en comparación con los valores del grupo de pacientes sanos (**Tabla II-6**). El desarrollo transversal de los arcos tanto el superior como el inferior de los casos SCZ fue mayor en comparación con el grupo control y está representado en la tabla con la distancia intercanina e intermolar. Por otra parte, el análisis de Bogue mostró que los dos grupos presentan un adecuado desarrollo transversal de los arcos. Los espacios primates son beneficiosos para el desarrollo de la dentición permanente en los arcos óseos durante el crecimiento. Estudios en poblaciones similares informaron que la frecuencia de arcos tipo I es decir arcos espaciados es 53,3% y 45,7% para el tipo II, respectivamente. Los arcos dentales en los dos grupos presentaron dichos espacios en mayor proporción es decir presentaron arcos tipo I en su mayoría, lo que favorece el desarrollo de la oclusión (**Tabla II-6**) (73,87). Sin embargo, el crecimiento transversal aumentado en el grupo SCZ, puede también explicarse por el bruxismo, mas que por la estimulación miofuncional nutritiva, pues hay estudios que han reportado la relación entre la longitud del arco dentario, en ancho transversal del arco, distancia bicigomática y fuerza de mordida que parece benefician el crecimiento y desarrollo adecuados de los maxilares (94).

Tabla II-6. Características dentales y oclusales en niños con y sin infección congénita por ZIKV del período epidémico 2015-2017.

Tipo de caso	ZIKV	Sano (G.control)	p
Relación molar			
Plano terminal recto	1	9	0.003*
Escalón mesial	0	0	
Escalón distal	8	2	
NA	1	1	
SIN DATO	4	0	
Relación canina			
Clase I	2	2	0.405
Clase II	1	0	
Clase III	9	10	
SIN DATO	2	0	
Mordida abierta anterior			
SI	3	1	0.356
NO	11	11	
Mordida profunda			
SI	3	4	0.770
NO	10	7	
SIN DATO	1	1	
Ancho intercanino maxilar	31.1 (23-36)	29.2 (25-38)	
Ancho intercanino mandibular	39.8 (31-45)	38.7 (32-44)	
Ancho intermolar maxilar	25.3 (19-34)	23.7 (20-31)	
Ancho intermolar mandibular	35.6 (29-39)	35.1 (32-39)	
Perímetro de arco superior	76.2 (54-86)	72.7 (68-83)	
Perímetro de arco inferior	68.1 (48-80)	68.9 (64-78)	
Sobremordida horizontal	2.6 (1.1-4.1)	2.2 (0.5-3.9)	0,383
Sobremordida vertical	1.2 (-1.2-3.7)	2.5 (0.5-4.5)	0,000
Análisis de Bogue	31.8 (27.1-36.5)	30.3 (27-34)	0,494
Espacios interdentes			
Tipo I	11	8	
Tipo II	3	4	
SIN DATO	0	0	

I. NA: Categoría No Aplica porque no fue posible por cuestiones anatómicas, tomar la medida clínica.

II. SIN DATO: No hay dato (en algunos pacientes no fue posible la toma de algunas medidas debido a alteraciones en el comportamiento)

* $p < 0.05$, Chi² Fisher

Características dentales y hábitos orales

Una característica importante en los pacientes SCZ es el tipo de dieta, la mayoría de los pacientes presenta una dieta líquida y semisólida, comparado con los pacientes del grupo control que presentan la mitad una dieta semisólida y la otra mitad sólida. Los pacientes SCZ debido a su disfagia presentaban una dieta blanda y por esto, no tienen suficiente estimulación masticatoria. El hábito de bruxismo (diurno y/o nocturno), se presentó en 12 niños con ZIKV congénito y solo estuvo

presente en 4 niños del grupo sano, esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p=0,006$) (**Tabla II-7**). Para este caso, el bruxismo continuo posiblemente compensa el estímulo masticatorio deficiente a nivel miofuncional, necesario para el desarrollo transversal de los arcos dentarios (**Tabla II-8**) (74,91). Sin embargo, el bruxismo es una parafunción con importantes consecuencias nocivas como el desgaste de las superficies dentales, fatiga muscular y trastornos temporo-mandibulares a lo largo del tiempo (95).

El desarrollo dental es un indicador de maduración y la edad biológica, el poder entender el orden de erupción dental puede indicar alteraciones locales o sistémicas de acuerdo con las discrepancias entre la edad cronológica y la edad biológica (96). Del grupo de los pacientes SCZ, cuatro presentaron alteración en la cronología y secuencia de erupción dental comparado con los pacientes sanos que no lo presentaron; una posible causa de este retraso en la erupción puede relacionarse con el tipo de dieta que presentan (blanda o líquida), y la ausencia de una dieta con diferentes consistencias que genere esa estimulación en la erupción (33). Otra hipótesis alternativa pero sin todavía un sustento biológico, es aquel que el retraso en la erupción del segundo molar temporal se podría generar por la afectación que parece generar el virus ZIKA durante la ontogénesis (97). Se han reportado alteración de la formación dental en los pacientes con SCZ en otros estudios, pero en este estudio no se encontraron anomalías de número, tamaño, forma y estructura en la dentición decidua (16,73,91,98). A diferencia del grupo de pacientes sanos donde se encontró un paciente que presentaba anomalía de número encontrándose una agenesia dental.

Se realizó la evaluación de caries siguiendo los criterios de ICDAS y se puede inferir que un 34.48% de los 26 niños estudiados presenta caries dental y que dicha prevalencia fue mayor en SCZ (50%) y que puede relacionarse con el consumo de medicamentos antiepilépticos que contienen azúcar y además es necesario educar a las madres sobre la importancia de la remoción eficaz y diaria de la placa dental de los niños, teniendo en cuenta sus limitaciones motoras para hacerlo por sí mismos (99) (**Tabla II-7**).

Tabla II-7. Características dentales y hábitos en niños con y sin infección congénita por ZIKV del período epidémico 2015-2017.

Características dentales y orales		ZIKA	Sano (G.control)	p
Alteración cronología y secuencia de erupción	SI	4	0	
	NO	9	11	
	SIN DATO	1	1	
Anomalías dentales	SI	0	1	0.271
	NO	14	11	
Caries dental	SI	7	3	0.191
	NO	7	9	
Consistencia de dieta	LIQUIDOS	5	0	
	SEMISOLIDOS	7	6	
	SOLIDOS	1	6	
	SIN DATO	1	0	
Bruxismo	SI	12	4	0.006*
	NO	2	8	
Inserción de frenillos	NORMAL	11	9	
	SOBREINSERTADO	3	3	

*Gn: gonion, Pa: parietal, Zy: zygomatic, Gla: glabella; Op: opistion; Sn: subnasal, N:nasion and t: tragus

ND: no data*Comparison values: López Rodríguez, Y. N. (2015). *Antropometría craneofacial en niños de 0 a 4 años-una perspectiva bayesiana*. Odontología. Carvajal, E. A. 2017. *Estudio antropométrico y patrones de crecimiento de las regiones craneofacial, facial y nasolabial en niños de 0-5 años*. Bogotá, Colombia (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá).

En cuanto a la inserción muscular de los frenillos se pudo observar que el mismo número de pacientes presentaron el frenillo labial superior sobreinsertados 3 pacientes en el grupo SCZ y 3 en el grupo control: no hubo diferencias estadísticas en este estudio, pero es un signo reportado en varios estudios clínicos de evaluación características orales en niños con SCZ (91).

Tabla II-8. Características miofuncionales en niños con y sin infección congénita por ZIKV del período epidémico 2015-2017.

Tipo de Caso		ZIKV	SANO
Lenguaje	Verbal	3	12
	No verbal	11	0
Fase del lenguaje	Lingüística	2	12
	Prelingüística	12	0
Disociación movimiento de cabeza y mandíbula	SI	0	12
	NO	14	0
Selle labial	SI	1	9
	NO	13	3
Tono cuello	AUMENTADO	1	0
	DISMINUIDO	6	0
	NORMAL	7	12
Respiración en reposo	MIXTO	2	1
	NASAL	3	10
	ORAL	9	1
Línea bipupilar	Simétrica	3	7
	Asimétrica	9	1
	SIN DATO	2	4
Borde inferior de orejas	Simétrica	3	5
	Asimétrica	7	2
	SIN DATO	4	4

3.5 Registro fotográfico (Figura II-9 y Material suplementario)

3.6 Conclusiones

Los niños con SCZ presentaron perímetro cefálico disminuido, prognatismo maxilar, retrognatismo mandibular, tercio superior disminuido, tercio inferior aumentado, tercio medio y ancho de la cara aumentado, bruxismo, caries dental y uso prolongado del biberón por su condición clínica. En este estudio se pudo observar que la microcefalia por SCZ no desencadena cambios en la fórmula y la morfología de la dentición decidua. Sin embargo, una alteración dental el patrón de erupción puede ocurrir, al igual que el bruxismo, arcos dentales tipo I, incompetencia labial, disfagia, interposición de la lengua, disfunción masticatoria, mordida abierta y dislalia. Además, la asimetría facial era evidente y algunas medidas craneofaciales estaban disminuidas en los casos con SCZ. En contraste, los niños del grupo control, presentaron mayor perímetro cefálico, una mejor relación intermaxilar, los

tercios faciales y las medidas craneofaciales más armónicas con un plano pupilar simétrico, de acuerdo con lo reportado para niños colombianos de esta edad (85).

Además de lo mencionado anteriormente, también se pudo observar como parte del cuadro clínico característico de niños con SCZ generado fundamentalmente por la alteración del neurodesarrollo como musculares de hipo o hipertonía en sus extremidades, falta de soporte de los músculos de las vértebras y del cuello y la persistencia de los reflejos primitivos, trastornos de la visión como estrabismo, también presentaban disfagia y dislalia (8,31,33,69,100–103).

Es importante realizar un seguimiento de este grupo de pacientes para establecer características de su dentición permanente, así como evaluar su desarrollo oclusal, cambio de dentición temporal a mixta y posteriormente ha permanente. Las alteraciones disfuncionales en el SCZ requieren la intervención de equipos profesionales multidisciplinarios, incluida la atención odontológica, para intentar rehabilitar y mejorar la calidad de vida para esos niños y sus familias.

3.6 Recomendaciones y Limitaciones



FIGURA II-9. Registro fotográfico de niños con ZIKV congénito.

La obtención de las fotos y exámenes como ayudas diagnósticas, fue muy difícil al igual que la inspección clínica; pues el cuadro clínico de los niños con todas sus características, no permitieron la toma de imágenes estandarizadas por la falta de tonicidad muscular cervical (**Tabla II-8**) (esto no permite que los niños sostengan la cabeza por si mismos) (**Figura II-9**). La toma de modelos de estudio y algunas partes de la inspección clínica fueron muy dispendiosas por la hipersensibilidad facial y perioral de los niños al tacto.

No se alcanzó la muestra inicial propuesta de 20 pacientes para cada grupo, pues a pesar de la búsqueda activa de los casos, estos se encuentran muy dispersos en el sistema de salud y no hay una institución que agrupe los casos de ZIKV congénito; adicionalmente, las condiciones de aislamiento mandatorias por pandemia, dificultó la asistencia de los niños a la evaluación clínica. Por estos motivos, sólo se lograron estudiar 14 pacientes y 12 pacientes controles sanos.

Debido al subregistro durante la epidemia, pocas madres pudieron tener confirmación del diagnóstico con laboratorio (PCR para virus Zika) y tampoco se registró en la base de datos de tamizaje, el descarte de algún riesgo para otros trastornos congénitos craneofaciales sindrómicos y no sindrómicos.

Es importante continuar con el seguimiento del desarrollo de los niños con SCZ, para preparar a los profesionales de salud a los servicios que vayan demandando los pacientes a medida que van creciendo, y realizar el acompañamiento desde cada disciplina hacia las familias y cuidadores generando estrategias de manejo en casa para aquellas condiciones de salud prevenibles a pesar de que las condiciones de discapacidad son generales y evidentes en los niños.

3.8 Bibliografía

1. Organization WH. Zika situation report: neurological syndrome and congenital anomalies. 2016;
2. Culshaw A, Mongkolsapaya J, Screaton GR. The immunopathology of dengue and Zika virus infections. *Curr Opin Immunol*. 2017;48:1–6.
3. Parra B, Lizarazo J, Jiménez-Arango JA, Zea-Vera AF, González-Manrique G, Vargas J, et al. Guillain–Barré syndrome associated with Zika virus infection in Colombia. *N Engl J Med*. 2016;375(16):1513–23.
4. de Oliveira Melo AS, Aguiar RS, Amorim MMR, Arruda MB, de Oliveira Melo F, Ribeiro STC, et al. Congenital Zika virus infection: beyond neonatal microcephaly. *JAMA Neurol*. 2016;73(12):1407–16.
5. Atif M, Azeem M, Sarwar MR, Bashir A. Zika virus disease: a current review of the literature. *Infection*. 2016;44(6):695–705.
6. Musso D, Ko AI, Baud D. Zika virus infection—after the pandemic. *N Engl J Med*. 2019;381(15):1444–57.
7. Padilla JC, Lizarazo FE, Murillo OL, Mendigaña FA, Pachón E, Vera MJ. Epidemiología de las principales enfermedades transmitidas por vectores en Colombia, 1990-2016. *Biomédica*. 2017;37(2):27–40.
8. Tolosa N, Tinker SC, Pacheco O, Valencia D, Botero DS, Tong VT, et al. Zika virus disease in children in Colombia, August 2015 to May 2016. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2017;31(6):537–45.
9. Platt DJ, Miner JJ. Consequences of congenital Zika virus infection. *Curr Opin Virol*. 2017;27:1–7.
10. Muniz BC, Gasparetto EL, Marchiori E. Congenital involvement of the central nervous system by the Zika virus in a child without microcephaly-spectrum of congenital syndrome by the Zika virus. *J Neuroradiol*. 2018;45(2):152–3.
11. Besnard M, Eyrolle-Guignot D, Guillemette-Artur P, Lastère S, Bost-Bezeaud F, Marcelis L, et al. Congenital cerebral malformations and dysfunction in fetuses and newborns following the 2013 to 2014 Zika virus epidemic in French Polynesia. *Eurosurveillance*. 2016;21(13):30181.
12. Van der Linden V, Pessoa A, Dobyns W, Barkovich AJ, van der Linden Júnior H, Filho ELR, et al. Description of 13 infants born during October 2015–January 2016 with congenital Zika virus infection without microcephaly

- at birth—Brazil. *Morb Mortal Wkly Rep*. 2016;65(47):1343–8.
13. Schuler-Faccini L, Roehe P, Zimmer ER, Quincozes-Santos A, de Assis AM, Lima EOC, et al. ZIKA virus and neuroscience: the need for a translational collaboration. *Mol Neurobiol*. 2018;55(2):1551–5.
 14. Plourde AR, Bloch EM. A literature review of Zika virus. *Emerg Infect Dis*. 2016;22(7):1185.
 15. Meertens L, Labeau A, Dejarnac O, Cipriani S, Sinigaglia L, Bonnet-Madin L, et al. Axl mediates ZIKA virus entry in human glial cells and modulates innate immune responses. *Cell Rep*. 2017;18(2):324–33.
 16. da Silva MCPM, de Andrade Arnaud M, Lyra MCA, de Alencar Filho AV, Rocha MÂW, Ramos RCF, et al. Dental development in children born to Zikv-infected mothers: a case-based study. *Arch Oral Biol*. 2020;110:104598.
 17. Tahotná A, Brucknerová J, Brucknerová I. Zika virus infection from a newborn point of view. TORCH or TORZiCH? *Interdiscip Toxicol*. 2018;11(4):241.
 18. Stefanik M, Formanova P, Bily T, Vancova M, Eyer L, Palus M, et al. Characterisation of Zika virus infection in primary human astrocytes. *BMC Neurosci*. 2018;19(1):5.
 19. Russo FB, Beltrão-Braga PCB. The impact of Zika virus in the brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;492(4):603–7.
 20. Shaily S, Upadhya A. Zika virus: Molecular responses and tissue tropism in the mammalian host. *Rev Med Virol*. 2019;29(4):e2050.
 21. Gorshkov K, Shiryayev SA, Fertel S, Lin Y-W, Huang C-T, Pinto A, et al. Zika virus: origins, pathological action, and treatment strategies. *Front Microbiol*. 2019;9:3252.
 22. Gratton R, Agrelli A, Tricarico PM, Brandão L, Crovella S. Autophagy in Zika virus infection: a possible therapeutic target to counteract viral replication. *Int J Mol Sci*. 2019;20(5):1048.
 23. Saxena SK, Elahi A, Gadugu S, Prasad AK. Zika virus outbreak: an overview of the experimental therapeutics and treatment. *Virusdisease*. 2016;27(2):111–5.
 24. Shellard A, Mayor R. Chemotaxis during neural crest migration. In: *Seminars in cell & developmental biology*. Elsevier; 2016. p. 111–8.
 25. Simões-Costa M, Bronner ME. Establishing neural crest identity: a gene regulatory recipe. *Development*. 2015;142(2):242–57.
 26. Romero DM, Bahi-Buisson N, Francis F. Genetics and mechanisms leading to human cortical malformations. In: *Seminars in cell & developmental biology*. Elsevier; 2018. p. 33–75.
 27. Faheem M, Naseer MI, Rasool M, Chaudhary AG, Kumosani TA, Ilyas AM, et al. Molecular genetics of human primary microcephaly: an overview. *BMC Med Genomics*. 2015;8(1):S4.
 28. Tang H, Hammack C, Ogden SC, Wen Z, Qian X, Li Y, et al. Zika virus infects human cortical neural progenitors and attenuates their growth. *Cell Stem Cell*. 2016;18(5):587–90.
 29. Qian X, Nguyen HN, Jacob F, Song H, Ming G. Using brain organoids to understand Zika virus-induced microcephaly. *Development*. 2017;144(6):952–7.

30. Leal MC, van der Linden V, Bezerra TP, de Valois L, Borges ACG, Antunes MMC, et al. Characteristics of dysphagia in infants with microcephaly caused by congenital Zika virus infection, Brazil, 2015. *Emerg Infect Dis*. 2017;23(8):1253.
31. Moore CA, Staples JE, Dobyns WB, Pessoa A, Ventura C V, da Fonseca EB, et al. Congenital Zika syndrome: characterizing the pattern of anomalies for pediatric healthcare providers. *JAMA Pediatr*. 2017;171(3):288.
32. Yan Y, Zhang X, Wang G, Cheng X, Yan Y, Fu Y, et al. Zika virus induces abnormal cranial osteogenesis by negatively affecting cranial neural crest development. *Infect Genet Evol*. 2019;69:176–89.
33. Siqueira RMP, Santos MTBR, Cabral GMP. Alterations in the primary teeth of children with microcephaly in Northeast Brazil: a comparative study. *Int J Paediatr Dent*. 2018;28(5):523–32.
34. Dupin E, Calloni GW, Coelho-Aguiar JM, Le Douarin NM. The issue of the multipotency of the neural crest cells. *Dev Biol*. 2018;444:S47–59.
35. Aguiar YPC, Cavalcanti AFC, de Alencar CRB, de Oliveira Melo AS, Cavalcanti S d'Ávila LB, Cavalcanti AL. Chronology of the first deciduous tooth eruption in Brazilian children with microcephaly associated with Zika virus: a longitudinal study. *Pesqui Bras Odontopediatria Clin Integr*. 2018;18(1):3982.
36. Graf D, Malik Z, Hayano S, Mishina Y. Common mechanisms in development and disease: BMP signaling in craniofacial development. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2016;27:129–39.
37. Fish JL. Evolvability of the vertebrate craniofacial skeleton. In: *Seminars in cell & developmental biology*. Elsevier; 2019. p. 13–22.
38. Cavalcanti AFC, Aguiar YPC, de Oliveira Melo AS, de Freitas Leal JIB, Cavalcanti AL, Cavalcanti S d'Ávila LB. Teething symptoms in children with congenital Zika syndrome: A 2-year follow-up. *Int J Paediatr Dent*. 2019;29(1):74–8.
39. Agnihotri G, SINGH S. Craniofacial anthropometry in newborns and infants. 2007;
40. López Rodríguez YN. Antropometría craneofacial en niños de 0 a 4 años-una perspectiva bayesiana [Internet]. Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá; 2015. Available from: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/54052>
41. Bedoya Rodríguez A, Osorio Patiño JC, Tamayo Cardona JA. TERMINING FACIAL BIOTYPE BASED UPON PHENOTYPIC FEATURES THROUGH STRUCTURAL EQUATION MODELING: A STUDY OF THREE ETHNIC. *Rev Fac Odontol Univ Antioquia*. 2013;25(1):131–46.
42. Rakosi T, Jonas I. Atlas de ortopedia maxilar: diagnóstico. Ediciones científicas y técnicas; 1992.
43. Akcam MO, Altio T, Özdiler FE. Functional analysis of cleft lip and palate patients with modified Rakosi method. *Cleft Palate-Craniofacial J* [Internet]. 2002;39(1):101–4. Available from: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0036142340&doi=10.1597%2F1545-1569%282002%29039%3C0101%3AFAOCLA%3E2.0.CO%3B2&partnerID=>

- 40&md5=e6145d5e0ce1ff5e6f7927454705a89d
44. Jaramillo DC. Fundamentos de odontología: Odontología pediátrica [Internet]. 5ta ed. Biológicas C para I, editor. Bogotá; 2017. Available from: <http://www.ebooks7-24.com.bd.univalle.edu.co/?il=6035>
 45. Trigo Cano S, Mercado Mamani SL, Vega Ramos A, Mercado Portal JL, Mamani Cahuata L. Patrón Facial y Espacios Primates. 2019;
 46. GUEVARA NEC, DURÁN JVM, PÉREZ LAL, CONTRERAS CI. EVALUACIÓN MORFOMÉTRICA DE CARACTERÍSTICAS MANDIBULARES EN RELACIONES ESQUELÉTICAS I, II y II.
 47. Forero C, Rodríguez M. IMAGENOLOGÍA EN ORTODONCIA. ODOUS Cient. 2005;6(1).
 48. Duarte I, Scougall R, Robles NL. Manual de procedimientos clínicos en odontopediatría. MAPorrúa librero-editor-México; 2016.
 49. Bordoní N, Escobar A, Mercado RC. Odontología pediátrica/Pediatric Dentistry: La salud bucal del niño y el adolescente en el mundo actual/The Oral Health of Children and Adolescents in Today's World. Ed. Médica Panamericana; 2010.
 50. Marañón Vásquez GA. Edad dental según los métodos Demirjian y Nolla en niños peruanos de 4 a 15 años. 2011;
 51. Nolla CM. The development of permanent teeth. University of Michigan; 1952.
 52. Carreño B, de la Cruz S, Piedrahita A, Sepúlveda WS, Gómez FM, Hernández JA. Chronology of dental eruption in a group of Caucasoid mestizos from Cali (Colombia). Rev Estomatol. 2017;25(1):16–22.
 53. Baume LJ. Physiological tooth migration and its significance for the development of occlusion: I. The biogenetic course of the deciduous dentition. J Dent Res. 1950;29(2):123–32.
 54. Murrieta Pruneda JF, Grados Sánchez B, Marques Dos Santos MJ, Zurita Murillo V. Características de la dentición primaria y su posible influencia en el desarrollo de la oclusión en niños de 3 a 5 años de edad. Vertientes Rev Spec en Ciencias la Salud. 1999;2(1–2).
 55. de Salud Bucal S. ENSAB IV.
 56. Bishara SE, Hoppens BJ, Jakobsen JR, Kohout FJ. Changes in the molar relationship between the deciduous and permanent dentitions: a longitudinal study. Am J Orthod Dentofac Orthop. 1988;93(1):19–28.
 57. ANGLE EH. Classification of malocclusion. dental Cosmos. Philadelphia; 1899.
 58. Peck S. The contributions of Edward H. Angle to dental public health. Community Dent Heal. 2009;26(3):130–1.
 59. Williams F, Adriaola M. Crecimiento cráneo-facial: desarrollo y diagnóstico de la oclusión. Lima UPOCH Fac Estomatol. 1991;
 60. Giraldo-Mejía A, Mulett-Vasquez J, Ramírez-Molina P. Caracterización de las relaciones oclusales y las dimensiones de los arcos en sentido sagital, transversal y vertical en la dentición temporal y mixta temprana. Rev estomat salud. 2012;20(2):16–23.
 61. Silvério KCA, Ferreira APS, Johanns CM, Wolf A, Furkim AM, Marques JM. Relação de escolaridade, faixa etária e profissão de mães com a oferta de

- chupeta e mamadeira a seus filhos. *Rev CEFAC*. 2012;14(4):610–5.
62. McKeown SJ. The genetic control of neural crest development in early craniofacial morphogenesis. 2004.
 63. Hanzlik E, Gigante J. Microcephaly. *Children*. 2017;4(6):47.
 64. Lord J, McMullan DJ, Eberhardt RY, Rinck G, Hamilton SJ, Quinlan-Jones E, et al. Prenatal exome sequencing analysis in fetal structural anomalies detected by ultrasonography (PAGE): a cohort study. *Lancet*. 2019;393(10173):747–57.
 65. Jamuar SS, Lam A-TN, Kircher M, D’Gama AM, Wang J, Barry BJ, et al. Somatic mutations in cerebral cortical malformations. *N Engl J Med*. 2014;371(8):733–43.
 66. McKeown SJ, Wallace AS, Anderson RB. Expression and function of cell adhesion molecules during neural crest migration. *Dev Biol*. 2013;373(2):244–57.
 67. Thornton GK, Woods CG. Primary microcephaly: do all roads lead to Rome? *Trends Genet*. 2009;25(11):501–10.
 68. Bérubé-Simard F-A, Pilon N. Molecular dissection of CHARGE syndrome highlights the vulnerability of neural crest cells to problems with alternative splicing and other transcription-related processes. *Transcription*. 2019;10(1):21–8.
 69. Frenkel LD, Gomez F, Sabahi F. The pathogenesis of microcephaly resulting from congenital infections: why is my baby’s head so small? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2018;37(2):209–26.
 70. Komarasamy TV, Adnan NAA, James W, Balasubramaniam VRMT. Zika Virus Neuropathogenesis: The Different Brain Cells, Host Factors and Mechanisms Involved. *Front Immunol*. 2022;13:773191.
 71. Carvalho IF, Alencar PNB, Carvalho de Andrade MD, Silva PG de B, Carvalho EDF, Araújo LS, et al. Clinical and x-ray oral evaluation in patients with congenital Zika Virus. *J Appl Oral Sci*. 2019;27.
 72. D’Agostino ÉS, Chagas JRLP, Cangussu MCT, Vianna MIP. Chronology and sequence of deciduous teeth eruption in children with microcephaly associated to the Zika virus. *Spec Care Dent*. 2020;40(1):3–9.
 73. Gusmão TP de L, Faria ABS de, Leão Filho JC, Carvalho A de AT, Gueiros LAM, Leão JC. Dental changes in children with congenital Zika syndrome. *Oral Dis*. 2019;
 74. Aragón N, Díaz C CA. Características dentales, oclusales y craneofaciales de niños con microcefalia por infección congénita por zika: informe de 3 casos del Valle del Cauca, Cali-Colombia-2020. *Cleft Palate Craniofac J*. 2021;Volumen: 5:1318–25.
 75. Silva LV de O, Hermont AP, Magnani IQ, Martins CC, Borges-Oliveira AC. Oral alterations in children with microcephaly associated to congenital Zika syndrome: A systematic review and meta-analyses. *Spec Care Dent*. 2022;
 76. Fonteles CSR, Monteiro FC, Bastos Vasconcelos R, Jalles Monteiro A, Maia Chaves Júnior C, Franco Marçal F, et al. Defining dysmorphic facial features in congenital Zika syndrome. *Am J Med Genet Part A*. 2021;185(2):424–33.
 77. Calle-Giraldo JP, Rojas CA, Hurtado IC, Barco C, Libreros D, Sánchez PJ, et al. Outcomes of congenital Zika virus infection during an outbreak in Valle

- del Cauca, Colombia. *Pediatr Infect Dis J*. 2019;38(7):735–40.
78. RAUTEN A-M, MAGLAVICEANU C, Popescu MR, MARTU I, POPESCU D, SURLIN P, et al. Correlations between craniofacial morphology and dento-maxillary anomalies in a population of children in the South west region of Romania. *Curr Heal Sci J*. 2014;40(3):200.
 79. Aragón N, Díaz C, Contreras A. Dental, Occlusal, and Craniofacial Features of Children With Microcephaly Due to Congenital Zika Infection: 3 Cases Report From Valle del Cauca, Cali—Colombia—2020. *Cleft Palate-Craniofacial J* [Internet]. 2021 Feb 10;58(10):1318–25. Available from: <https://doi.org/10.1177/1055665621990978>
 80. Shah T, Thaker MB, Menon SK. Assessment of cephalic and facial indices: a proof for ethnic and sexual dimorphism. *J Forensic Sci Criminol*. 2015;2(4):101.
 81. Hernández CP. Terapia miofuncional en los síndromes craneofaciales. *Boletín de AELFA*. 2012;12(2):54–60.
 82. de la Salud AM. Clasificación internacional del funcionamiento, de la discapacidad y de la salud: informe de la Secretaría. Organización Mundial de la Salud; 2001.
 83. Järvinen S. Floating norms for the ANB angle as guidance for clinical considerations. *Am J Orthod Dentofac Orthop*. 1986;90(5):383–7.
 84. Ospina ML, Tong VT, Gonzalez M, Valencia D, Mercado M, Gilboa SM, et al. Zika Virus Disease and Pregnancy Outcomes in Colombia. *N Engl J Med*. 2020;383(6):537–45.
 85. Arboleda C, Buschang PH, Camacho JA, Botero P, Roldan S. A mixed longitudinal anthropometric study of craniofacial growth of Colombian mestizos 6–17 years of age. *Eur J Orthod*. 2011;33(4):441–9.
 86. Marrs C, Olson G, Saade G, Hankins G, Wen T, Patel J, et al. Zika Virus and Pregnancy: A Review of the Literature and Clinical Considerations. *Am J Perinatol*. 2016;33(7):625–39.
 87. del Campo M, Feitosa IML, Ribeiro EM, Horovitz DDG, Pessoa ALS, França GVA, et al. The phenotypic spectrum of congenital Zika syndrome. *Am J Med Genet Part A*. 2017;173(4):841–57.
 88. Jose Jaime Castaño Castrillon OAVA. Curvas antropometricas de los niños controlados en crecimiento y desarrollo en la institucion de salud de primer nivel en Manizales (Colombia) años 2005 a 2010. Univ Manizales.
 89. Martins MM, Alves da Cunha AJL, Robaina JR, Raymundo CE, Barbosa AP, Medronho R de A. Fetal, neonatal, and infant outcomes associated with maternal Zika virus infection during pregnancy: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2021;16(2):e0246643.
 90. Bedoya A, Osorio JC, Tamayo JA. Facial biotype in three Colombian ethnic groups: A new classification by facial index. *Int J Morphol*. 2012;30(2):677–82.
 91. Ribeiro RA, Mattos A, Meneghim MDC, Vedovello SAS, Borges TMD, Santamaria M. Oral and maxillofacial outcomes in children with microcephaly associated with the congenital Zika syndrome. *Eur J Orthod*. 2021;43(3):346–52.
 92. do Amaral BA, Gomes PN, Azevedo ID, Galvão HC, Oliveira AGR da C,

- Rabelo SGF. Prevalence of malocclusions in children with microcephaly associated with the Zika virus. *Am J Orthod Dentofac Orthop*. 2021;159(6):816–23.
93. Fialho MPN, Pinzan-Vercelino CRM, Nogueira RP, Gurgel J de A. Relationship between facial morphology, anterior open bite and non-nutritive sucking habits during the primary dentition stage. *Dental Press J Orthod*. 2014;19(3):108–13.
 94. Bedoya A, Osorio JC, Tamayo JA. Tamaño del Arco Dental, Fuerza de Mordida, Anchura Bizigomatica y Altura Facial en Tres Grupos Étnicos Colombianos. *Int J Morphol*. 2015;33(1):55–61.
 95. Mora-Zuluaga N, Soto-Llanos L, Aragón N, Torres-Trujillo K. Relationship of Malocclusions with Disorders of the Temporomandibular Joint in Children of CALI—Colombia. *Eur J Dent*. 2022;
 96. Alzate-García F de L, Serrano-Vargas L, Cortes-López L, Torres EA, Rodríguez MJ. Cronología y secuencia de erupción en el primer periodo transicional. *Ces Odontol*. 2016;29(1):57–69.
 97. Choukroune C. Tooth eruption disorders associated with systemic and genetic diseases: clinical guide. *J Dentofac Anomalies Orthod*. 2017;20(4):402.
 98. Alencar PNB, Lima MCDF, Carvalho IF, Araújo LS, Silva PGDB, Lopes LL de A, et al. Radiographic Evaluation of Dental Anomalies in Patients with Congenital Zika Virus Syndrome. *Braz Oral Res*. 2021;35:1–7.
 99. Ceron-Bastidas XA. The ICDAS system as a complementary method for the diagnosis of dental caries. *Rev Ces Odontol*. 2015;28(2):100–9.
 100. Moore CA, Staples JE, Dobyns WB, Pessoa A, Ventura C V, Fonseca EB da, et al. Characterizing the Pattern of Anomalies in Congenital Zika Syndrome for Pediatric Clinicians. *JAMA Pediatr* [Internet]. 2017 Mar 1;171(3):288–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27812690>
 101. Prata-Barbosa A, Martins MM, Guastavino AB, da Cunha AJLA. Effects of Zika infection on growth. *J Pediatr (Versão em Port)*. 2019;95:30–41.
 102. de Menezes PCB, de Oliveira Ponte Y, Girão DC, de Albuquerque Vasconcelos A, de Araujo Martins L, Cunha KAC, et al. Síndrome congênita do Zika vírus—um novo desafio ao odontopediatra: uma revisão bibliográfica. *Rev Eletrônica Acervo Saúde*. 2020;12(3):e2544–e2544.
 103. Pachajoa H, Tan YT, Zea A, Candelo E, Valencia V, Contreras J, et al. Neurozika , de las ciencias básicas a la práctica clínica . Revisión de la literatura Neurozika , from the basic science to the clinical practice . Literature review. *Acta Neurol Colomb*. 2021;37(5):27–34.

4. CAPÍTULO III: Desarrollo de un modelo de infección de ZIKV en células embrionarias pluripotenciales y diferenciadas a linajes neurales.

4.1 Introducción

Células de la cresta neural (CCN) en la embriogénesis

Las CCN son un tipo celular multipotente, que se diferencia en glía (G), neuronas (N), melanocitos (M), miofibroblastos (F) y condrocitos (C) (es decir, progenitor GNMFC) y responden a Sonic Hedgehog (Shh), un gen morfógeno identificado como crucial para la supervivencia de las CCN craneales y la formación del esqueleto craneofacial (1,2); sin embargo su destino de diferenciación no está condicionado solamente por la cantidad de colonias altamente activas en proliferación, sino que también dependen de señales extracelulares adicionales (3,4). Este linaje celular, contribuye a todos los tejidos craneofaciales (5), migrando hacia los arcos faríngeos para formar los huesos y el tejido conectivo del esqueleto craneofacial facial (6,7). El esquema resumen de la señalización de las Células de la Cresta Neural y sus derivados (**Figura III-1**) (2).

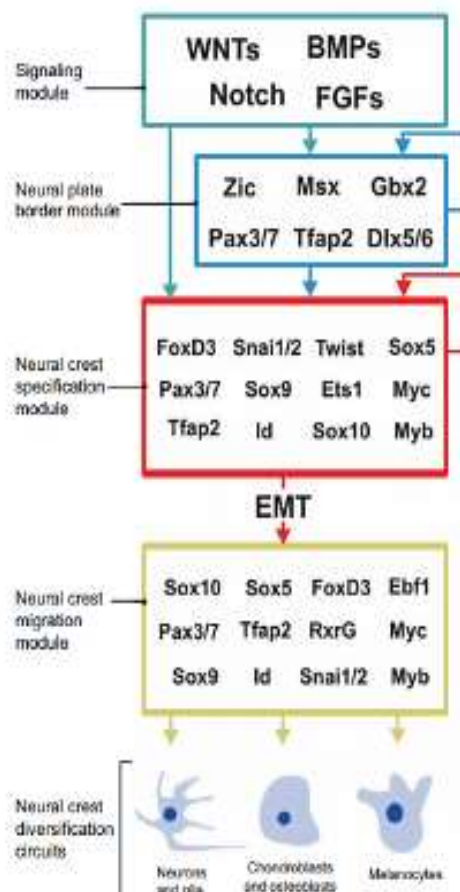


Figura III-1. Esquema de señalización genética de células de la Cresta Neural durante etapas premigratoria y migratoria (2)

Las células responden a señales específicas según su destino a estímulos mecánicos, moléculas unidas a la matriz extracelular o factores externos solubles (2). Es muy importante la regulación génica para la maduración y diferenciación de la cresta neural (CN) medida por las proteínas WNT, las BMP y las Cadherinas (2,5,8). Las CCN craneales del perfil mesenquimal son fundamentales en el desarrollo craneofacial ya que son las únicas células capaces de diferenciarse en condrocitos y osteoblastos (3,9). El neuro-cráneo y el viscerocráneo se desarrollan a partir del mesénquima, que se deriva de la cresta neural y del mesodermo paraxial (6,10) con frecuencia hay detección hasta de un 10% de alteraciones por causas genéticas (11). La mayoría de las malformaciones congénitas involucran tejidos cráneo-faciales (5).

Una de las vías de diferenciación de las CCN mejor descritas es la del ácido retinoico, el cual co-regula vías cruciales como las de WNT, BMP, FGF y EMT para la diferenciación de las CCN troncales (2,12). En relación con la acción del ácido retinoico sobre las CCN craneales con base en modelos de líneas celulares humanas, han identificado la acción sinérgica de la vía Hippo con la vía dependiente de YAP y la diferenciación celular. YAP está más asociado con marcadores de diferenciación celular para dar origen a linajes celulares no neuronales (condrocitos, osteoblastos, adipocitos) (3). En resumen, una vez se consolida el selle del tubo neural, las CCN colonizan diferentes regiones del embrión con el fin de generar tipos celulares distintos como: neuronas periféricas y glías, neuronas hipotalámicas, condrocitos y osteoblastos craneofaciales, melanocitos, células de cromafín suprarrenal y también tipos de células del corazón, ojo y oído interno que contribuye a todos los tejidos faciales, incluidos los huesos, el cartílago, los dientes, los nervios y el tejido conectivo, entre otros (5,13). El potencial de diferenciación de las CCN está guiado por su posición original a lo largo del eje neural anterior-posterior, generando 5 subpoblaciones: craneales, cardíacas, vagales, tronculares y sacras (13).

La mayoría de líneas embrionarias precursoras neuronales, se dividen rápidamente y se diferencian llegando a un perfil semejante a neuroblastos *in vivo* o neuronas embrionarias; y son capaces además de elaborar neuritas inmaduras. Sin embargo no todas tienen la capacidad de dividirse a una forma terminal de diferenciación careciendo tanto de morfología como de características neuríticas de las neuronas pos-mitóticas (no tienen características de polarización como los axones y dendritas, y no expresan marcadores MAP2 y proteínas de neurofilamentos-NE) (1).

Como se conoce previamente, las células neuronales maduras son incapaces de dividirse cuando llegan a su estadio pos-mitótico; excepto las neuronas del sistema olfativo (1,14). Las líneas celulares clonales de continua división, son muy útiles para estudiar aspectos relacionados con el sistema nervioso (1,15); sin embargo, la línea celular ideal para el análisis de los procesos de maduración neuronal y los factores intrínsecos que afectan al establecimiento del fenotipo neuronal maduro, sería uno que se dividiera rápidamente de modo que pudiera crecer en grandes

cantidades y que abandone el ciclo celular e induzca un compromiso irreversible con un fenotipo neuronal en un estado pos-mitótico estable (1,14). Estas células elaborarían extensos procesos neuríticos y madurarían a un estado similar al de las neuronas primarias en cultivo (16). Un sistema como este permitiría a los investigadores expresar proteínas mutantes o neurotóxicas que afectarían las características neuronales maduras. Las líneas celulares de carcinoma embrionario satisfacen algunos de los criterios anteriores; generalmente se desarrollan a partir de su estadio indiferenciado que con tratamiento en el cultivo (incluido el AR- ácido retinoico), se diferencian a uno o varios tipos celulares según las condiciones extracelulares (1,14). Este proceso se parece a los procesos reales de inducción celular de los fenotipos derivados *in vivo* hacia células neuronales, gliales, musculares y/o endoteliales en diferentes etapas de la diferenciación (1,14,17).

Hay muy pocas líneas celulares humanas disponibles que al ser inducidas puedan mostrar propiedades neuronales. Las células NTERA-2, derivadas de teratocarcinoma humano, son capaces de sufrir los cambios fenotípicos descritos previamente, bajo condiciones de cultivo tratado con AR; pero se diferencia de las demás líneas celulares embrionarias, por continuar el desarrollo de un perfil neuronal de neurona madura en estadio pos-mitótico (16,18–21). Sin embargo las neuronas representan solo un porcentaje de las células en el cultivo inducido y coexisten con una población mas abundante de células planas grandes no caracterizadas completamente, algunas identificadas como neuroglia y un número residual de células madre no diferenciadas.

Células embrionarias pluripotenciales como modelo de estudio *in vitro* en el desarrollo embrionario craneofacial.

Las líneas embrionarias pluripotenciales humana, tienen una firma genética, que permite recrear el comportamiento de las CCN, migratorias y su diferenciación a derivados de tejido nervioso o ectomesenquimales. Hay líneas propiamente humanas derivadas del blastocisto que son muy útiles; sin embargo las líneas embrionarias carcinogénicas, tienen un comportamiento similar a las embrionarias humanas, y de estas, las NTERA2 tienen un patrón genético casi que idéntico a las embrionarias humanas (22). Esta línea embrionaria carcinogénica es derivada de línea germinal de carcinoma de testículo y tiene un protocolo validado de diferenciación a linaje neural y no neural mediado por ácido retinóico (14,18).

Aun son varios los efectos del desarrollo de la infección congénita por ZIKV en humanos que se desconocen, particularmente los mecanismos de inducción de la microcefalia y las otras alteraciones orales, dentales, craneofaciales y del neurodesarrollo. Esto justifica el desarrollo de modelos de infección biológica, que recreen con la mayor precisión el proceso de infección viral en los precursores de los tejidos craneofaciales y el desarrollo de enfermedad en los humanos. Lo anterior permitirá continuar investigando los mecanismos en la fisiopatología de la infección congénita del ZIKV y sus consecuencias (15,23), con impacto en la prevención y/o

desarrollo de opciones terapéuticas para estas complicaciones tan complejas en el caso de la infección congénita por el virus del Zika.

Se han utilizado múltiples modelos de la infección ZIKV tanto en embriones de animales (pollos y ratones) como en cultivos celulares de precursores neurales que crecen en monocapas tales como progenitores neurales derivados de células madre (hiPSC-por su sigla en inglés) o modelos tridimensionales como neuroesferas o minicerebros recreando la influencia de factores ambientales extracelulares (6,24–27). Si bien en la mayoría de estos modelos los precursores neurales parecen ser la población más afectada por el ZIKV causando muerte celular, alteración del ciclo celular y diferenciación prematura o alteración de la neurogénesis (6,27–29), lo cual explicaría la pérdida de progenitores neurales en la capa cortical del cerebro, el efecto viral sobre otros tejidos del neurocráneo o células mesenquimales o incluso neuronas maduras pos-mitóticas están menos explicados con estos modelos.

Estudios previos en modelos animales y algunas líneas celulares embrionarias sugirieron que las células neurales, gliales y no neuronales pueden infectarse/afectarse por el ZIKV y provocar microcefalia, entre otras características congénitas neurodegenerativas que son desarrollados para comprender la patogenia (6,15,23,30,31). En algunos en modelos de pollo y de ratón con microcefalia inducida por ZIKV, se reporta el crecimiento alterado en estructuras craneofaciales como maxila y huesos parietales y signos de enfermedades neurodegenerativas durante el desarrollo (6); en líneas progenitoras se ha estudiado como se afecta la diferenciación neuronal, sobretodo de la corteza (15) y cómo la respuesta del interferon1 (INF I) puede inducir apoptosis celular tras la infección con ZIKV (23,31).

Las células embrionarias precursoras neurales una vez se sella el tubo neural, han mostrado una impronta genética precisa que guía la diferenciación, pero su entorno extracelular y los moduladores del crecimiento también pueden influir en su destino celular y un buen ejemplo de ello lo representan las células migratorias multipotenciales que dan lugar al tejido neuronal del Sistema Nervioso Central (SNC) y/o tejidos no neuronales que se originan en músculos, cartílagos, huesos y tejidos dentales en la cabeza del embrión (2,3). Hay reportes de efectos diferenciales entre tejidos del SNC y los otros tejidos derivados también de las células de la cresta neural (CCN) de morfología mesenquimal como el hueso y tejidos conectivos, y los gérmenes dentales, los cuales aparentemente resultan menos afectados tras la infección congénita con ZIKV; ya que en estudios clínicos se reportan algunas afectaciones en niños con microcefalia, ausencia de selle labial, bruxismo, disfagia alteraciones en el desarrollo maxilar, micrognatia mandibular, y alteraciones miofuncionales en los músculos de la masticación y alteraciones en la cronología de la erupción en los dientes deciduos (32). Sin embargo, las afecciones de los derivados mesenquimales parecen no ser tan frecuentes o tan disruptivos como los neuronales; y lo confirman reportes en modelo animal donde comparan como lo efectos en embriones de pollo son mayores en el neurodesarrollo que en la formación de huesos derivados del viscerocráneo como la maxila (6).

Por lo anterior, los modelos *in vivo* (animal) e *in vitro* son una estrategia útil para el desarrollo de experimentos que puedan generar nuevas hipótesis acerca de la afectación diferencial del ZIKV por los precursores de tejido del SNC respecto a los otros de la estructura craneofacial menos afectados, a pesar de su origen común desde las CCN (33). En las infecciones experimentales con el virus del Zika en los modelos murinos, se ha revelado que el momento de la infección puede ser clave con respecto a las consecuencias que se genere en los embriones toda vez que se generan infecciones en las células de los trofoblastos que se pueden caracterizar por el marcador CDX2, en las células del epiblasto que son marcadas SOX2 y en el endodermo primitivo o SOX17 es decir que todas las células progenitoras del feto se pueden infectar y entre mas temprana la infección mayores pueden ser la consecuencias directas o indirectas del virus (15,23,34–36). Las infecciones tardías con el virus del Zika, una vez el embrión esta completamente formado, generan menos consecuencias congénitas y son de menor severidad (24,37–40).

Línea celular NTERA-2 (NT-2): Un modelo de células embrionarias pluripotenciales humanas.

Las células NT-2 son una línea celular bien caracterizada de células madre embrionarias provenientes de línea germinal, un teratocarcinoma testicular humano, que se diferencian a linajes principalmente neurales al ser estimuladas con ácido retinoico (AR) (19,20,41). Las células NT-2 se han utilizado principalmente para el estudio de neurodegeneración inducida por toxinas como el alcohol (42) y enfermedades como el Alzheimer (43,44); ensayos clínicos en humanos para recuperación de función neuronal después de infarto cerebral (45) y recientemente como modelo de infección por los virus neurotrópicos tales como Citomegalovirus (CMV)(46) y el Virus de inmunodeficiencia Humana (VIH)(47).

Las células NT-2 expresan los genes claves reguladores que identifican a las células madre embrionarias, tales como Oct4, Sox2 y Nanog, y también su perfil proliferativo (22), pero se diferencia de las demás líneas celulares embrionarias, por continuar el desarrollo hacia un perfil neuronal maduro pos-mitótico por acción del AR (16,18–21). Sin embargo, bajo la influencia de otros estímulos diferentes al AR, por su naturaleza carcinoembrionaria de línea germinal tiene el potencial para diferenciarse a otros tipos celulares incluidos musculares o endoteliales (48). Una parte importante de las células NT-2 diferenciadas con AR expresan todos los marcadores neuronales (moleculares y funcionales) (**Tabla III-1**), mientras que otras células en el cultivo no se diferencian a neuronas (NT-2-noN) y conservan el fenotipo y biomarcadores de células epiteliales, células gliales o astrocitos. Las células NT-2 han sido utilizadas en importantes investigaciones biomédicas en las últimas 2 décadas; centradas en el estudio de condiciones neurodegenerativas patológicas y la capacidad neuroprotectora cuando hay exposición neuronal a toxinas o patógenos (21,44,49). Sin embargo, no han sido utilizadas para estudiar la infección por ZIKV, con la ventaja de que por su pluripotencialidad, parecen un modelo prometedor para evaluar el tropismo y efecto viral sobre las células

precursoras como las de la CCN que originan los tejidos cráneo-faciales, y de sus progenies diferenciadas a linajes no neuronales y neuronales, incluidas las neuronas maduras.

La línea celular NT-2 diferenciadas al fenotipo neuronal (NT-2-N) son estables, lo que las vuelve útiles para examinar funciones neuronales fisiológicas o en el estudio de sistemas de moléculas bioactivas en enfermedades neurodegenerativas humanas (1,16,44). Dado que las neuronas derivadas de células NT-2 diferenciadas con AR no se dividen, incluso en presencia de suero, representan una fuente accesible para reproducir cultivos neuronales humanos altamente purificados (1,16).

Si bien, se ha reportado que las células madre embrionarias no se infectan en estadios inmaduros con patógenos neurotrópicos clásicamente asociados a TORCH, si se conoce que las progenies neurales, resultado de la diferenciación, se vuelven permisivas para la infección productiva de varios de estos patógenos incluidos CMV (15,46,47). Por todo lo anterior, el objetivo de este capítulo fue optimizar un modelo de infección con ZIKV in vitro en células madre embrionarias pluripotenciales NT-2, para determinar el efecto del virus sobre precursores mesenquimales, neurales y neuronas maduras, en términos de la infectividad/tropismo y/o afectación de la diferenciación hacia el linaje neural (neuronas, astrocitos y oligodendrocitos); y posteriormente poder realizar un análisis comprensivo del perfil de expresión transcriptómico de estas infecciones en el **Capítulo IV**.

Tabla III-1. Marcadores en células NT-2 según su fenotipo de diferenciación.

Proteína	Anticuerpo	Indiferenciada	Neuronal	No Neuronal	Ref. reporte de anticuerpos
NF-L	Rabbit anti-NF-L	-	+	-	Torjanowski et al., 1989 ^a . Ackerman, 1994
NF-M	RMO254	-	+	-	Lee et al., 1987
NF-H	RMO24	-	+	-	Lee et al., 1987. Ackerman, 1994
SSE-3	*	-	+	+	Tonge-Andrews, 2010
SSE-4	*	-	+	+	Tonge-Andrews, 2010
NF-66	Rabbit anti-NF-66	-	+	-	Chiu et al., 1989
Vimentina	Rabbit anti-vimentina	-	-	+	Pleasure et al., 1990
Periferina	Rabbit anti-periferina	-	-	+	Parysek et al., 1988
GFAP	2.2B10	-	-	+	Lee et al., 1984
Keratina 8 y 18	Cam5.2	-	+	-	Becton Dickinson
MAP1A	HMI	-	+	-	Huber and Matus, 1984
MAP1B	IWM 3G5	-	+	-	L. Binder, datos no publicados
MAP2	AP14	-	+	-	Geisert et al., 1989b
Tau	T14	-	+	-	Trojanowsky et al., 1989
Sinaptoficina	SY-38	-	+	-	Boehringer Mannhei

Cromogranina	LKH110	-	+	-	Boehringer Mannhei
GAP-43	9-1E10	-	+	-	Gosin et al., 1990
Gangliosido G_{T3}	A ₂ B ₅	-	+	-	Dubois et al., 1990
NCAM	ERIC-1	-	+	-	Patel et al., 1990
PSA-NCAM	MenB	-	+	-	Theodosios et al., 1991
NESTIN	Millipore	+	-	-	Handley et al., 2016
TAZ	Cell signaling	+	-	+	Handley et al., 2016
TUJ1	Covance, Abcam, BD Pharmingen™	+	+	-	González-Burguera, 2016; Handley et al., 2016; Tonge and Andrews, 2010.
ME311		-	-	+	Ackerman, 1994
HNK-1	BD Pharmingen™	-	+	-	Handley et al., 2016
Neu-Fox3	Millipore	-	-	+	González-Burguera, 2016
AP2	Novus Biologicals	-	-	+	Chambers 2009

*Datos no mostrados.

4.2 Metodología.

Tipo de estudio:

Es un estudio *in vitro* de infección por ZIKV en un modelo celular (NT-2) que simula la pluripotencialidad de las células premigratorias de las células embrionarias pluripotenciales humanas y su diferenciación hacia linaje neural y neuronas maduras tras la estimulación con Ácido Retinoico (AR).

Línea celular NTERA-2 y mantenimiento del cultivo

Se utilizó la línea celular de carcinoma embrionario NTERA-2 (NT2/loneD1) obtenidas del ATCC (catalogo # CRL1973), que contiene células madres pluripotenciales precursoras de múltiples tipos celulares incluidos linajes neural y no neural, y que permite el aislamiento de neuronas hasta su forma pos-mitótica (18,50) funcional y células no neuronales, tras la estimulación con AR (3,9,51,52). Las células NT-2 fueron mantenidas en cultivo y propagadas a 37°C y 5% CO₂ con medio de cultivo de crecimiento (DMEM+SFB 10%+ Penicilina-Estreptomicina 1%) según los protocolos previamente descritos (14,19). Para obtener monocapas celulares indiferenciadas confluentes (70-80%) en 2-3 días, se sembraron a una alta densidad utilizando aproximadamente 2*10⁶ células/ botella de 25cm² (Falcon®) y/o placas en cámara de cultivo LabTek (Millicell-EZ millipore PEZGS0816®). Las NT-2 en cultivo deben tener resiembra para autorrenovación cada 5 días, tiempo después del cual empiezan a desprenderse y perder viabilidad. La línea celular se expandió mediante el procedimiento de cultivo descrito anteriormente y se preservaron múltiples viales para los experimentos mediante congelamiento en

nitrógeno líquido usando criopreservantes (5%DMSO,10%SFB) y condiciones estandarizadas de acuerdo a las instrucciones del proveedor. El recuento celular para determinar la densidad de siembra y cosecha de los cultivos se realizó en la cámara de Newbauer y la viabilidad celular se estimó mediante tinción con colorante vital azul de tripán (Gibco®). La observación y monitoreo visual de los cultivos se hizo mediante microscopia de luz invertida, utilizando un microscopio Diavert (Zivot®) con objetivo con magnificación x100.

Virus zika (ZIKV)

Se utilizó un aislado clínico de ZIKV del biorepositorio del Laboratorio de VIREM en Univalle, cultivado y secuenciado de un caso de Zika en Cali (COL[2016]13785). La secuencia genómica de este aislado viral es muy similar y se agrupa en el mismo conglomerado o “cluster” genético de los otros virus Zika secuenciados en Colombia asociados o no con Síndrome Congénito por Zika (SCZ) en Colombia y otros países de Suramérica durante la epidemia y pos-epidemia (53,54). Para todos los experimentos se usó el mismo lote viral stock propagado en células VERO que consiste en una suspensión que produce 5×10^5 Unidades Formadoras de Placa por cada mL (UFP/mL)

Línea celular VERO y plaqueo viral

Para la titulación del inóculo de ZIKV por formación de placas se utilizó la línea celular VERO clon E6 (ATCC CRL-1586™) siguiendo protocolos descritos anteriormente (55). En resumen, monocapas de células Vero al 90% de confluencia sembradas en placas de 24 pocillos, se inocularon con una suspensión viral que produce 80-100 unidades formadoras de placa (UFP) por mL y se incubó a 37°C durante 1 h para permitir la adsorción del virus antes de la superposición con un medio semisólido (1,2 % de carboximetilcelulosa, 50% de 2X MEM, 1% de aminoácidos no esenciales, 2% FBS, 1% penicilina/estreptomicina y 1% anfotericina B). Los cultivos se incubaron durante 5 días a 37 °C, 5% CO₂ para permitir el desarrollo de placas de virus. A continuación, las células infectadas se fijaron con solución de formaldehído al 20% y se tiñeron con cristal violeta para contar las placas y estimar las UFP/mL de la suspensión.

Protocolo de diferenciación de las NT-2 con AR

Para estimular la diferenciación de las células NT-2 hacia una progenie de linajes neurales y neuronas pos-mitóticas se utilizó AR en cantidades micromolares basado en el protocolo establecido por Andrews (20) y modificado por Pleasure (1). El protocolo de diferenciación optimizado se resume en la **Figura III-2**, y consistió de 2 procedimientos corridos en paralelo ambos de los cuales generan neuronas maduras. Uno de ellos enriquecido con un alto porcentaje de neuronas maduras (Panel A, **Figura III-2**) y el otro conteniendo una mezcla de neuronas maduras y células no diferenciadas a neuronas de aspecto epitelial (Panel B) . En resumen, a monocapas celulares de NT-2, de 2 días de cultivo en botellas de poliestireno de 25

cm² y placas LabTek, y confluentes entre el 80%- 90% se les reemplazo el medio de crecimiento por uno fresco conteniendo 10^{-5} μ M de AR (*all trans-RETINOIC ACID* Sigma® Prod. No. R 2625). Los cultivos se mantuvieron con el medio de crecimiento suplementado con AR durante 4 semanas con recambio del medio 2 veces por semana, previo a reemplazar con el medio de crecimiento sin AR. Las NT-2 diferenciadas se cultivaron sin el AR por dos semanas adicionales (Panel B , **Fig. III-2**); en paralelo con el objetivo de obtener cultivos con una pureza de 90% de neuronas maduras pos-mitóticas, se sembraron nuevas botellas de cultivo solamente las células con apariencia de procesos axonales y neuritas, desprendiendo los cúmulos de ellas mediante tripsinización breve y mecánica por golpes suaves laterales de la botella con la mano. Estas células se cultivaron con adición de los antimitóticos ARAC al 1% (BLAU®) y Uracilo 1% (Neurax®) para inhibir la proliferación de las células de apariencia epitelial. En paralelo se realizaron placas LabTek (Millicell-EZ millipore PEZGS0816®) para tinción de inmunofluorescencia con marcadores neuronales.

Procedimiento de infección de células NT-2 indiferenciadas (pluripotenciales)

Se usaron para infectar con ZIKV monocapas celulares de NT-2 entre 60-70% de confluencia (aprox 1×10^6 células) en cada botella de cultivo de poliestireno de 25 cm² (Corning®) o placas de cultivo LabTek de 8 pozos (Millicell-EZ millipore PEZGS0816®) para inmunofluorescencia, las cuales fueron infectadas con una dilución de la suspensión stock de ZIKV (COL|2016|13785) que produce 1×10^5 UFP. La dosis infectiva final estimada fue una multiplicidad de infección (m.o.i) de 0.1 (m.o.i = 1×10^5 UFP / 1×10^6 células). El inóculo viral se dejó adsorber a las células por incubación a 37°C durante 1 h antes de removerlo y lavar suavemente con una solución tamponada de fosfatos (PBS) el exceso de virus no adsorbido a la superficie celular. Posteriormente se adiciono el medio de cultivo de crecimiento y se incubaron las células infectadas a 37°C y 5%CO₂ por 72h para las NT-2 indiferenciadas, previo a cosechar las botellas de células por tripsinización suave (0.25% , Sigma®) para extracción de ARN o a fijar las placas LabTek para tinción de microscopia de inmunofluorescencia (Millicell-EZ millipore PEZGS0816®).

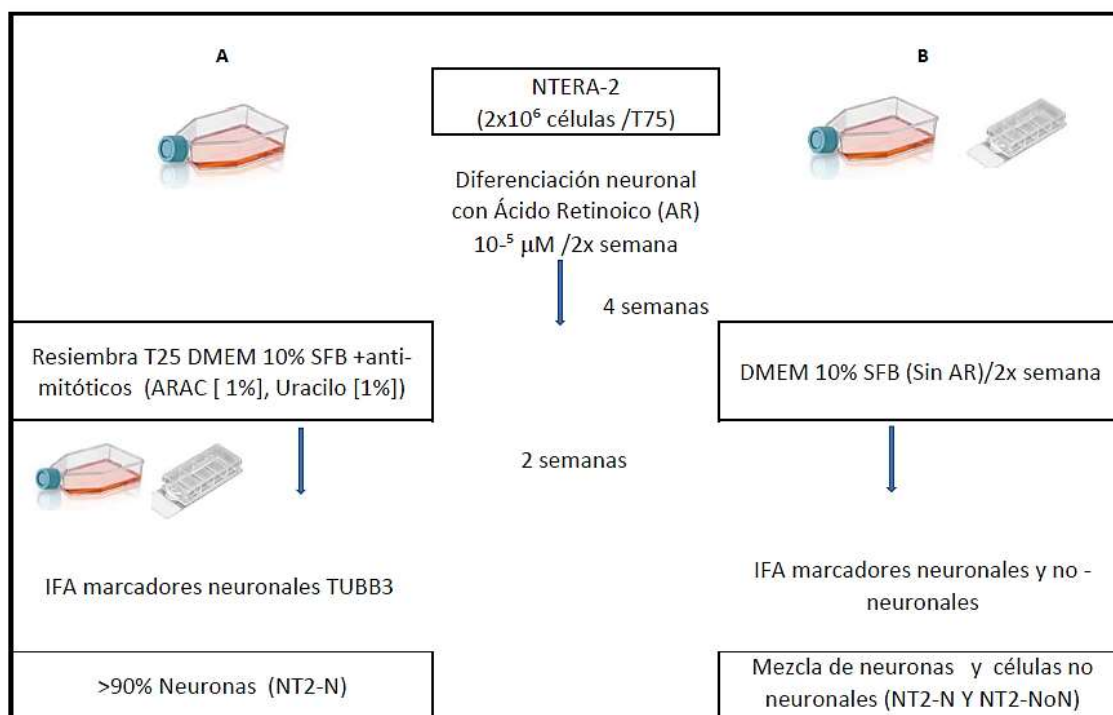


Figura III-2. Esquema del protocolo de diferenciación de las NT-2 con AR. En el panel **A**, se muestra el procedimiento para obtención de neuronas maduras con 90% de pureza (NT-2-N) y en el panel **B**, la progenie de neuronas maduras mezcladas con otras de linaje neuroepitelial no neuronal (NT2-N + NT-2-NoN).

La infección se monitoreo mediante qRT-PCR para ZIKV en el sobrenadante de los cultivos posterior a la infección (p.i) al tiempo 0h, 24h, 48h y 72h p.i. tiempo después del cual la monocapa celular se empieza a desprender y deteriorar, por lo que fue necesario terminar el experimento y cosechar el cultivo infectado. Como control negativo de la infección se utilizaron células NT-2 sin infectar que se manipularon de forma idéntica y simultáneamente como las infectadas, pero utilizando medio de cultivo en lugar de la suspensión viral. Estas condiciones de cultivo se optimizaron mediante varios experimentos con diferentes dosis de ZIKV y tiempos de infección y finalmente los resultados se generaron a partir de dos experimentos con las condiciones optimizadas. El primero de ellos con una sola réplica que se rotuló como “**NZ**” (NT-2 con ZIKV) para los propósitos del análisis o “**N**” para el control NT-2 no infectadas y el segundo experimento consistió de 3 cultivos réplicas de **NZ** a las 72 horas p.i. con ZIKV y 3 réplicas de **N** durante el mismo tiempo de cultivo.

Procedimiento de infección de células NT-2 diferenciadas con AR

Para determinar la vulnerabilidad a la infección por ZIKV de la progenie celular diferenciada de las NT-2 y el tropismo por precursores neurales (incluidos neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y microglía) en proceso de diferenciación celular y/o neuronas maduras, se infectaron con ZIKV (COL[2016|13785]) monocapas celulares de NT-2 (25 cm² y LabTeK) con apenas 14 días del proceso de diferenciación con AR, para garantizar la presencia de precursores de estas células en varios estadios de su proceso de diferenciación y otros linajes neurales

y no neurales. La infección se realizó a un m.o.i de 0.1 de manera idéntica al proceso de infección descrito arriba para las NT-2 pluripotenciales. Las células NT-2 + AR infectadas se mantuvieron en cultivo y continuamente en proceso de diferenciación con AR durante todo el tiempo posterior a la infección (p.i.) hasta que se cosecharon a las 144 h p.i, por tripsinización suave (0.25% , Sigma) para extracción de ARN y las placas LabTek se procesaron para tinción de microscopia de inmunofluorescencia. La infección se monitoreo mediante qRT-PCR para ZIKV en el sobrenadante de los cultivos al día 0, y p.i. a las 36, 72h, 120 h y 168 h momento en el cual se estabilizo el crecimiento exponencial de la carga viral y las células mantenían viables. Como control de células NT-2 diferenciadas e infectadas con ZIKV, se procesaron células NT-2 sin infectar que se trataron con AR y cultivaron de forma idéntica y simultáneamente como las infectadas, pero utilizando como inóculo viral falso (MOCK) medio de cultivo en lugar de la suspensión viral. Las anteriores condiciones del cultivo se optimizaron realizando varios experimentos y finalmente los resultados se generaron a partir de dos experimentos con las condiciones optimizadas y un tiempo de infección con ZIKV de 144 horas. El primero de ellos con una sola réplica que se rotulo como “**N-RA-Z**” (NT-2 con AR infectadas con ZIKV) para los propósitos del análisis o “**N-RA**” para el control NT-2 diferenciada con AR no infectadas y el segundo experimento consistió de 3 cultivos réplicas de **N-RA-Z** y 3 cultivos réplicas de **N-RA** como control de diferenciación.

Para determinar el efecto de la infección ZIKV sobre la capacidad de diferenciación de los precursores hacia el linaje neural, se realizó otro experimento en el que la infección con ZIKV se realizó 72 horas previo a iniciar la diferenciación con AR y posteriormente a la infección los cultivos se mantuvieron con AR durante 21 días (NT-2+ZKV+AR), exactamente el mismo tiempo en diferenciación con AR que los cultivos NRAZ en los que se realizó la infección posterior al AR. En este experimento se usó la misma dosis m.o.i 0.1 del ZKV y los cultivos se rotularon como “**NZRA**” 3 replicas y “**NRA**” las tres réplicas de los controles sin infectar.

Ensayo qRT-PCR para ZIKV

Para monitorear infección ZIKV y magnitud de la carga viral en los cultivos celulares de NT-2 , se obtuvieron alícuotas de los sobrenadantes a diferentes tiempo p.i. y se realizó extracción del ARN viral utilizando el estuche comercial AcuPrep (BIONEER®). La detección y estimación aproximada de la carga viral(valor Ct) se realizo mediante el ensayo de Transcripción Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qRT-PCR) según el protocolo del CDC, usando los primers y sondas fluorescentes FAM publicados por Lanciotti et al (54), estandarizado y validado para uso clínico en el Laboratorio de virología de la Universidad del Valle.

Inmunofluorescencia Indirecta:

Para detectar la presencia de neuronas maduras se intentó la tinción con los anticuerpos monoclonales primarios en ratón (MAb), anti-TUBB3 (Biolegend®

catalog# MMS-435P) y MAP-2 (Clone 5F9-Kennth Kosik). El MAb Anti-TUBB3 es específico para la proteína tubulina beta 3 clase III expresada en linaje neuronal y neuronas maduras y marca el citoesqueleto del soma, las dendritas y los axones (neuritas). MAP-2 es específico para la proteína asociada a microtúbulos 2, en somas y dendritas de neuronas maduras. La reacción antigénica-Mab se detectó mediante un anticuerpo secundario anti-ratón obtenido en cabra conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Millipore®).

Para detectar células infectadas con ZIKV se utilizaron como anticuerpos primarios de detección un MAb específico a la proteína E del ZIKV (Invitrogen® Zika Virus Envelope Protein Monoclonal Antibody-6932) y dos pool de sueros humanos policlonales del biorepositorio de VIREM, tipificados y cuantificados (ELISA y VirScan) con especificidad para las proteínas NS2B y E obtenidos de personas con Zika durante la epidemia. Se usaron los conjugados FITC anti-ratón para detectar el MAb anti-E y para detectar los anticuerpos humanos con reactividad para NS2B y E, un conjugado FITC anti-IgG humana del kit FA112d-1005-51 (EUROINMUNE®). Los controles negativos de la tinción consistieron en suero normal de ratón como anticuerpo primario o suero humano normal del kit FA112d-1005-51 (EUROINMUNE®) o un pool de sueros negativos a anticuerpos para flavivirus obtenidos antes de la epidemia de Zika en Colombia. La tinción de contraste fue el Azul de Evans.

La reacción de inmunofluorescencia se observó en un microscopio de epifluorescencia (Nikon® Zivot®) en una magnitud de x200 y x400 equipado con cámara fotográfica.

Análisis de la Información

Se realizó observación diaria visual mediante microscopía óptica diaria de los cultivos en microscopio invertido y se llevó registro fotográfico. La caracterización del efecto de la infección por ZIKV en las demás poblaciones no neuronales, para los cuales no se tuvo acceso a anticuerpos específicos para ensayos de inmunotinción; se realizó de manera preliminar con el Log2FoldChange (**Log2FC**) estimado de la expresión de genes (RNA mensajeros) para marcadores específicos de estas células (células mesenquimales, astrocitos, oligodendrocitos y microglía), comparando los cultivos infectados con los no infectados (según metodología descrita en **Capítulo IV**). La información obtenida durante el desarrollo y caracterización de los cultivos se consigna en fotos y archivos *pdf*. Toda la información derivada de los experimentos de optimización de protocolos y resultados de diluciones, manejo de densidad celular, tiempos de cultivo, porcentajes de confluencia celular, esquemas de diferenciación de células NT-2 e inventarios celulares y de placas de células fijadas para ensayos de inmunofluorescencia, se consignó en la minuta de laboratorio y archivos digitalizados en tablas de Excel®; y reposan almacenados en el laboratorio de virología, del Departamento de Microbiología de la Universidad del Valle en la

custodia de los investigadores. Los registros de los resultados crudos de los ensayos de qRT-PCR provenientes de la plataforma QuantStudio 5 donde se procesaron se encuentran en el equipo y en archivos backup.

4.3. Resultados y Discusión

Establecimiento de las condiciones del cultivo celular NT-2 y diferenciación con Ácido Retinoico (AR)

Las células madre embrionarias NT-2 representan un buen modelo de las CCN premigratorias humanas por su pluripotencialidad, capacidad de autorrenovación y diferenciación a neuronas maduras pos-mitóticas.

Para identificar vías moleculares afectadas en los progenitores neurales y no neurales tras la infección por ZIKV (en el siguiente Capítulo IV), en este capítulo generamos un cultivo de NT-2 y las diferenciamos con AR hacia el linaje neural (NT-2-N) y las infectamos con una cepa colombiana de ZIKV. El cultivo celular e infección se procesó en dos condiciones, con y sin AR (**Figura III-3**).

Las células NT-2 sometidas a condiciones ideales del cultivo se multiplicaron rápidamente a confluencia celular a las 72 horas (con un primer cambio de medio a las 24 h) en cultivo, como se muestra en la **Figura III-3** (Panel A). A la microscopia óptica tienen morfología de células epiteliales de somas grandes, uniformes, y aplanada en una sola capa de confluencia (1,21) (**Figura III-3 A**). Las células embrionarias NT-2 no diferenciadas tienen varios fenotipos celulares que coexisten con otro conjunto de células no identificadas que preceden la diferenciación a distintos tipos de células según los estímulos extracelulares (1,2). Pero también un número limitado de precursores neuronales (14) que se identificaron con una molécula característica del fenotipo celular neuronal (Tubulina beta3 clase III).

Tras el estímulo con AR, después de la segunda semana, las células se organizan formando agregados de células alargadas y extensiones que se asemejan a procesos de neuritas, las cuales se superponen sobre células adherentes de morfología aplanada organizadas con apariencia de lagunas hacia la 3-4 semana del cultivo (**Figura III-3 B**). Las células que forman los agregados celulares superficiales corresponden a neuronas (1,20,21), como se demuestra en la tinción de inmunofluorescencia (IFA) para el marcador específico neuronal Tubulina beta3 clase III (**Figura III-4 E**). Se observan múltiples agregados celulares IFA positivos de células con somas pequeños y procesos similares a dendritas y axones, mientras que las NT-2 sin diferenciar están negativas a este marcador neuronal o se detectan muy ocasionalmente (**Figura III-4 B**). Hay estudios que reportan que las células neuronales (**NT-2N**) que se organizan en agregados neuronales, representan hasta el 90 % del cultivo después de 14 días de cultivo enriquecido con AR (21,41). Sin embargo, una proporción importante de células en el cultivo (aproximadamente el 50%) fueron negativas al marcador neuronal y probablemente corresponden a otras células neurogliales como astrocitos, oligodendrocitos u otros progenitores

mesenquimales o células madre no diferenciadas (3,12,18,56,57). En un intento preliminar por caracterizar esta población no neuronal, estimamos la expresión de genes específicos para otras poblaciones celulares en los cultivos diferenciados con AR (**NRA**), según la metodología que se detallara luego en el **Capítulo IV**, pero que se listan en la **Tabla III-2** de este capítulo. Efectivamente después de la diferenciación con AR se continúan expresando genes propios de células precursoras y diferenciadas de los linajes mesenquimales con los conteos de secuenciación más altos (*YAP1*, *TAFAZZIN* y *FGF2*) y de oligodendrocitos (*OLIGO1*, *OLIGO2*) o microglías (*CD68*), pero sorpresivamente no de astrocitos, a juzgar por el marcador *GAP* (Ver columna NRA comparado con N de la **Tabla III-2**). Estos resultados, sugieren que la población de células precursoras mesenquimales es abundante aun en los cultivos diferenciados hacia linaje neural con AR, pero al parecer contiene muy pocos astrocitos diferenciados.

Después de 4 semanas de diferenciación con AR y 2 semanas adicionales de cultivo sin AR, se formaron múltiples capas celulares superpuestas muy densas de aspecto borroso que impiden la visualización de estructuras a la microscopia óptica o de contraste de fase (**Figura III-3 D**), excepto por las células de morfología epitelial en las lagunas marcadas con asteriscos en la figura, las cuales algunos estudios han reportado corresponden a astrocitos y otras células gliales.

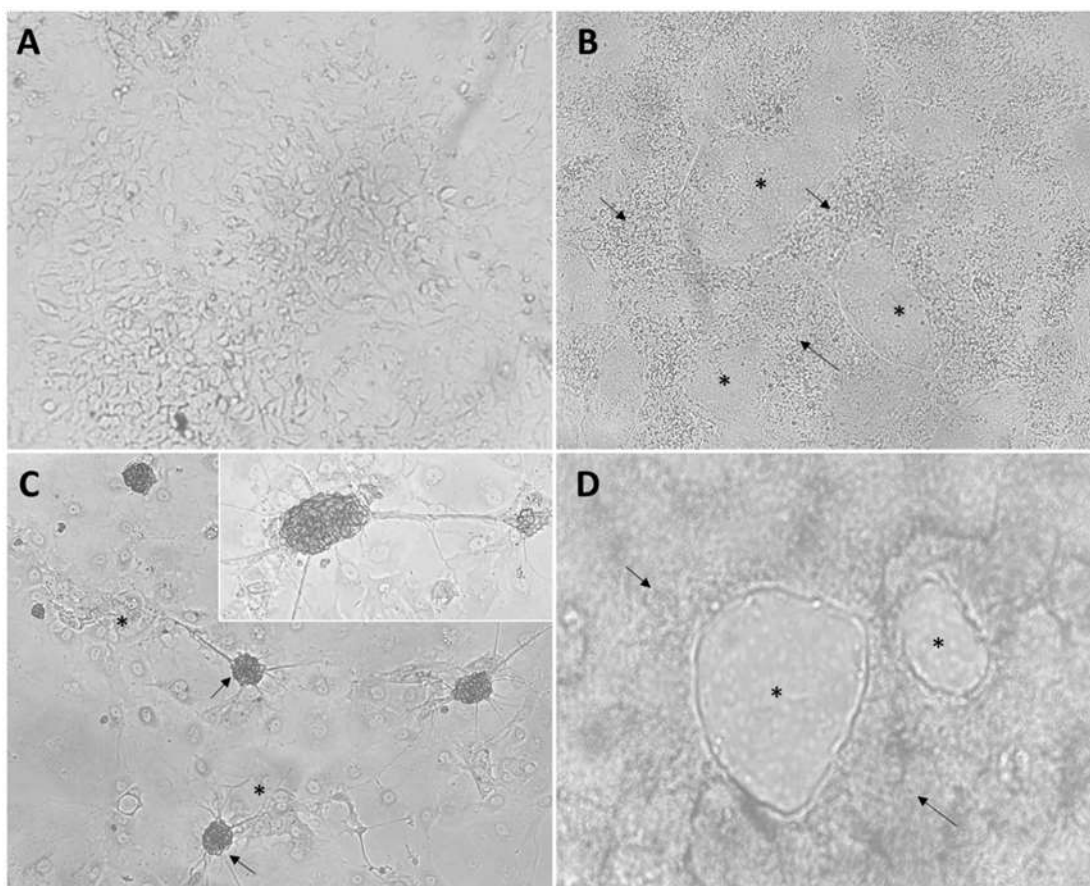


Figura III-3. Microscopia óptica del progreso del cultivo y diferenciación de las células NT-2 con AR. En (A) Células NT-2 indiferenciadas y de aspecto epitelial al 100% de confluencia en el día 3 desde el inicio del cultivo; en (B) NT-2 diferenciadas con AR durante 4 semanas, las flechas señalan agrupaciones densas de células pequeñas que exhiben procesos celulares, creciendo sobre células de morfología epitelial que se indican con asteriscos; en (C) cúmulos de neuronas maduras se indican con flechas, las cuales fueron aisladas y resembradas a partir de los cultivos en panel B, y mantenidas en cultivo por 4 semanas adicionales sin AR con los antimitóticos ARAC y Uracilo, los asteriscos indican algunas pocas células epiteliales residuales. La foto del inserto es una ampliación de la imagen de un cumulo de neuronas formando rosetas. En (D) el cultivo de células NT-2 diferenciadas con AR por 4 semanas del panel B mantenidas en el mismo cultivo por dos semanas adicionales sin AR. Las flechas señalan áreas enriquecidas de neuronas creciendo sobre áreas conteniendo células de morfología epitelial (NT-2-noN) señaladas por asteriscos. Magnificación de x100

Para determinar el potencial de diferenciación hacia neuronas maduras pos-mitóticas, se desprendieron mecánicamente y por tripsinización muy suave los acúmulos de neuronas superficiales a partir de cultivos de 4 semanas con AR (**Figura III-3 B**) y se resembraron con inhibidores mitóticos. Las células resembradas se agruparon formando rosetas con extensiones de neuritas (**Panel C Figura III-3**), que se mantuvieron viables y positivas para el marcador neuronal Tubulina beta clase III durante 4 semanas hasta la terminación del cultivo y criopreservación, consistente con la descripción previa del protocolo (1,41).

Soportados por los datos obtenidos a partir de los transcritos génicos con la metodología desarrollada en el **Capítulo IV**, se observó que las células NT-2 diferenciadas con AR al linaje neural (**NRA**) comparadas con las NT-2 en estadio embrionario pluripotencial (**N**), expresan genes que enriquecen vías relacionadas con la embriogénesis en general, confirmando que las **NT-2** son un buen modelo de simulación del destino de diferenciación de las **CCN** en la embriogénesis (2,3,58,59) (**Figura suplementaria 1**).

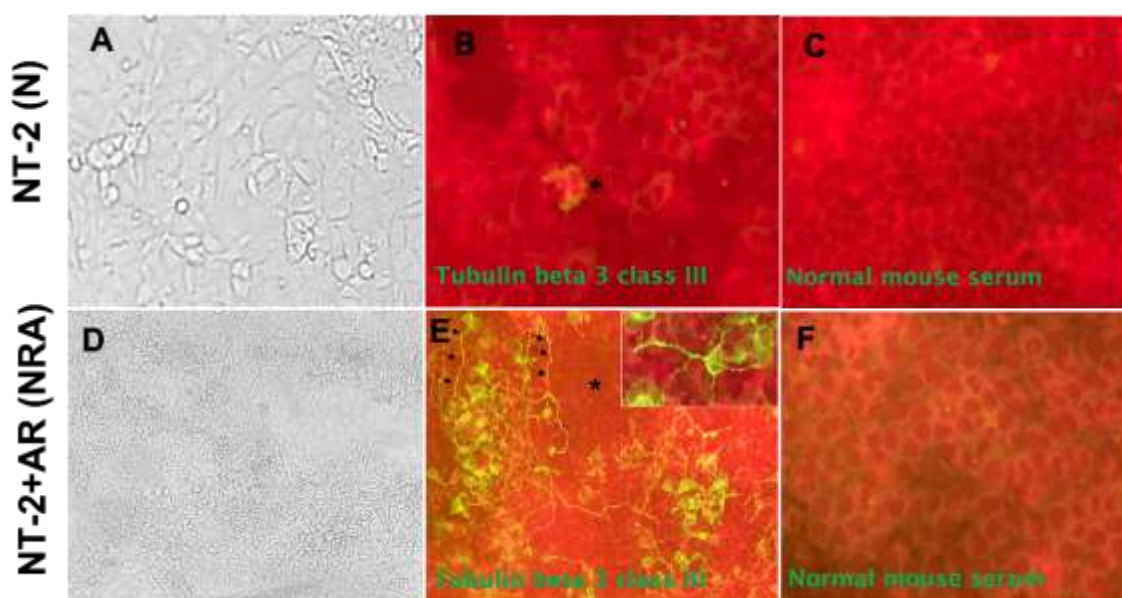


Figura III-4. Caracterización de la población neuronal de NT-2 (NT-2N) diferenciada con AR. Imágenes de los cultivos en microscopio de luz invertida (A y D) o de microscopia de fluorescencia de la tinción de IFA para el marcador neuronal específico Tubulina beta3 clase III en (B y E) o el anticuerpo control del ensayo IFA (C y F). Las flechas indican procesos neuronales largos que parecen axones, el asterisco marca una laguna de células de aspecto epitelial negativas a la tinción. La imagen de las reacciones de inmunofluorescencia se tomaron con magnificación x400 para B, C y F y de X200 para E.

En resumen, los resultados muestran evidencia que se logró establecer un cultivo de células NT2 como fuente de células madre pluripotenciales y precursores neurales y neuronas maduras para estudiar el tropismo (este capítulo) y de manera comprensiva los efectos moleculares (**Capítulo IV**) de la infección por ZIKV en estas poblaciones celulares.

El ZIKV infecta preferencialmente los precursores neuronales y neuronas maduras y en menor magnitud las células pluripotenciales o mesenquimales.

Para determinar la susceptibilidad a la infección con el virus zika de los diferentes fenotipos celulares presentes en el modelo de los cultivos de NT-2 establecidos, se infectaron los cultivos de NT-2 sin diferenciar (**NZ**) o en proceso de diferenciación con AR varios días anticipados a la infección (**NRAZ**) o 72 h posterior a la infección (**NZAR**), con un aislado colombiano bien caracterizado de ZIKV (COL/2016/13785) con potencial neuro patogénico. Los cultivos **N** compuestos casi exclusivo de células madre embrionarias pluripotenciales y los cultivos estimulados con AR (**NRAZ** y **NZRA**) conteniendo precursores de células neurales en diferentes estadios de diferenciación (neuronas y células gliales), neuronas maduras pos-mitóticas y posiblemente abundantes células mesenquimales embrionarias.

Los cultivos de células madre pluripotenciales infectados (**NZ**) y sus controles sin infectar (**N**) se cosecharon y evaluaron previo al deterioro de las monocapas celulares en las células control sin infectar (**N**). Los cultivos infectados y estimulados con AR y sus controles se cosecharon a las 144 h p.i con ZIKV y 21 días bajo el influjo de AR en los experimentos del grupo **NRAZ** y en los cultivos del grupo experimental **NZRA** a los mismos 21 días de estímulo con AR y 25 días p.i con ZIKV. Un análisis preliminar de la infección cuantificada por la carga viral mediante qRT-PCR en los sobrenadantes de los cultivos (**Figura III-5**), indico un menor nivel de infección a las 72 h p.i. en el grupo de los cultivos de células madre pluripotenciales indiferenciadas **NZ** (Ct =23) comparado con una alta carga viral en todos los replicados del grupo pre- expuesto a AR, **NRAZ** (Ct=16.6). Los niveles de virus continuaron en aumento en las células en diferenciación a linajes neurales **NRAZ** hasta el término del experimento a las 144 h p.i (Ct=10.6). Por el contrario, los niveles virales en los cultivos infectados previo al proceso de diferenciación con AR (**NZRA**) fueron igualmente tan bajos como en las células NT-2 sin diferenciar (**NZ**) en las primeras 72 h p.i (Ct= 25.6), pero la infección aumentó exponencialmente a las 72 h de haber iniciado su diferenciación hasta niveles similares, aunque menores (Ct=15.8), de carga viral ZIKV en los cultivos que las otras células previamente inducidas a diferenciarse y luego infectadas, **NRAZ** (Ct=10.6). Estos resultados nos sugieren que las células madre pluripotenciales

NT-2 son menos vulnerables a la infección que los precursores neurales y fenotipos celulares resultantes del proceso de diferenciación con AR.

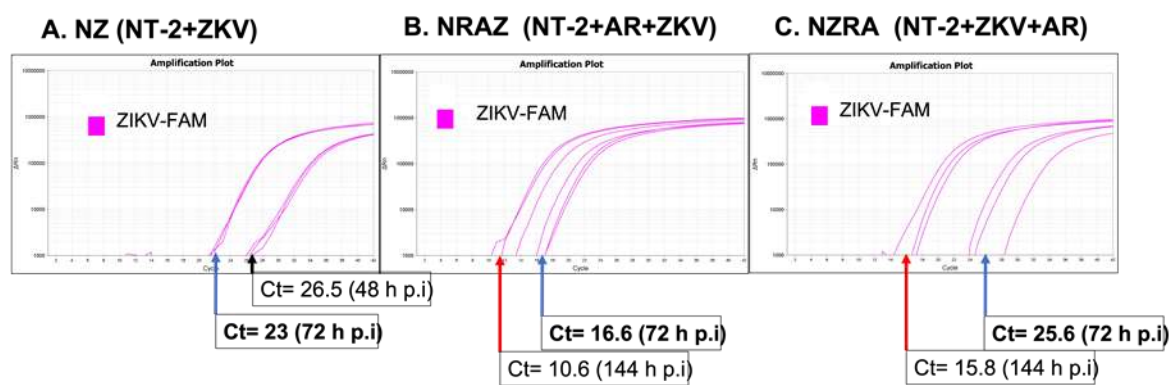


Figura III-5. Carga viral del ZIKV en los tres grupos de cultivos de comparación NZ (A), NRAZ (B) y NZRA(C) determinada por los valores Ct (Cycle threshold). Los gráficos de amplificación se generaron en una mismo ensayo de qRT-PCR, las flechas indican el valor Ct de los tres cultivos replicas en cada tiempo en horas (h) post infección (p.i.).

Consistente con los resultados del qRT-PCR, la evaluación de microscopia de inmunofluorescencia mostró muy pocas células infectadas con ZIKV en las células NT-2 (**NZ**) sin diferenciar (**Figura III-6**, panel A), pero abundantes cúmulos de células positivas a ZIKV en las células diferenciadas con AR (**Figura III-6**, C y E) a las 144 h p.i, independientemente del momento en el cual se inició la diferenciación hacia células neurales (antes o después de la infección). Las células infectadas en los cultivos no diferenciados denominados **NZ** mostraron escasa fluorescencia a nivel citoplasmático y muy ocasionalmente positividad en células con procesos similares a neuronas, tal como se muestra en el inserto aumentado del panel A en la **Figura III-6**. Mientras que el patrón de fluorescencia en las células positivas a ZIKV en los cultivos del linaje neural, ocupa totalmente el citoplasma de los somas celulares pequeños y grandes, algunos de ellas con sus procesos igualmente marcados con la tinción a zika y vacuolización perinuclear, la cual es típica de la infección in vitro con flavivirus (36).

Las células infectadas con ZIKV en los cultivos estimulados con AR (**NRAZ** y **NZRA**) se disponen en acúmulos que corresponden a las mismas zonas enriquecidas con neuronas (**Figura III-6**, paneles C, D, E y F), y al igual que las neuronas se organizan sobre otras células de aspecto epitelial negativas a la infección. Este resultado y el bajo nivel de infección en ausencia de diferenciación hacia neuronas con AR nos permite concluir que la principal población celular blanco de la infección en este modelo de células embrionarias pluripotenciales diferenciadas al linaje neuronal o sus precursores, y posiblemente también otras células neurogliales no identificadas con estos ensayos.

El tropismo neuronal preferencial del ZIKV no sorprende, desde que los efectos mas devastadores de la infección congénita son a nivel del neurodesarrollo y la infección de precursores neuronales y neuronas ha sido reportados anteriormente en múltiples modelos de infección (23,24).

Así mismo, el fenotipo neuronal, sus precursoras y las células gliales expresan los receptores para el virus zika (**Tabla I-1 del Capítulo I**) (60); lo que se traduciría en una mayor probabilidad de infección tras la estimulación de la diferenciación con AR en células NT-2, como se observó en el primer panel C y E de la **Figura III-6**.

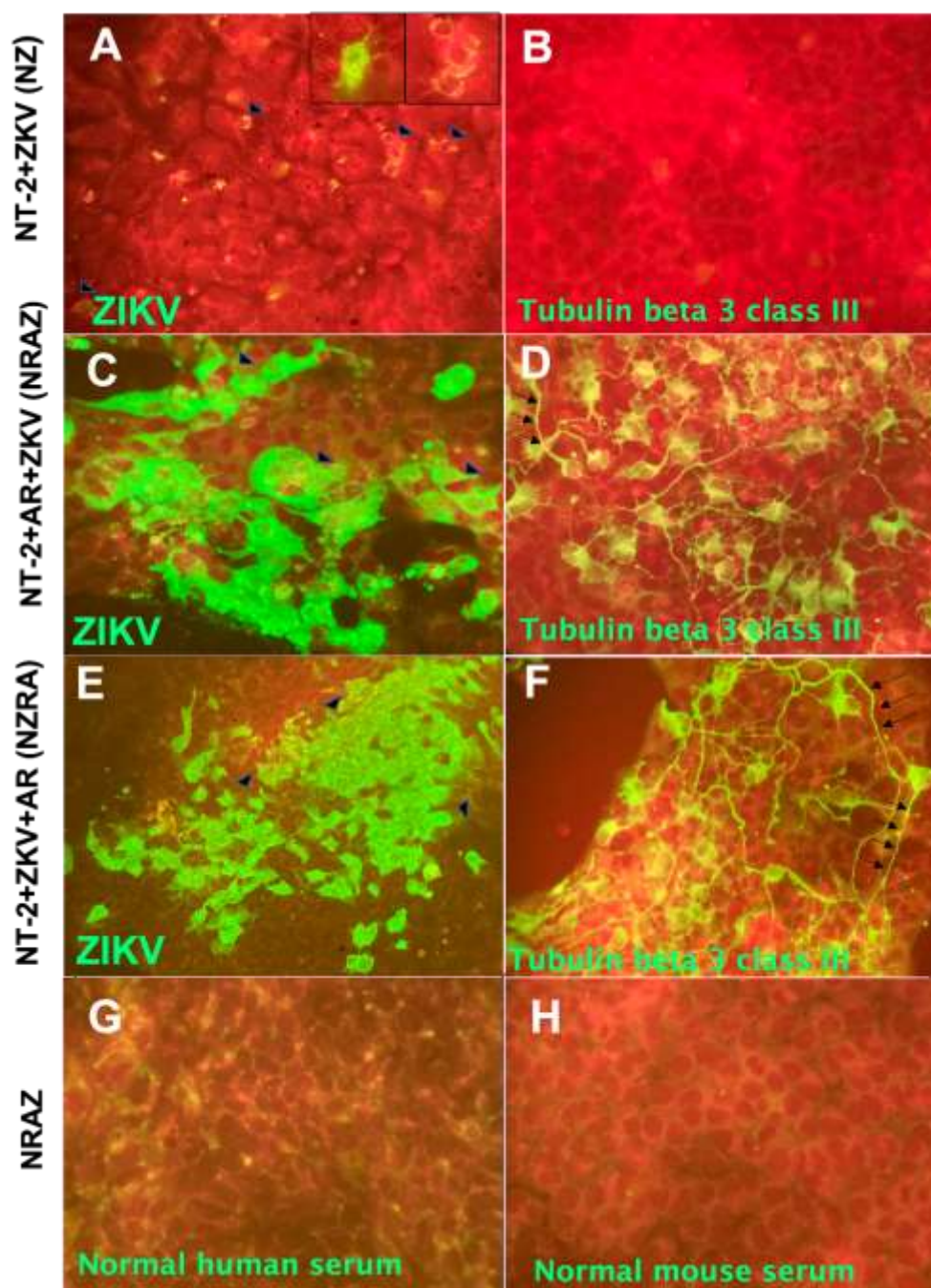


Figura III-6. Caracterización de la infección con ZIKV en células NT-2 pluripotenciales y diferenciadas a linajes neurales y neuronas con AR. Tinción de inmunofluorescencia para ZIKV usando sueros humanos policlonales de alto título específicos a las proteínas NS2B y E del virus zika (A, C y E) o el marcador específico neuronal Tubulin beta3 clase III en los paneles B,D y F. En G y H los sueros control del ensayo de IFA (suero humano normal para la tinción de ZIKV o suero normal de ratón para la tinción con el MAb anti-neuronal). Las puntas de flechas indican células positivas a antígenos de ZIKV, las flechas señalan procesos axonales. El inserto en A muestra una magnificación de las células positivas. Magnificación x400.

Resultados previos en otros modelos concluyeron que el ZIKV interfiere con la neurogenesis (36,61,62), sin embargo nuestros resultados indican que ZIKV no impide la proliferación de los precursores neuronales, estorequiere realizar una cuantificación sistemática del número de neuronas presentes por técnicas de inmunohistoquímica (**Figura III-6, D y F**). Por otra parte si parece afectar la maduración neuronal a su forma pos mitótica, como se confirmó con la observación de doble tinción con microscopía confocal (**Figura III-7**). Este hallazgo ya habían sido sugeridos previamente (63). Estos resultados sugieren que el ZIKV permite la diferenciación neuronal, pero evita que lleguen a su forma madura.

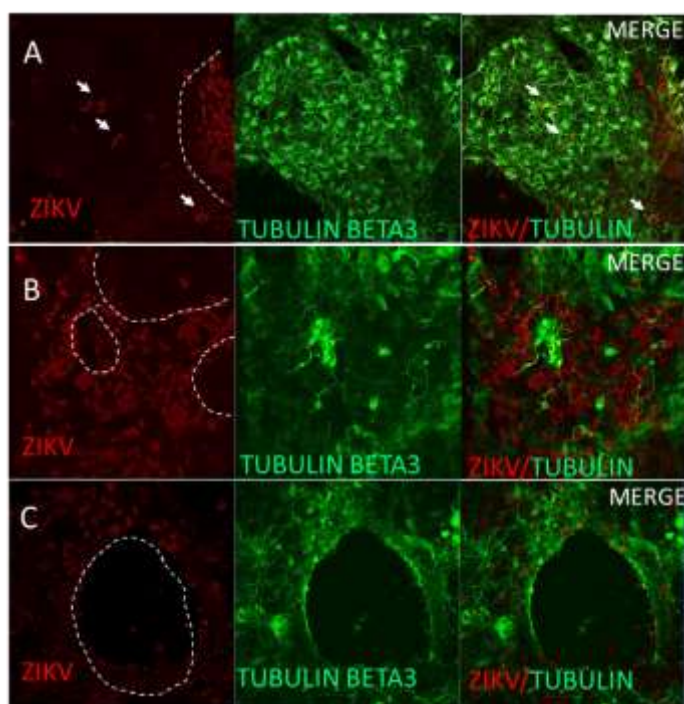


Figura III-7. Caracterización de la infección con ZIKV en células NT-2 diferenciadas a linajes neurales y neuronas con AR. Doble tinción de campo de infección de células NT-2 con AR observada en microscopía confocal: células ZIKV positivas (Rojo), neuronas maduras posmitóticas (verde) y la superposición de los campos de tinción (MERGE).

Realizamos una evaluación exploratoria preliminar de marcadores moleculares que controlan la neurogénesis. A juzgar por una expresión significativamente mas baja

de los genes reguladores negativos de neurogénesis *CYP26B1*, *CYP26A1* y *CYP26C1* o de la sobreexpresión significativa de *mTOR*, un regulador positivo de neurogénesis (**Tabla III-2**; Log2FoldChange **NRAZ-NRA**) en **NRAZ** comparado con su control sin infectar **NRA**, los resultados sugieren que la infección con ZIKV de los precursores neuronales podría estar favoreciendo sobrecrecimiento neuronal, sin tener la certeza de que sean viables a nivel funcional (34). También, se extrajeron algunos datos de los transcritos genéticos obtenidos con el desarrollo de la metodología del **Capítulo IV** con el fin de realizar una evaluación exploratoria de los otros fenotipos celulares no neuronales que pudieran estar afectados tras la infección con ZIKV, mostró una disminución significativa en la expresión génica de *OLIG1* y *OLIG2*, los dos factores de transcripción fundamentales para el desarrollo de los oligodendrocitos (**Tabla III-2**). Este resultado es indicativo de un efecto deletéreo del ZIKV sobre los oligodendrocitos; que los oligodendrocitos son susceptibles a la infección por ZIKV ya era conocido en otros estudios previos en un modelo de microcefalia en ratones (64) o mas recientemente en un modelo murino de exposición perinatal en el que ZIKV redujo ostensiblemente la población de oligodendrocitos en la espina dorsal (65) o en neuroesferas de precursores neurales infectadas con la cepa ZIKV asiática pero no con dengue (25). Aunque no se conoce si ZIKV afecta los procesos de mielinización, dado que este proceso se completa posnatalmente, la afectación de los oligodendrocitos podría explicar los problemas en el neurodesarrollo en niños expuestos tardíamente in útero que nacen aparentemente asintomáticos (66), o los problemas de espasticidad asociados al SCZ (37,66–68). Sin embargo en los estadios fetales tempranos los oligodendrocitos son importantes para el mantenimiento de las neuronas y por lo tanto el efecto deletéreo del Zika sobre ellos podría contribuir también a defectos en el neurodesarrollo y microcefalia (64,69). Los fenómenos clínicos de espasticidad muscular, e hiperreflexia y las alteraciones de los sistemas motor en los brazos y piernas puede ser por falta de conexiones axonales al morir las neuronas en la infección por el virus, pero también puede deberse a problemas en la conexión de las placas motoras y en la generación de la cobertura de la mielina en los axones que hace que las señales nerviosas no lleguen bien a los músculos efectores. Esto mismo se ha propuesto como un posible efecto del síndrome de Guillain Barre inducido por el ZIKV, en donde hay debilidad muscular y se cree atribuible a que se generan reacciones autoinmunes entre ellas, anticuerpos contra la mielina (69).

Tabla III-2. Marcadores genéticos de linajes celulares característicos del neuroectodermo embrionario y de neurogénesis, en las células madre embrionarias pluripotenciales NT-2 (N) o diferenciadas con AR (NRA) e infectadas con ZIKV respectivamente (NZ y NRAZ).

GEN	Linaje celular	CONTEOS (RNAseq)				Log2FCH		Log2FCH	
		NZ	N	NRAZ	NRA	NZ-N	<i>p</i> -valor*	NRAZ-NRA	<i>p</i> -valor*
<i>OLIG1</i> (64)	Oligodendrocito	210	154	0	46	0,16	0,86	-7,33	0,002*
<i>OLIG2</i> (64)	Oligodendrocito	1001	1333	0	42	-0,11	0,9	-7,2	0,01*
<i>CD68</i> (57)	Microglía	32	56	30	0	-0,77	0,5	5,88	0,05*
<i>YAP</i> (3)	Mesenquimal	8139	12268	14881	10760	-0,3	0,01*	-0,01	0,9

TAFAZZIN (3)	Mesenquimal	441	374	542	390	0,25	0,4	0,63	0,1
GFAP (70)	Astrocito	20	28	0	0	-0,2	0,8	0	1
FGF1 (71–73)	Mesenquimal	14	10	46	0	0,89	0,7	6,5	0,05*
FGF2 (71–73)	Mesenquimal	1866	2380	1196	511	-0,02	0,9	0,26	0,3
FGF3 (71–73)	Mesenquimal	38	26	8	0	-0,19	0,9	4,73	0,06
AKT (62)	Neurogénesis	3748	3538	2366	3236	0,079	0,8	-0,54	0,03*
mTOR (62)	Neurogénesis	4472	6416	2339	995	-0,45	0,06	0,9	0,00072*
CYP26A1 (74)	Regulación AR	146	188	953	1558	0,4	0,2	-1,68	0,006*
CYP26B1 (74)	Regulación AR	236	199	380	952	-0,3	0,3	-1,97	0,001*
CYP26C1 (74)	Regulación AR	28	26	56	30	1,5	0,1	-0,2	0,9

*p-valor significativo (ajustado)

FC=Fold-Change

Mientras que la generación de los oligodendrocitos parecen afectarse negativamente por el ZIKV, la infección parece inducir activación de la microglía (determinado por sobreexpresión significativa de *CD68*, **Tabla III-2**) en las células diferenciadas **NRAZ** como un mecanismo inflamatorio o como la incapacidad de aclarar la infección como se ha sugerido con los astrocitos, que se postulan como células que pueden mantener con latencia el virus (24).

Resulta interesante, determinar por otros métodos como luminex o por citometría de flujo cuales son los perfiles inmuno-inflamatorios de los diversos fenotipos de las células infectadas y si se genera la producción de los interferones y otras citoquinas proinflamatorias y si son funcionales. Adicionalmente en las células embrionarias pluripotenciales ZIKV (**NZ-N**) disminuyó significativamente la expresión de *YAP* (**Tabla III-2**), marcador principal de precursores de células mesenquimales (aunque no intentamos comprobar la infección en células positivas a *YAP*); luego cuando las células se indujeron a diferenciación hubo sobreexpresión del gen mesenquimal de maduración y proliferación de osteocondrocitos *FGF1* (**NRAZ-NRA**; **Tabla III-2**), lo cual sugiere que el Zika podría también afectar directa o indirectamente a las células mesenquimales tanto en estadio precursor/temprano como en fase de diferenciación hacia linajes celulares mesenquimatosos (**Tabla III-2**). También hubo una expresión significativa en (**NRAZ-NRA**) de mRNA de los genes *SOX10*, *PAX5* y *MYC* que son marcadores de neuronas, condrocitos y melanocitos respectivamente y que intervienen en el desarrollo neural y craneofacial como se muestra en la **Figura III-1**. Estos resultados interesantes ameritan una mejor caracterización de la infección ZIKV en las células no neuronales del modelo, para así poder acercarnos a entender otras consecuencias en el desarrollo de otras estructuras no neuronales derivadas de la diferenciación del vicerocráneo.

4.4. Conclusiones:

Los experimentos de infección con el ZIKV en NT-2 confirman el tropismo del virus por los precursores neuronales y neuronas inmaduras, un posible efecto deletéreo sobre los oligodendrocitos; una menor tasa de infección de neuronas maduras posmitóticas y precursores mesenquimales que parecen ser las células no neuronales mas abundantes en el cultivo. Mientras que las células madre embrionarias pluripotenciales NT-2 parecen ser mas resistentes a la infección con ZIKV. Basados en los resultados obtenidos con esta aproximación experimental, en la **Figura III-8** proponemos cómo funciona nuestro modelo de la infección ZIKV en células madre embrionarias pluripotenciales (NT-2) y linaje neural y no neural.

Las células NT-2 se diferenciaron en mayor proporción a células neuronales y sus precursoras tras la estimulación *in vitro* con ácido retinoico y son una fuente de neuronas maduras pos-mitóticas, que en otros estudios han demostrado ser funcionales y usadas en ensayos clínicos en humanos con fines terapéuticos.

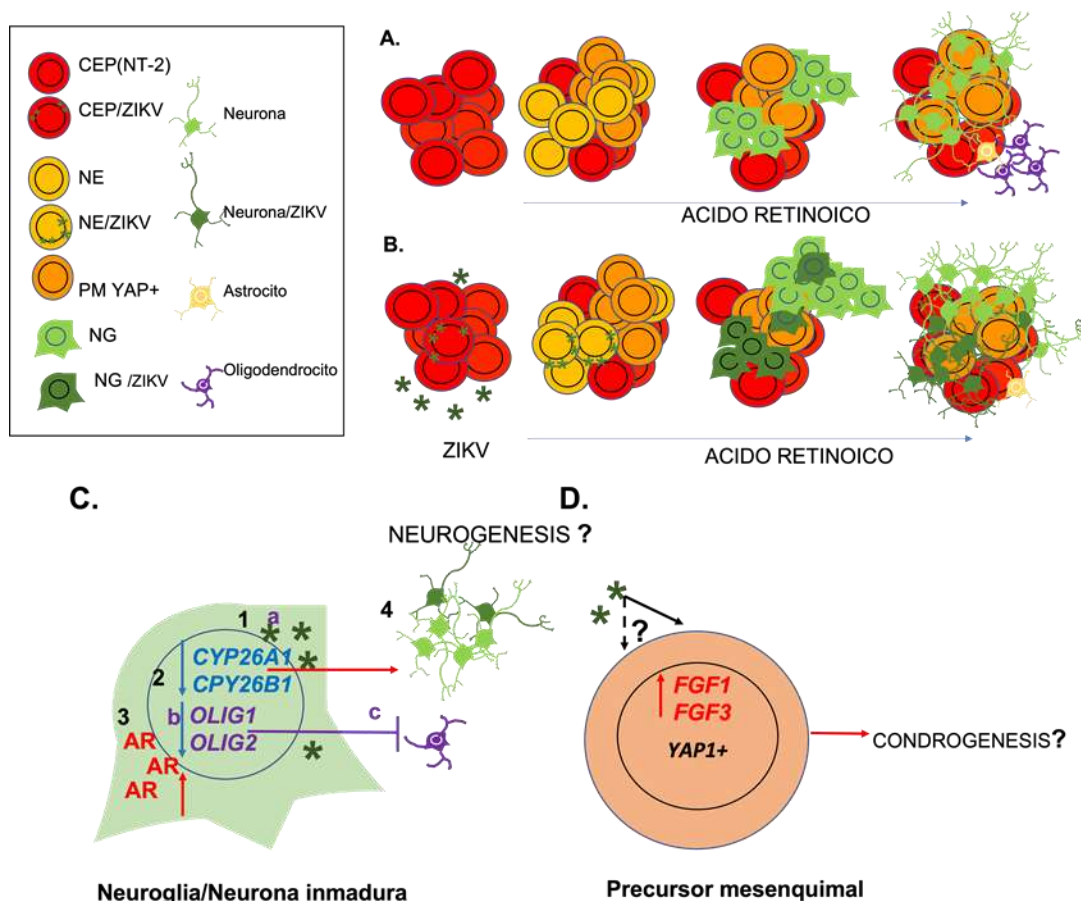


Figura III-8. Modelo de la infección ZIKV en células madre embrionarias pluripotenciales (NT-2) y linaje neural y no neural. Diferenciación de las CEP con AR en ausencia de infección (A) y después de la infección con ZIKV (B). Mecanismo propuesto del efecto de la infección ZIKV en la neuroglia (C) y en los precursores mesenquimales (D). Célula embrionaria pluripotencial (CEP);

Precursor Neuroepitelial (NE); Precursor mesenquimal (PM); Neuroglia/Neurona inmadura (NG); Virus Zika (ZIKV); AR (Acido Retinoico)

4.5. Recomendaciones y Limitaciones

Se espera que este modelo celular de NT-2 establecido sea útil para investigación *in vitro* de otros patógenos neurotrópicos emergentes o para otros investigadores en el área de las neurociencias, y del desarrollo craneofacial en el caso que poder generar organoides en donde interactúen las células derivadas de la cresta neural que migran a los arcos branquiales y forman importantes componentes de la cara, de los dientes y del cráneo.

El desarrollo del modelo de células NT-2, requiere mejor caracterización del conjunto de células adherentes no neuronales, usando anticuerpos específicos de neuronas inmaduras (*NESTIN*), precursores mesenquimales (*YAP/TAZ* fosforilado) (3,18) o para biomarcadores de neuroglia (*GFAP*, *OLIG1,2* y *CD68*) (56,57,65) o células mesenquimales (familia de genes *FGF*) (3,12). Esta detallada caracterización celular permitirá describir y entender mejor el efecto del ZIKV sobre otras precursores no neuronales en ensayos de microscopia confocal con tinciones múltiples.

La investigación con modelos celulares tiene ventajas como son el mayor control de las variables *in vitro*, pero tiene la desventaja que no forman los sistemas o los órganos completos, como aquellos que forman los componentes de la cara y del cráneo que se pueden visualizar con modelos infección viral en animales o en organoides, en donde interactúan múltiples tejidos, hormonas, morfógenos y genes activantes (enhancers), oncogenes, genes represores, microRNA o RNA de interferencia, etc.

4.6 Bibliografía

1. Pleasure SJ, Page C, Lee VM. Pure, postmitotic, polarized human neurons derived from NTera 2 cells provide a system for expressing exogenous proteins in terminally differentiated neurons. *J Neurosci*. 1992;12(5):1802–15.
2. Simões-Costa M, Bronner ME. Establishing neural crest identity: a gene regulatory recipe. *Development*. 2015;142(2):242–57.
3. Hindley CJ, Condurat AL, Menon V, Thomas R, Azmitia LM, Davis JA, et al. The Hippo pathway member YAP enhances human neural crest cell fate and migration. *Sci Rep*. 2016;6(1):1–9.
4. Dupin E, Calloni GW, Coelho-Aguiar JM, Le Douarin NM. The issue of the multipotency of the neural crest cells. *Dev Biol*. 2018;444:S47–59.
5. Graf D, Malik Z, Hayano S, Mishina Y. Common mechanisms in development and disease: BMP signaling in craniofacial development.

- Cytokine Growth Factor Rev. 2016;27:129–39.
6. Yan Y, Zhang X, Wang G, Cheng X, Yan Y, Fu Y, et al. Zika virus induces abnormal cranial osteogenesis by negatively affecting cranial neural crest development. *Infect Genet Evol.* 2019;69:176–89.
7. Weston JA, Thiery JP. Pentimento: neural crest and the origin of mesectoderm. *Dev Biol.* 2015;401(1):37–61.
8. Romero DM, Bahi-Buisson N, Francis F. Genetics and mechanisms leading to human cortical malformations. In: *Seminars in cell & developmental biology.* Elsevier; 2018. p. 33–75.
9. Shellard A, Mayor R. Chemotaxis during neural crest migration. In: *Seminars in cell & developmental biology.* Elsevier; 2016. p. 111–8.
10. Lord J, McMullan DJ, Eberhardt RY, Rinck G, Hamilton SJ, Quinlan-Jones E, et al. Prenatal exome sequencing analysis in fetal structural anomalies detected by ultrasonography (PAGE): a cohort study. *Lancet.* 2019;393(10173):747–57.
11. Carss KJ, Hillman SC, Parthiban V, McMullan DJ, Maher ER, Kilby MD, et al. Exome sequencing improves genetic diagnosis of structural fetal abnormalities revealed by ultrasound. *Hum Mol Genet.* 2014;23(12):3269–77.
12. Martínez-Morales PL, Díez del Corral R, Olivera-Martínez I, Quiroga AC, Das RM, Barbas JA, et al. FGF and retinoic acid activity gradients control the timing of neural crest cell emigration in the trunk. *J Cell Biol.* 2011;194(3):489–503.
13. Bérubé-Simard F-A, Pilon N. Molecular dissection of CHARGE syndrome highlights the vulnerability of neural crest cells to problems with alternative splicing and other transcription-related processes. *Transcription.* 2019;10(1):21–8.
14. Tonge PD, Andrews PW. Retinoic acid directs neuronal differentiation of human pluripotent stem cell lines in a non-cell-autonomous manner. *Differentiation.* 2010;80(1):20–30.
15. Baggiani M, Dell'anno MT, Pistello M, Conti L, Onorati M. Human neural stem cell systems to explore pathogen-related neurodevelopmental and neurodegenerative disorders. *Cells.* 2020;9(8):1–31.
16. González-Burguera I, Ricobaraza A, Aretxabala X, Barrondo S, del Caño GG, de Jesús ML, et al. Highly efficient generation of glutamatergic/cholinergic NT2-derived postmitotic human neurons by short-term treatment with the nucleoside analogue cytosine β -d-arabinofuranoside. *Stem Cell Res.* 2016;16(2):541–51.
17. Lang E, Mazauric-Stüker M-L, Maelicke A. States of developmental commitment of a mouse embryonal carcinoma cell line differentiating along a neural pathway. *J Cell Biol.* 1989;109(5):2481–93.
18. Ackerman SL, Knowles BB, Andrews PW. Gene regulation during neuronal and non-neuronal differentiation of NTERA2 human teratocarcinoma-derived stem cells. *Mol brain Res.* 1994;25(1–2):157–62.
19. Andrews PW. Retinoic acid induces neuronal differentiation of a cloned human embryonal carcinoma cell line in vitro. *Dev Biol.* 1984;103(2):285–93.
20. Lee VM, Andrews PW. Differentiation of NTERA-2 clonal human embryonal

- carcinoma cells into neurons involves the induction of all three neurofilament proteins. *J Neurosci.* 1986;6(2):514–21.
21. Paquet-Durand F, Bicker G. Human model neurons in studies of brain cell damage and neural repair. *Curr Mol Med.* 2007;7(6):541–54.
 22. Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, Bell GW, Regev A, et al. An embryonic stem cell–like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet.* 2008;40(5):499–507.
 23. Gratton R, Tricarico PM, Agrelli A, Colaço da Silva HV, Coêlho Bernardo L, Crovella S, et al. In Vitro Zika Virus Infection of Human Neural Progenitor Cells: Meta-Analysis of RNA-Seq Assays. *Microorganisms.* 2020;8(2):270.
 24. Shaily S, Upadhyaya A. Zika virus: Molecular responses and tissue tropism in the mammalian host. *Rev Med Virol.* 2019;29(4):e2050.
 25. Nascimento JM, Gouvêa-Junqueira D, Zuccoli GS, Pedrosa C da SG, Brandão-Teles C, Crunfli F, et al. Zika Virus Strains and Dengue Virus Induce Distinct Proteomic Changes in Neural Stem Cells and Neurospheres. *Mol Neurobiol.* 2022;59(9):5549–63.
 26. Garcez PP, Loiola EC, da Costa RM, Higa LM, Trindade P, Delvecchio R, et al. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science (80-).* 2016;352(6287):816–8.
 27. Kaid C, Goulart E, Caires-Júnior LC, Araujo BHS, Soares-Schanoski A, Bueno HMS, et al. Zika virus selectively kills aggressive human embryonal CNS tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 2018;78(12):3363–74.
 28. Huang W-C, Abraham R, Shim B-S, Choe H, Page DT. Zika virus infection during the period of maximal brain growth causes microcephaly and corticospinal neuron apoptosis in wild type mice. *Sci Rep.* 2016;6:34793.
 29. Tang H, Hammack C, Ogden SC, Wen Z, Qian X, Li Y, et al. Zika virus infects human cortical neural progenitors and attenuates their growth. *Cell Stem Cell.* 2016;18(5):587–90.
 30. Pinheiro TJ, Guimarães LF, Silva MTT, Soares CN. Neurological manifestations of Chikungunya and Zika infections. *Arq Neuropsiquiatr.* 2016;74(11):937–43.
 31. Kozak RA, Majer A, Biondi MJ, Medina SJ, Goneau LW, Sajesh B V, et al. MicroRNA and mRNA dysregulation in astrocytes infected with Zika virus. *Viruses.* 2017;9(10):297.
 32. Siqueira RMP, Santos MTBR, Cabral GMP. Alterations in the primary teeth of children with microcephaly in Northeast Brazil: a comparative study. *Int J Paediatr Dent.* 2018;28(5):523–32.
 33. Hickman HD, Pierson TC. Zika in the brain: new models shed light on viral infection. *Trends Mol Med.* 2016;22(8):639–41.
 34. Naqvi S, Hoskens H, Wilke F, Weinberg SM, Shaffer JR, Walsh S, et al. Decoding the Human Face: Challenges and Progress in Understanding the Genetics of Craniofacial Morphology. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2022;
 35. Yi L, Pimentel H, Pachter L. Zika infection of neural progenitor cells perturbs transcription in neurodevelopmental pathways. *PLoS One.* 2017;12(4).
 36. Souza BSF, Sampaio GLA, Pereira CS, Campos GS, Sardi SI, Freitas LAR, et al. Zika virus infection induces mitosis abnormalities and apoptotic cell

- death of human neural progenitor cells. *Sci Rep*. 2016;6(1):1–13.
37. Reynolds MR, Jones AM, Petersen EE, Lee EH, Rice ME, Bingham A, et al. Vital Signs: Update on Zika Virus-Associated Birth Defects and Evaluation of All U.S. Infants with Congenital Zika Virus Exposure - U.S. Zika Pregnancy Registry, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* [Internet]. 2017 Apr 7;66(13):366–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28384133>
 38. Ospina ML, Tong VT, Gonzalez M, Valencia D, Mercado M, Gilboa SM, et al. Zika Virus Disease and Pregnancy Outcomes in Colombia. *N Engl J Med*. 2020;383(6):537–45.
 39. Calle-Giraldo JP, Rojas CA, Hurtado IC, Barco C, Libreros D, Sánchez PJ, et al. Outcomes of congenital Zika virus infection during an outbreak in Valle del Cauca, Colombia. *Pediatr Infect Dis J*. 2019;38(7):735–40.
 40. del Campo M, Feitosa IML, Ribeiro EM, Horovitz DDG, Pessoa ALS, França GVA, et al. The phenotypic spectrum of congenital Zika syndrome. *Am J Med Genet Part A*. 2017;173(4):841–57.
 41. Abolpour Mofrad S, Kuenzel K, Friedrich O, Gilbert DF. Optimizing neuronal differentiation of human pluripotent NT 2 stem cells in monolayer cultures. *Dev Growth Differ*. 2016;58(8):664–76.
 42. Chen W, Tang Z, Fortina P, Patel P, Addya S, Surrey S, et al. Ethanol potentiates HIV-1 gp120-induced apoptosis in human neurons via both the death receptor and NMDA receptor pathways. *Virology*. 2005;334(1):59–73.
 43. Yang L-B, Li R, Meri S, Rogers J, Shen Y. Deficiency of complement defense protein CD59 may contribute to neurodegeneration in Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2000;20(20):7505–9.
 44. Darbinian N. Cultured Cell Line Models of Neuronal Differentiation: NT2, PC12, and SK-N-MC. In: *Neuronal Cell Culture*. Springer; 2021. p. 25–38.
 45. Hara K, Yasuhara T, Maki M, Matsukawa N, Masuda T, Yu SJ, et al. Neural progenitor NT2N cell lines from teratocarcinoma for transplantation therapy in stroke. *Prog Neurobiol*. 2008;85(3):318–34.
 46. Gönczöl E, Andrews PW, Plotkin SA. Cytomegalovirus infection of human teratocarcinoma cells in culture. *J Gen Virol*. 1985;66(3):509–15.
 47. Hirka G, Prakash K, Kawashima H, Plotkin SA, Andrews PW, Gönczöl E. Differentiation of human embryonal carcinoma cells induces human immunodeficiency virus permissiveness which is stimulated by human cytomegalovirus coinfection. *J Virol*. 1991;65(5):2732–5.
 48. Simões PD, Ramos T. Human pluripotent embryonal carcinoma NTERA2 cl. D1 cells maintain their typical morphology in an angiomyogenic medium. *J Negat Results Biomed*. 2007;6(1):1–9.
 49. Abdullah LN. Neuroprotective Role of SRT1720 against Hydrogen Peroxide Induced Oxidative Stress in NT2 Cells. University of the Sciences in Philadelphia; 2020.
 50. MacDonald C, Unsworth CP, Graham ES. Enrichment of differentiated hNT neurons and subsequent analysis using flow-cytometry and xCELLigence sensing. *J Neurosci Methods*. 2014;227:47–56.
 51. Chambers SM, Fasano CA, Papapetrou EP, Tomishima M, Sadelain M, Studer L. Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat Biotechnol*. 2009;27(3):275.

52. Satoh J, Yukitake M, Kurohara K, Kuroda Y. Retinoic acid-induced neuronal differentiation regulates expression of mRNAs for neurotrophins and neurotrophin receptors in a human embryonal carcinoma cell line NTera2. *Neuropathology*. 1997;17(2):80–8.
53. Padilla JC, Lizarazo FE, Murillo OL, Mendigaña FA, Pachón E, Vera MJ. Epidemiología de las principales enfermedades transmitidas por vectores en Colombia, 1990-2016. *Biomédica*. 2017;37(2):27–40.
54. Parra B, Lizarazo J, Jiménez-Arango JA, Zea-Vera AF, González-Manrique G, Vargas J, et al. Guillain–Barré syndrome associated with Zika virus infection in Colombia. *N Engl J Med*. 2016;375(16):1513–23.
55. Cordeiro MT, Brito CAA, Pena LJ, Castanha PMS, Gil LHV, Lopes KGS, et al. Results of a Zika Virus (ZIKV) Immunoglobulin M–specific diagnostic assay are highly correlated with detection of neutralizing anti-ZIKV antibodies in neonates with congenital disease. *J Infect Dis*. 2016;214(12):1897–904.
56. Stefanik M, Formanova P, Bily T, Vancova M, Eyer L, Palus M, et al. Characterisation of Zika virus infection in primary human astrocytes. *BMC Neurosci*. 2018;19(1):5.
57. Jurga AM, Paleczna M, Kuter KZ. Overview of general and discriminating markers of differential microglia phenotypes. *Front Cell Neurosci*. 2020;14:198.
58. McKeown SJ, Wallace AS, Anderson RB. Expression and function of cell adhesion molecules during neural crest migration. *Dev Biol*. 2013;373(2):244–57.
59. McKeown SJ. The genetic control of neural crest development in early craniofacial morphogenesis. 2004.
60. Komarasamy TV, Adnan NAA, James W, Balasubramaniam VRMT. Zika Virus Neuropathogenesis: The Different Brain Cells, Host Factors and Mechanisms Involved. *Front Immunol*. 2022;13:773191.
61. Bayless NL, Greenberg RS, Swigut T, Wysocka J, Blish CA. Zika virus infection induces cranial neural crest cells to produce cytokines at levels detrimental for neurogenesis. *Cell Host Microbe*. 2016;20(4):423–8.
62. Liang Q, Luo Z, Zeng J, Chen W, Foo S-S, Lee S-A, et al. Zika virus NS4A and NS4B proteins deregulate Akt-mTOR signaling in human fetal neural stem cells to inhibit neurogenesis and induce autophagy. *Cell Stem Cell*. 2016;19(5):663–71.
63. Hughes BW, Addanki KC, Sriskanda AN, McLean E, Bagasra O. Infectivity of immature neurons to Zika virus: a link to congenital Zika syndrome. *EBioMedicine*. 2016;10:65–70.
64. Li C, Wang Q, Jiang Y, Ye Q, Xu D, Gao F, et al. Disruption of glial cell development by Zika virus contributes to severe microcephalic newborn mice. *Cell Discov*. 2018;4(1):1–12.
65. Schultz V, Barrie JA, Donald CL, Crawford CL, Mullin M, Anderson TJ, et al. Oligodendrocytes are susceptible to Zika virus infection in a mouse model of perinatal exposure: Implications for CNS complications. *Glia*. 2021;69(8):2023–36.
66. Carvalho A, Brites C, Mochida G, Ventura P, Fernandes A, Lage ML, et al. Clinical and neurodevelopmental features in children with cerebral palsy and

- probable congenital Zika. *Brain Dev.* 2019;41(7):587–94.
67. Moore CA, Staples JE, Dobyns WB, Pessoa A, Ventura C V, da Fonseca EB, et al. Congenital Zika syndrome: characterizing the pattern of anomalies for pediatric healthcare providers. *JAMA Pediatr.* 2017;171(3):288.
 68. Besnard M, Eyrolle-Guignot D, Guillemette-Artur P, Lastère S, Bost-Bezeaud F, Marcelis L, et al. Congenital cerebral malformations and dysfunction in fetuses and newborns following the 2013 to 2014 Zika virus epidemic in French Polynesia. *Eurosurveillance.* 2016;21(13):30181.
 69. Bhagat R, Kaur G, Seth P. Molecular mechanisms of zika virus pathogenesis: An update. *Indian J Med Res.* 2021;154(3):433–45.
 70. Heaven MR, Wilson L, Barnes S, Brenner M. Relative stabilities of wild-type and mutant glial fibrillary acidic protein in patients with Alexander disease. *J Biol Chem.* 2019;294(43):15604–12.
 71. Coutu DL, Galipeau J. Roles of FGF signaling in stem cell self-renewal, senescence and aging. *Aging (Albany NY).* 2011;3(10):920.
 72. Hu D, Marcucio RS. Neural crest cells pattern the surface cephalic ectoderm during FEZ formation. *Dev Dyn.* 2012;241(4):732–40.
 73. Brinkley JF, Fisher S, Harris MP, Holmes G, Hooper JE, Wang Jabs E, et al. The FaceBase Consortium: a comprehensive resource for craniofacial researchers. *Development.* 2016;143(14):2677–88.
 74. Dubey A, Rose RE, Jones DR, Saint-Jeannet J. Generating retinoic acid gradients by local degradation during craniofacial development: One cell's cue is another cell's poison. *genesis.* 2018;56(2):e23091.

5 CAPÍTULO IV: Perfil transcripcional inducido por la infección del Virus Zika en células embrionarias NT-2: hacia una integración básico-clínica de la infección congénita del Virus Zika con las ciencias básicas.

5.1. Introducción

Las ciencias ómicas utilizan estrategias de secuenciación masiva y de análisis bioinformático para la investigación traslacional del conocimiento biológico, y en este caso los modelos con el virus del Zika no son la excepción. Las múltiples secuenciaciones desarrolladas desde la investigación básica respecto al virus y su patogénesis han servido para tener avances tanto en el entendimiento de la enfermedad y sus consecuencias, como en el desarrollo molecular de antagonistas y de proponer algunas estrategias terapéuticas contra la infección (57).

La transcriptómica es una ciencia ómica que permite detectar la expresión diferencial de genes (DEGs) a partir de la secuenciación masiva de mRNA, en condiciones distintas de los experimentos; ya sea un patógeno, una sustancia toxica u otra exposición (124). Ofrece oportunidades para comprender relaciones de función celular, metabólica o patológicas desencadenadas por cambios de expresión génica inducidos por alguna exposición particular, en tejidos u órganos. En la última década, los ensayos de transcriptómica (RNA-seq) son una alternativa común para construir el perfil transcripcional, según el objetivo de estudio (1).

En relación con lo que se ha estudiado del transcriptoma en la infección hay disponibles algunos estudios transcriptómicos del ZIKV en la base de datos de GEO data sets, donde se encuentran secuencias curadas que pueden ser usadas para el análisis de STRING o DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery), sin embargo siguen siendo muy pocas hasta el momento (124-126). Cada vez está más claro que la infección por el ZIKV tiene amplias implicaciones, más allá de la microcefalia; ya que los bebés nacidos con infección congénita por ZIKV han presentado patología en sus ojos, oídos, dimorfismo facial, alteraciones en el desarrollo de las extremidades y otros sistemas; lo que lleva a preguntar si, el ZIKV podría tener una firma de patogénesis específica que lo distingue de los otros flavivirus. Para lo cual el estudio del transcriptoma de células infectadas con ZIKV podrían conducir a la identificación de nuevas vías y / o objetivos farmacológicos para prevenir la infección por ZIKV y sus complicaciones asociadas (2).

Adicionalmente hay secuenciaciones de transcriptoma de ZIKV que aún no están curadas y evalúan la alteración de la expresión génica en células precursoras del SNC (principalmente en hNPCs e iNPCs) y tiene como hallazgo principal, confirmar la alteración de las vías relacionadas con microcefalia, desordenes congénitos y epilepsia: comparando las células infectadas con ZIKV y las mismas infectadas con citomegalovirus (CMV) y/o Dengue (DENV) entre otras (124).

Bibliométricamente, **Figura IV-1** se evidencia pocas publicaciones desde la perspectiva de las vías de expresión génica apoyado en el uso de ciencias ómicas

en distintos modelos de infección, principalmente células inducidas a neuroprogenitoras (NPC) a partir de otros linajes jóvenes de otros tejidos reprogramados a estadios pluripotenciales (3). Los objetivos de estos estudios son principalmente entender las alteraciones del neurodesarrollo y la microcefalia tras la infección con ZIKV (2).

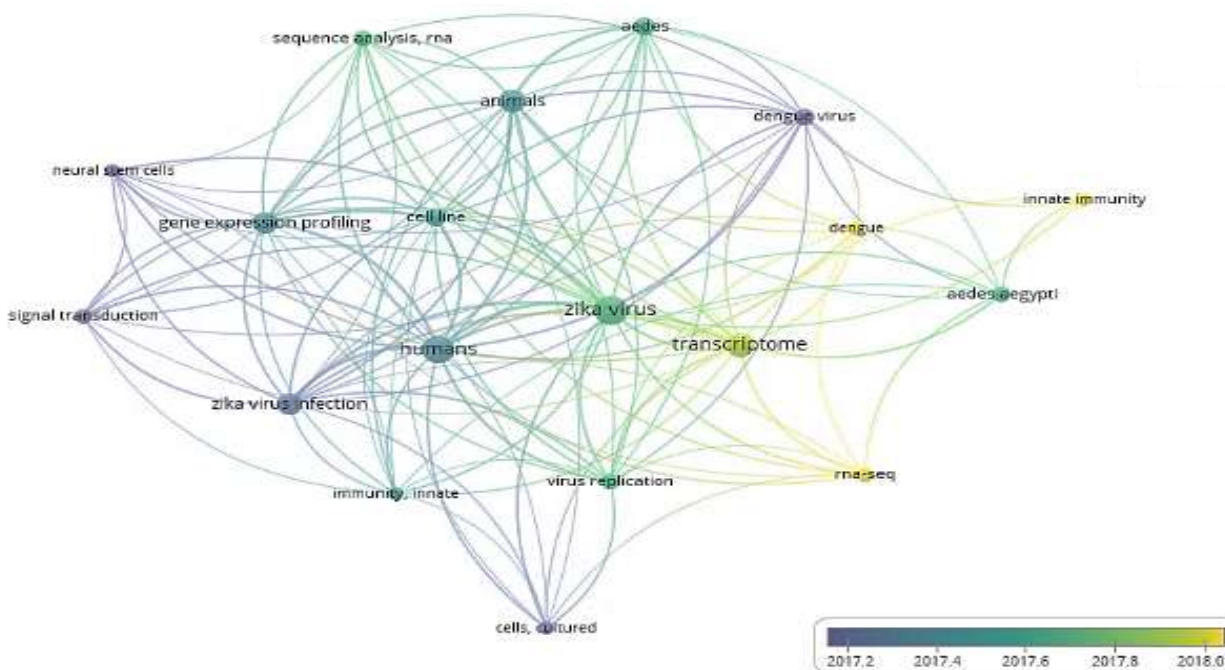


Figura IV-1. Análisis bibliométrico de publicaciones en línea de tiempo con búsquedas “Zika AND transcriptome OR transcriptomics”; en bases de datos Web of Science, Pubmed y Scopus (Gráfica obtenida en el software VOSviewer 1.6.14®. Fuente: Propia).

Las publicaciones científicas con este algoritmo de búsqueda reflejan que hay publicaciones desde el 2016, por lo que se presume que es un tema relativamente nuevo y en ascenso como tópico de investigación para enriquecer el conocimiento científico sobre la infección por ZIKV, su patogénesis y consecuencias. En el estudio de la transcriptómica relacionada con el ZIKV como trabajos producto del empleo de las bases de datos bioinformáticos, hay disponibles 216 estudios con transcriptoma del ZIKV en la base de datos de GEO data sets (NIH), con secuencias curadas (disponibles para ser evaluadas en GEO2R) que están disponibles para el análisis (4–6). La mayoría de estudios, en orden cronológico (**Figura IV-1**); se han enfocado en entender la naturaleza del virus, el proceso de infección, el tropismo, los biomodelos de infección y avances en al entendimiento de la inmunopatogénesis a partir de ensayos de RNA-seq de secuenciación masiva y análisis de transcriptomas.

Siendo consecuente con lo reportado en estudios clínicos, principalmente se ha documentado hallazgos acerca de la transcriptómica del ZIKV en células progenitoras infectadas, una afección significativa de la transcripción de genes

relacionados principalmente con enfermedades como Guillain Barré y patologías relacionadas con la conducción nerviosa de sistema nervioso central y periférico (5).

Tabla IV-1. Principales genes afectados y su relación clínica con el SCZ, según el transcriptoma de células hNPCs infectadas con ZIKV. Adaptada de Kozak, 2018

Disease	Gene symbol	Gene name	Disease	Gene symbol	Gene name
Microcephaly	DYRK1A	Dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A	Epilepsy syndrome	CDKL5	Cyclin-dependent kinase-like 5
	MCPH1	Microcephalin 1		CSTB	Cystatin B (stefin B)
	CASK	Calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase (MAGUK family)		TSC1	Tuberous sclerosis 1
	PHGDH	Phosphoglycerate dehydrogenase		CACNB4	Calcium channel, voltage-dependent, beta 4 subunit
	ARFGEF2	ADP-ribosylation factor guanine nucleotide-exchange factor 2		CLCN2	Chloride channel, voltage-sensitive 2
	ASPM	Asp (abnormal spindle) homolog, microcephaly associated		PCDH19	Protocadherin 19
	CENPJ	Centromere protein J		KCNQ2	Potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 2
	CEP152	Centrosomal protein 152 kDa		CLN5	Ceroid-lipofuscinosis, neuronal 5
	SLC25A19	Solute carrier family 25 (mitochondrial thiamine pyrophosphate carrier), member 19		ATP1A2	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 2 polypeptide
	WDR62	WD repeat domain 62		LGI1	Leucine-rich, glioma inactivated 1
Congenital nervous system disorders	MCPH1	Microcephalin 1	Encephalitis	SCN1B	Sodium channel, voltage-gated, type I, beta subunit
	ARFGEF2	ADP-ribosylation factor guanine nucleotide-exchange factor 2 (brefeldin A-inhibited)		ALDH5A1	Aldehyde dehydrogenase 5 family, member A1
	TGIF1	TGFB-induced factor homeobox 1		EFHC1	EF-hand domain (C-terminal) containing 1
	GRIN2B	Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2B		DDX58	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58
	SLC12A5	Solute carrier family 12 (potassium/chloride transporter), member 5		RPSA	Ribosomal protein SA
	FLNA	Filamin A, alpha		TREX1	Three prime repair exonuclease 1
	SIX3	SIX homeobox 3	Demyelinating disease	PLP1	Proteolipid protein 1
	SHH	Sonic hedgehog		RTN4	Reticulon 4
	CDK5RAP2	CDK5 regulatory subunit associated protein 2		GALC	Galactosylceramidase
	NDE1	nudE nuclear distribution E homolog 1	GBS	FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)
	WDR62	WD repeat domain 62			

Otros estudios que han reportado hallazgos importantes de la infección por VZIK en diferentes líneas celulares en su mayoría en sus formas pluri o multipotenciales, con el fin de entender mejor los mecanismos de patogénesis e incluso algunos llegan a comparar los perfiles de transcriptomas en células infectadas con otros flavivirus versus ZIKV. Los hallazgos principales han revelado: una activación significativa de las vías de respuesta antiviral incluidas (**Figura IV-2**): la activación de la "señalización de interferón", "el papel de los receptores de tipo RIGI en la inmunidad innata antiviral", "reconocimiento de bacterias y virus", "señalización TREM1" y "señalización de CD40" (2).

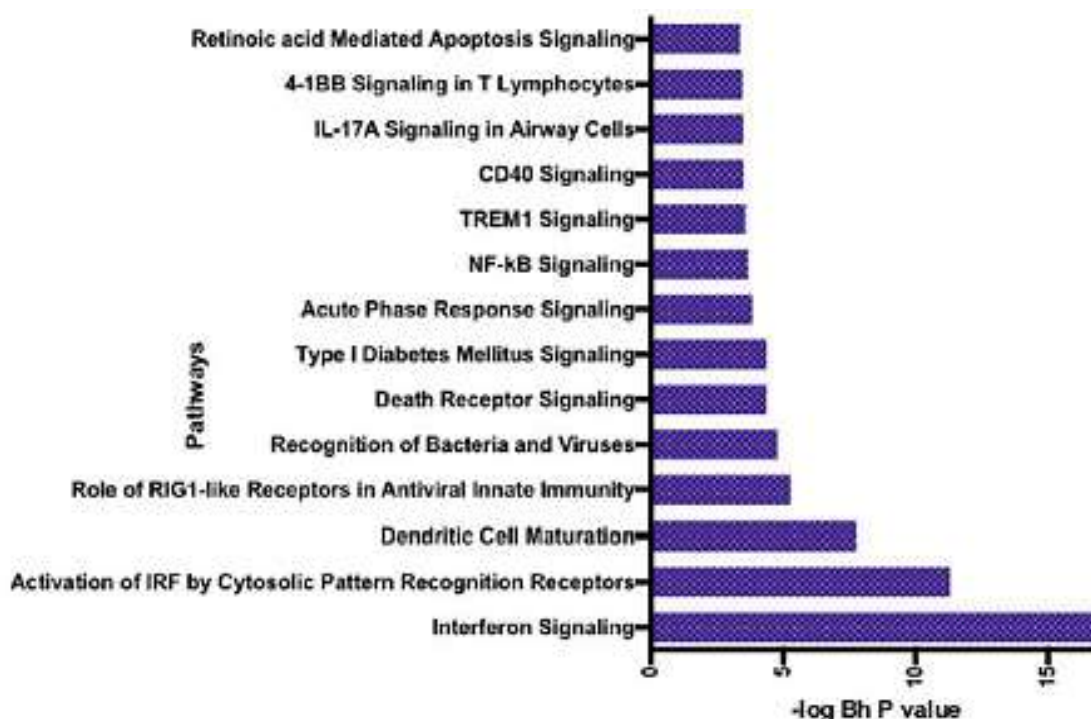


Figura IV-2. Principales vías afectadas según el transcriptoma de células primarias de retina infectadas con ZIKV (2). *Sight, et al. 2018.*

En resumen, los hallazgos de los ensayos RNA-seq de células embrionarias progenitoras neuronales encuentran que las vías antivirales activadas tras la infección ZIKV, podrían ser las desencadenantes de una neurogénesis alterada; y que la vía del IFN tipo 1 domina la respuesta inmune mediada por la infección con ZIKV. Hasta donde nuestro conocimiento alcanza, desconocemos que existan estudios que utilicen células embrionarias precursoras de tejido neuronal NTERA2 (NT-2) como modelo de estudio para la infección con ZIKV (1). Por esto, el objetivo de este capítulo fue analizar el transcriptoma y la expresión de genes relacionados con el desarrollo neural y craneofacial en las células NT-2 infectadas con el ZIKV en dos estadios de diferenciación: embrionológicas pluripotenciales y del linaje neural; esto con el fin de acercar los hallazgos clínicos médicos y odontológicos de la infección congénita con alteraciones identificadas en los transcritos génicos del modelo de infección de células madre embrionarias NT-2.

5.2. Metodología

Tipo de estudio:

Es un estudio de *secuenciación masiva tipo RNAseq* para evaluar la expresión diferencial de genes ($\text{Log}_2\text{FoldChange}-\text{Log}_2\text{FC}$), relacionados con vías de diferenciación y desarrollo neurológico y craneofacial en células carcinoembrionarias pluripotenciales (NT-2) infectadas y no infectadas con el ZIKV; en dos diferentes estadios de diferenciación: indiferenciadas (embrionarias pluripotenciales) y diferenciadas con Ácido Retinoico-AR (linaje neural).

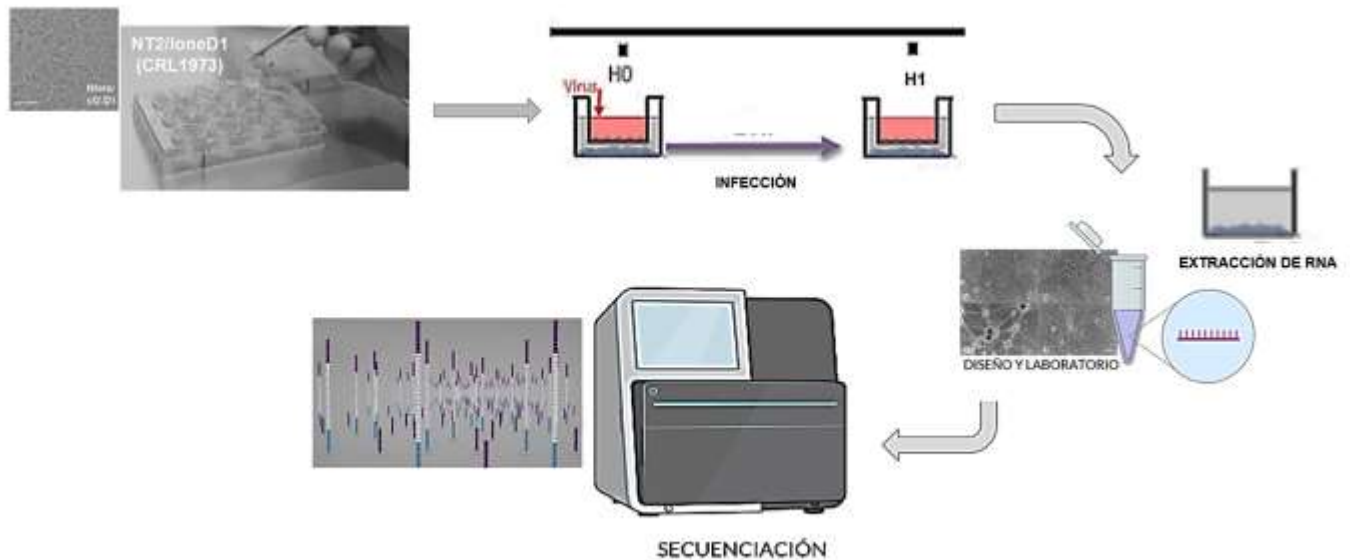


Figura IV-3. Flujograma de trabajo para cultivo, diferenciación, infección y extracción de RNA para ensayo de RNA-seq.

Transcriptoma:

El flujograma de trabajo del estudio del transcriptoma de las células ya caracterizadas y diferenciadas se realizó a través de la técnica RNA-seq, y tuvo tres fases descritas en la **Figura IV-4**:

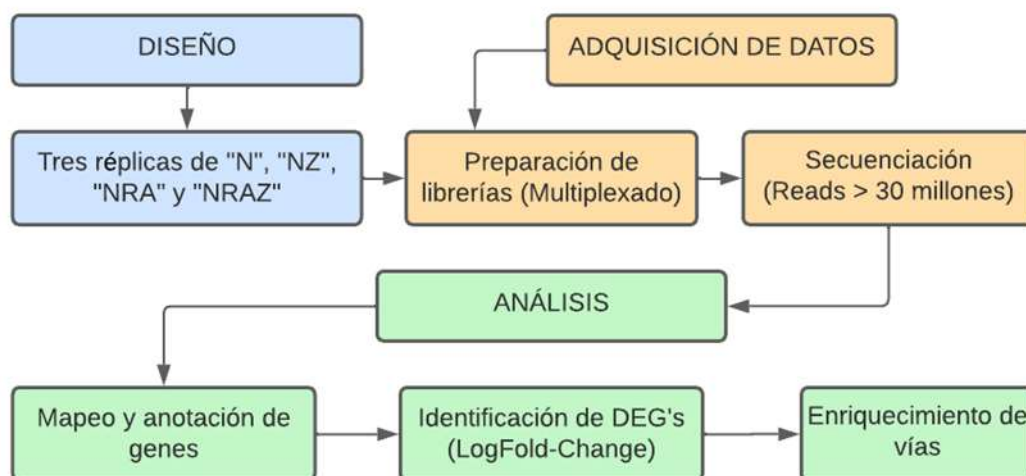


Figura IV-4. Fases del ensayo RNA-seq en el modelo de infección con ZIKV de células NT-2 embrionarias pluripotenciales y de linaje neural.

Las fases del experimento de secuenciación masiva RNA-seq, del modelo de infección con ZIKV de embrionarias pluripotenciales y de linaje neural.

Diseño: Esta es un estudio del ARN total de los 4 grupos diferentes con el fin de identificar cambios en los patrones de transcripción en cada condición. Se analizó el transcriptoma (mRNA) de un total de 12 muestras: 2 grupos de NT-2 embrionarias pluripotenciales (infectadas con ZIKV “NZ” y no infectadas “N”) y 2 grupos de NT-2 de linaje neural (infectadas con ZIKV “NRAZ” y no infectadas “NRA”); cada uno de los grupos tuvo tres réplicas biológicas para disminuir las fuentes de varianza y aumentar la precisión de los datos.

Extracción de RNA: Se optimizó la extracción del RNA (para el cumplimiento de los estándares de calidad de NOVOGENE®), extraído con el kit *RNA viral extraction Accuprep*®, con una segunda columna de purificación del kit RNeasy PowerSoil Total RNA de Qiagen®. La extracción fue eficiente para las muestras en las que se recuperan entre 1.5 y 3.5×10^6 células por vial: para no saturar las columnas con exceso de material genético y disminuir la contaminación con ADNc (Tabla IV-2).

Adquisición de datos: Con base en el ARN se generaron y secuenciaron las librerías, posterior a la aprobación de calidad con los parámetros de pureza (Nanodrop y Qubit), evaluación de la integridad a través del gel de electroforesis (5/5.8S, 18S, 28S) y el índice *RIN* (*RNA Integrity Number*). Se secuenciaron y construyeron las librerías con Novaseq 150PE/6Gb por muestra.

Tabla IV-2. Requerimientos *Novogene corp*® para el análisis de muestras de ARN por secuenciación masiva.

Tipo de Librería	Tipo de muestra	Concentración (Qubit)	Volúmen	Concentración	Número de integridad de ARN (RIN)	Notas
Librería mRNA eucariota (Enriquecimiento poli A)	Total ARN (no-sangre)	$\geq 0.4 \mu\text{g}$	$\geq 20 \mu\text{L}$	$\geq 20 \text{ng}/\mu\text{L}$	≥ 6.3 como línea de base	OD A260/A230 ≥ 2 , OD A260/A280 ≥ 2 ,

Análisis de la Información

La información de los transcritos genéticos de las células NT-2, se recibió en archivos planos *.fastq*. La información se custodia en un disco duro de 500Gb de capacidad destinado para almacenar la información de los datos crudos, procesados, inventarios de muestras y protocolos del ensayo, garantizando el buen manejo de la información, y reposa en el Departamento de Microbiología de la Universidad del Valle. El flujograma de trabajo de análisis bioinformático se llevo a

cabo como se reporta en la **Figura IV-5**:

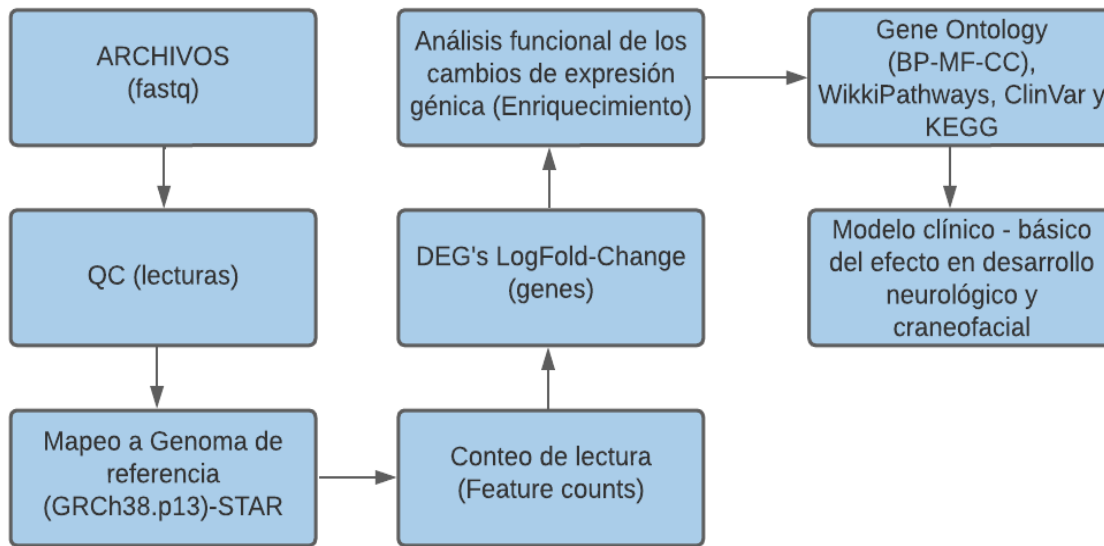


Figura IV-5. Path-line: plan de análisis de transcriptoma de muestras del modelo de infección con ZIKV de células NT-2 embrionarias pluripotenciales y de linaje neural.

- *Control de calidad de los datos:* Se evaluó de la calidad de los datos con el programa FastQC (7). Considerando la alta calidad de las lecturas no fue necesario realizar ninguna limpieza o filtro a los datos. (2).
- *Alinear con la secuencia de referencia:* Los datos crudos obtenidos se mapearon contra el genoma de referencia humano **GRCh38.p13** empleando programa STAR (8) para obtener los archivos *.bam* (2).
- *Conteo de lecturas en cada región:* La medición de la expresión génica se realizó a partir del conteo de las lecturas únicas mapeadas con el programa FeatureCounts (9). La tabla de conteos fue importada al software R con los paquetes *dplyr* y *tidyverse*.
- *Normalización de las lecturas para el efecto de la preparación de la librería:* Los datos de expresión de genes basados en el recuento de lecturas filtradas se normalizaron utilizando *VST* (variance stabilizing transform) del paquete DESeq2, que ajusta la varianza de los datos del recuento de genes transformados logarítmicamente y genera un peso de precisión para cada expresión de genes.

Estimaciones estadísticas de DEG's

Una aproximación exploratoria de lo datos, se realizó con el análisis de componentes principales (**PCA**) utilizando la biblioteca PRCOMP en R, que proyecta objetos de datos multivariados en un espacio de dimensión inferior

mientras conserva la mayor cantidad posible de la varianza original (2). Se utilizó un paquete de software de análisis de secuencias en un modelo lineal (**DESeq2**) (10). Se estimaron los cambios en los perfiles de transcripción (**DEG's**) y la magnitud del cambio dada por el Log2Fold-Change (**Log2FC**) para determinar si esa magnitud del cambio se da en sobre expresión génica o una infra expresión del gen; el error aceptado para el estadístico fue $\leq$ o igual al 5%. Se consideraron estadísticamente diferentes, los cambios de expresión con un p valor del Log2FC inferior a 0,001 en el grupo de **NRA Versus N (NRA-N)**, y un p valor inferior a 0,05 en las células carcinoembrionarias pluripotenciales NT-2 tras la infección con ZIKV (**NZ-N**) e inducidas al linaje neural con AR (**NRAZ-NRA**).

Enriquecimiento de vías

Para el enriquecimiento de vías se consideraron los genes con valores de $FDR > 2$ (valor corregido de falsos positivos del cambio de expresión genética) y un *p-value* $< 0,05$, siendo estos los genes con cambios significativos en el análisis. Cada vía se enriqueció según la bondad de ajuste de los genes significativos con el total de los genes reportados en cada vía (estadístico BonFerroni-BF; *p-value* $< 0,05$).

Interpretación biológica de los resultados

Se estableció la relación funcional de los cambios de FDR al enriquecimiento de vías genéticas con los repositorios de datos biológicos de “**KEGG pathways**”, “**WIKKI pathways**”, “**GO**” (Gene Ontology) “**Biological process-BP**”, “**Molecular Features-MF**” y “**Cellular Components-CC**”, en la que se relacionan los cambios de expresión génica con las vías de señalización mas importantes de la diferenciación celular con el paquete *disgenet2*-RStudio (11). Para el enriquecimiento de vías relacionadas con procesos patológicos en humanos se consultaron los repositorios **ClinVar** y **OMIM**.

El análisis clínico-básico tuvo como objetivo relacionar los genes que mayor magnitud de cambio tuvieron en expresión, las asociaciones patológicas reportadas en *Gene Cards*, hallazgos clínicos obtenidos en el desarrollo del **Capítulo II**, evidencias observadas durante el desarrollo del modelo de infección del **Capítulo III** y los reportados en la literatura científica. Así mismo, las vías significativamente enriquecidas con los procesos patológicos en humanos se intentaron aproximar con los perfiles clínicos neuro-craneofaciales reportados previamente.

5.3 Resultados y Discusión

Extracción y control de Calidad de RNA

Para asegurar la calidad de la extracción del RNA, se empleó una técnica con una columna del Kit *Accuprep*® en un experimento piloto de cuatro muestras, una de cada estadio de diferenciación infectado y no infectado con ZIKV (**N,NZ,NRA,NRAZ**) como se observa en la (**Tabla IV-3**). En este experimento piloto, las muestras tuvieron condiciones requeridas para la secuenciación de RNA-seq en la empresa *Novogene*®, sin embargo los valores de contaminación con cDNA eran muy altos y no permitieron la construcción de una de las librerías en la secuenciación masiva, a pesar de haber tenido valores de RIN (**Figura Suplementaria 2A**), adecuados. Basados en los resultados del experimento piloto y la optimización del proceso de purificación del ARN, se diseñó un segundo experimento con tres réplicas biológicas para cada uno de los tipos de estadio celular infectadas y no infectadas con ZIKV. Al aplicar el protocolo de una segunda columna de purificación de RNA del kit RNeasy PowerSoil Total RNA de *Qiagen*®, los resultados fueron óptimos al obtener menor cantidad de cDNA contaminante y obtener un buen tamaño de las librerías a pesar de tener valores de *RIN* (**Figura Suplementaria 2B**) similares al experimento piloto. En conclusión, emplear una técnica de purificación de doble columna elimina gran cantidad de ADN contaminante siendo la concentración de ARN efectiva al momento de la construcción de las librerías.

Tabla IV-3. Muestras de RNA de cultivo y convenciones para las categorías de análisis.

Muestra	Células (*10 ⁶)	ARN (ng/uL)	Volúmen (uL)	ADN (ng/uL)	RIN	Número de lecturas	Genes expresados (%)	Método de purificación
N	4,8	219	100	53,8	2,7	50319820	36	1
NZ	3,2	174	100	39,2	3	43875554	24	1
NRA	2,8	154	100	33,6	2,6	Falló	0	1
NRAZ	3,6	196	100	39,8	1	27382878	25	1
N Rep1	2,1	79	50	10	6.8	57552630	59	2
N Rep2	1,9	71	50	9,7	7.6	49717312	63	2
N Rep3	1,8	87	50	11,3	6.4	77754770	63	2
NZ Rep1	2	59	50	7,6	3.3	61157944	52	2
NZ Rep2	2,3	82	50	5,7	5.3	65432364	62	2
NZ Rep3	2,1	83	50	17,3	3.3	63116736	59	2
NRA Rep1	2,9	25	60	12,9	2.4	61793078	45	2
NRA Rep2	2,4	31	60	5,3	3.3	54267174	61	2
NRA Rep3	3,4	39	60	21,8	3	48334754	40	2
NRAZ Rep1	1,6	34	60	2,5	4	60344566	53	2
NRAZ Rep2	3,8	39	60	9	2.6	69311308	58	2
NRAZ Rep3	2,6	26	60	9	5.1	68888730	62	2

*Rep.: Replica biológica

**Método de extracción 1= columna de extracción kit *Accuprep*® 2= Método 1 + columna de kit *Total RNA Quiagen*®

De acuerdo a la cantidad de genes anotados y expresados en las diferentes replicas de la **Tabla IV-3**, el análisis de expresión diferencial, se ejecutó solo con las muestras extraídas por el método de doble columna (**Método 2**); la diferencia del tamaño de las librerías del experimento piloto con el segundo experimento, no permitió hacer el análisis completo uniendo los datos de los dos experimentos después de normalizar los datos, inclusive. Al final todas las muestras del experimento construido con las tres réplicas biológicas, tuvieron valores muy superiores a 30.000 lecturas, que en términos generales para un ensayo de RNA seq, es de alta calidad (**Tabla IV-3**).

Análisis de expresión diferencial de genes (DEG).

Después del proceso de ensamblaje y calidad del transcriptoma, se obtuvieron en promedio 30% (28,2% - 34,1%) de genes anotados y mapeados a los que se les determinó la expresión diferencial en las diferentes células NT-2 infectadas o no **Tabla IV-3**. Los datos normalizados (VST= 0,98) dieron un comportamiento uniforme entre las muestras (**Figura IV-6**), se ajustaron lo esperado a pesar de tener diferencias de conteos en las librerías. Después de normalizar el tamaño de las librerías, estas quedaron de aproximadamente 22 millones de lecturas, para cada réplica.

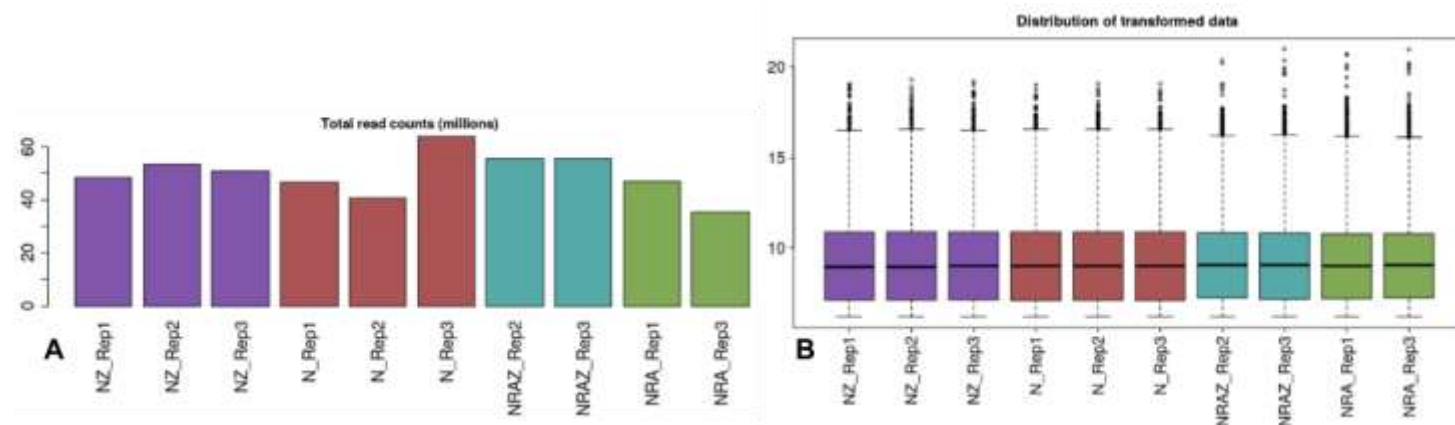


Figura IV-6. Normalización de conteos en las diferentes categorías de comparación. **A.** Distribución de conteos crudos y **B.** Conteos normalizados con VST.

En las células NT-2 del linaje neural (**NRA**), hubo que eliminar una de las tres réplicas del grupo sin infectar y una réplica del grupo de infectado, porque tenían un comportamiento distinto a las otras dos, y lograr normalizar los grupos (**Figura Suplementaria 3**).

Para observar como si los grupos de comparación se comportan gráficamente según el diseño planteado, se evaluó la distribución de acuerdo a la verosimilitud de la expresión, a través del análisis de componentes principales. La mayor variabilidad

de la expresión génica agrupa en extremos distintos la distribución de los grupos. El PC1 explica cerca del 80% de la varianza total de los datos, separando el perfil de expresión génica de las células NT-2 del linaje neural (**NRA**) comparado con el de las células indiferenciadas (N) (**Figura IV-7A**). Mientras que el PC2 explica el 6% de la varianza total de los datos, y separa de acuerdo al perfil de infección principalmente las células NT-2 del linaje neural (**NRAZ**); sin embargo, la infección también explica diferencia en perfil de expresión génica en las células NT-2 embrionarias pluripotenciales (**NZ**) (**Figura IV-7B**).

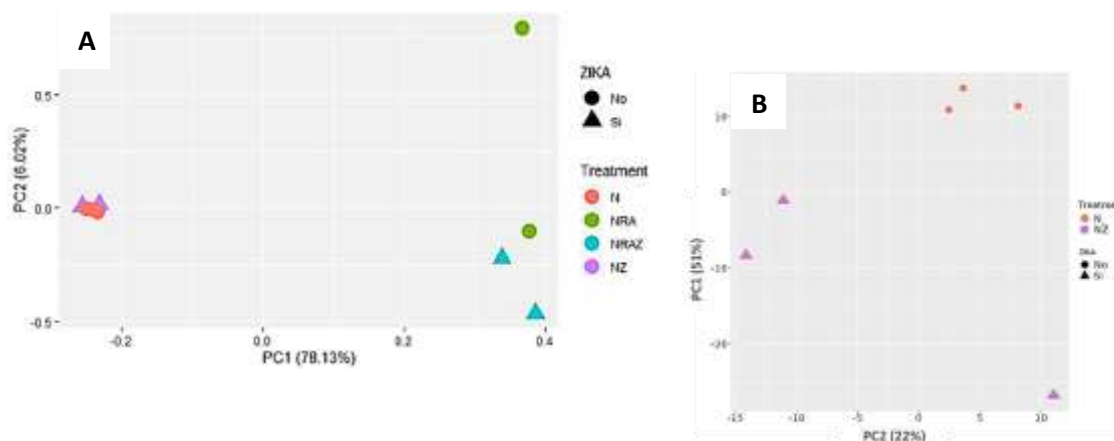


Figura IV-7. Análisis de Componentes principales (PCA), en células NT-2 según su diferenciación e infección con ZIKV. A. PCA componentes 1 y 2 de células indiferenciadas (N) y diferenciadas (NRA). **B.** PCA componentes 1 y 2 en células indiferenciadas (N).

DEG entre Ntera2 diferenciadas con AR y no diferenciadas (NRA Versus N)

Con el propósito de evaluar los cambios en la expresión génica del proceso de diferenciación inducido por el AR, se estimó el valor de cambio (Log2FoldChange-**Log2FC**) en las células NT-2 después del tratamiento con AR. Se encontraron 11388 genes expresados diferencialmente ($p < 0,001$) en las células inducidas a diferenciación, de los cuales 6166 suprimieron su expresión (desregularon/infraexpresaron) y 5222 se sobre expresaron (**Tabla IV-4; Figura IV-8**).

Tabla IV-4. Comparación de genes netos expresados diferencialmente ($p < 0,05$) en las células NT-2 infectadas con el ZIKV según la diferenciación e infección.

Muestras comparadas	DESREGULACIÓN (n)	SOBRE EXPRESIÓN (n)	TOTAL (n)
NRA-N	6166	5222	11388*
NZ-N	551	471	1022
NRAZ-NRA	783	1268	2051
TOTAL	7500	6961	14461

* $p < 0,001$

N= NTERA2 indiferenciada-no infectada, NZ=NTERA2 indiferenciada-infectada, NRA=NTERA2 diferenciada, y NRAZ=NTERA2 diferenciada-infectada.

De acuerdo a lo descrito en la literatura, se esperaba que los cambios inducidos solamente por la diferenciación del cultivo de células NT-2 con AR se presentaran en gran cantidad, como se evidenció en los genes que cambiaron su expresión (**NRA-N**) (12–16). Si bien, no fue posible durante el desarrollo del modelo de infección (**Capítulo III**) marcar la diferenciación de otros tipos de células derivadas de un perfil ectomesenquimal (característico también del comportamiento de las CCN en la embriogénesis), se exploró con base en los transcritos génicos el cambio de expresión de genes relacionados con la diferenciación celular a otros linajes celulares distintos al neuronal y algunos de los cuales se presentan en **Tabla III-2** del **Capítulo III**; y se validó el escenario de simular gráficamente con el enriquecimiento de vías en Gene Ontology (GO-BP) (**Figura IV-8**), y se observa que el AR induce procesos de embriogénesis similares a los procesos que se activan durante la diferenciación de las CCN (15,17,18).

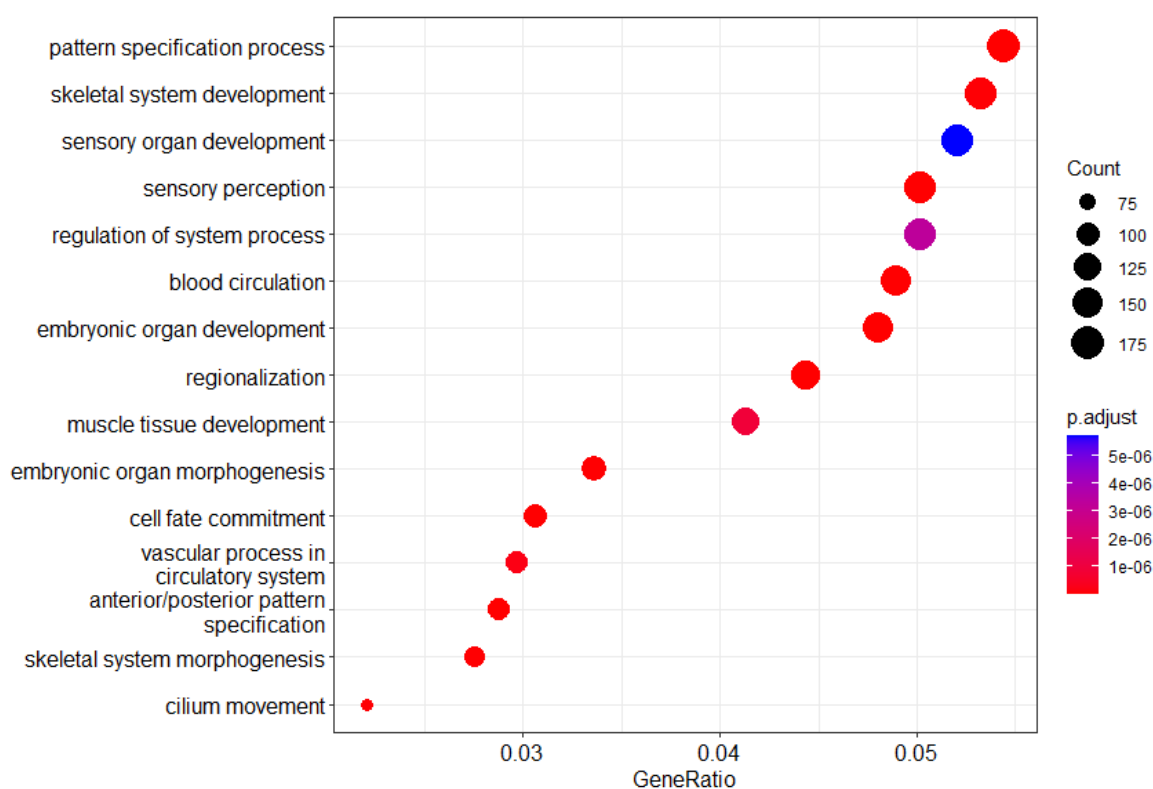


Figura IV-8. Análisis funcional de la estimulación de las NT-2 con AR. Enriquecimiento de genes con cambios de expresión significativos ($p < 0,05$) relacionado con procesos biológicos en la base de datos Gene Ontology (GO BP). NRA versus N (**NRA-N**).

A pesar de que los parámetros de análisis de la magnitud del cambio de expresión fueron estrictos, en el caso de **NRA-N** (**Log2FC**, $p < 0,001$), el perfil de las células NT-2 cambió significativamente acorde al proceso fenotípico de diferenciación, a neurona madura como se mostró en el **Capítulo III** (**Figura III-4, B y E**) (16,19).

Cambios en la expresión génica en las células NT-2 por la infección con ZIKV

La infección con ZIKV indujo cambios en la expresión génica de las células NT-2 independientemente de su estado de diferenciación, hubo genes suprimidos en su expresión y otros sobre expresados. Sin embargo, la infección en células NT-2 del linaje neural (**NRAZ**) indujo una mayor cantidad de genes expresados diferencialmente. Aproximadamente el doble de genes de las células NT-2 embriológicas pluripotenciales (**N**) cambiaron su expresión en las células NT-2 neurales (NZ-N=1022 vs NRAZ-NRA= 2051) tras la infección con ZIKV (**Tabla IV-4; Figura IV-9**).

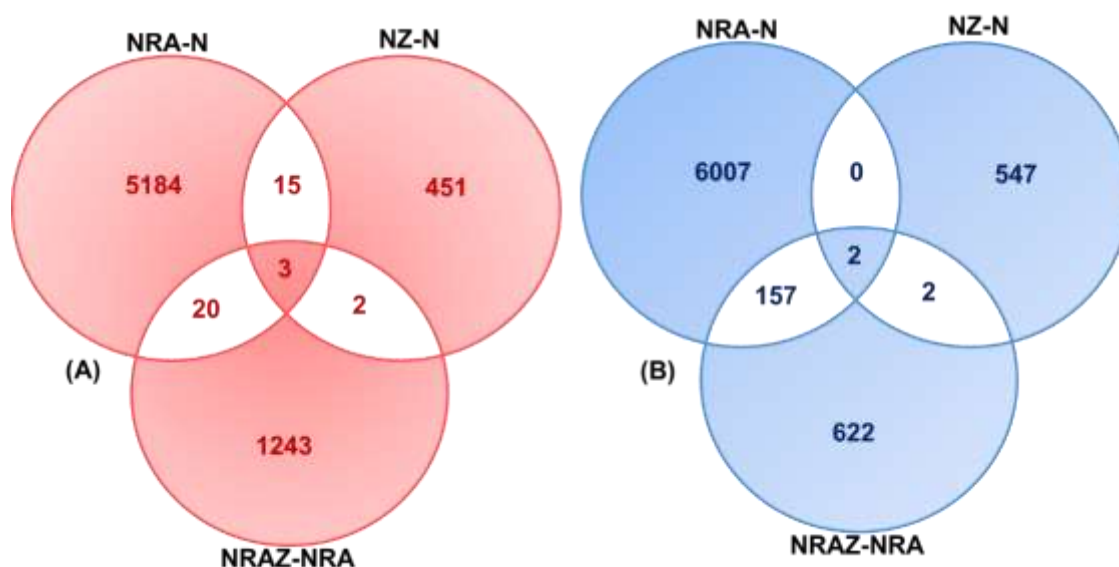


Figura IV-9. Diagrama de Venn. Número neto de genes que tuvieron valores de LogFold Change significativo para cada grupo de réplicas comparadas **(A)** con sobreexpresión y **(B)** inhibidos en su expresión.

La diferenciación con AR (**NRA-N**) indujo sobreexpresión de 5184 e infra expresión de 6007 genes únicos, que no fueron explicados por la infección con ZIKV (**NZ-N** y **NRAZ-NRA**). A su vez, la infección por ZIKV de células NT-2 diferenciadas con AR indujo una mayor expresión en 1243 genes y redujo la expresión de 622. En contraste hubo una menor cantidad de genes que presentaron cambios en su expresión en NT-2 embriológicas pluripotenciales infectadas (**NZ-N**)(**Figura IV-9**); posiblemente porque en el estadio inmaduro/precursor celular, las NT2 fueron menos susceptibles a la infección como se ha reportado para otros virus neurotrópicos (20). y como se demostró en los resultados de las **Figuras III-5 y II-6** (**Capítulo III**).

Análisis de los mayores cambios de expresión génica inducidos en NT-2 infectadas con ZIKV

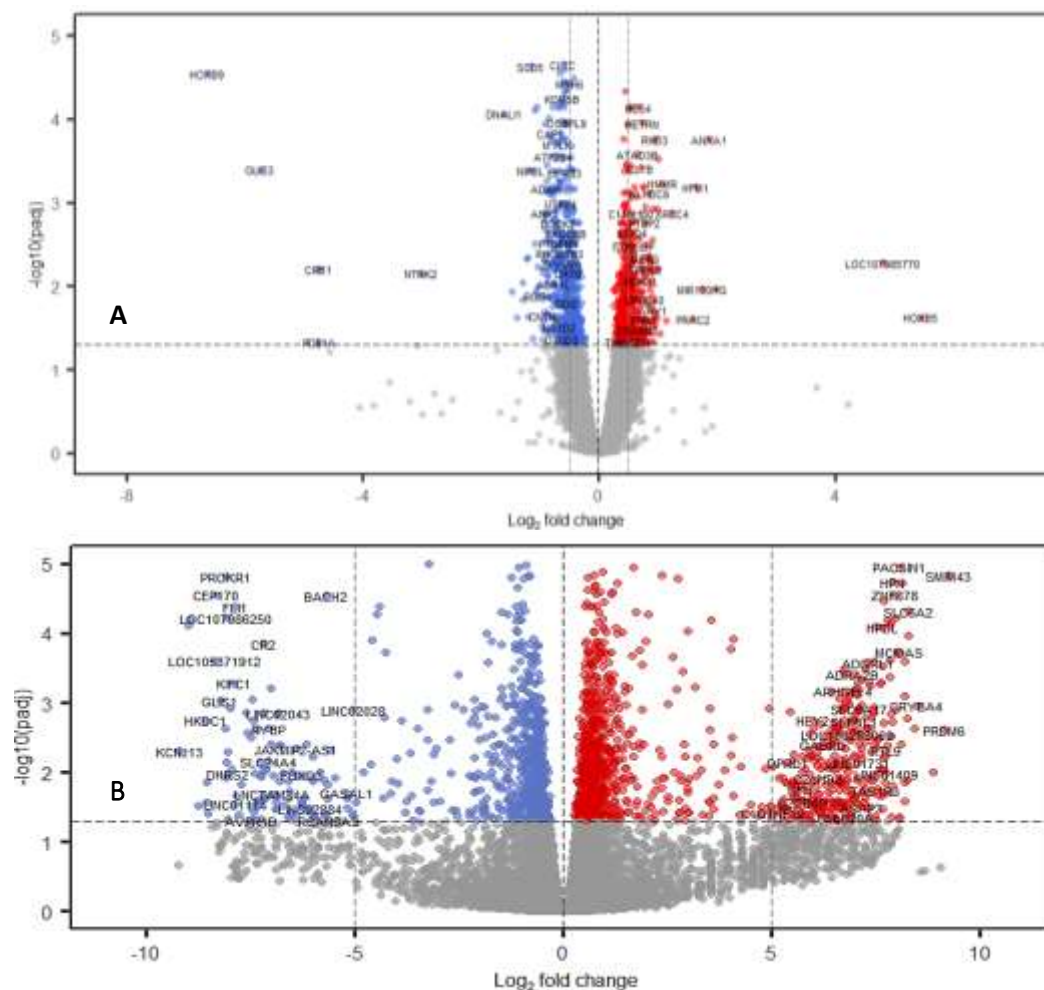


Figura IV-10. Volcano Plot (Azul= infraexpresión - Rojo= sobreexpresión). Genes con mayor expresión diferencial en las células indiferenciadas infectadas (NZ-N) (A). Genes con mayor expresión diferencial en las células diferenciadas infectadas (NRAZ-NRA) (B).

Hubo cambios de infraexpresión y sobreexpresión en los diferentes tipos celulares explicados por la infección con ZIKV. En la **Figura IV-10** se muestra cómo los cambios de expresión génica, son en cantidad y en la magnitud (**Log2FC**), mayores en las células del linaje neural que en las embrionarias pluripotenciales.

Los cambios genéticos se analizaron según la mayor magnitud del cambio (**Log2FC**) y su relación biológica a nivel funcional y los perfiles patológicos reportados para humanos, en los repositorios genéticos disponibles (**Tabla IV-5**).

Tabla IV-5. Genes con mayor magnitud de cambio de expresión tras la infección con ZIKV en NT-2 embriológicas pluripotenciales (NZ-N) y de linaje neural (NRAZ-NRA).

GEN	REGULACIÓN	PATOLOGÍA RELACIONADA	REF.
NZ-N			
HOXB5	5,5	Leucemia Mieloide, síndrome congénito hipoventilación	(21)
ANXA1	1,9	Edema cerebral	(22)
RND3	1	Hidrocefalia ligada al X	(23)
ZNF302	1	Gangliosidosis (neurodegeneración)	(24)
HFM1	1,6	Falla ovárica	(25)
KLHDC9	0,9	Polineuropatía crónica	(26)
XRCC4		Baja estatura y microcefalia con síndrome de resistencia a la insulina	(27)
ARL14EP	0,9	Microcefalia	(28,29)
ELMOD2	0,9	Fibrosis pulmonar	(30)
IFTAP	1	Displasia Cranioectodermal	(31)
ZFAND1	0,9	Patología de hueso y demencia frontotemporal	(32)
HOXB8	2	Comportamiento impulsivo, síndrome de Frágil X	(33,34)
DRAM2	0,9	Distrofia de retina, retinitis pigmentosa	(35,36)
ARV1	0,9	Encefalopatía epiléptica	(37)
PRAC2	1,6	Braquidactilia tipo C	(38)
SLC35A1	1	Trastorno metabólico de glicosilación	(39)
TATDN1	0,9	Cáncer de pulmón, carcinoma urotelial	(40)
HOXB9	-6,62	Cáncer pulmonar	(41)
GLIS3	-5,74	Diabetes mellitus neonatal	(42)
CRB1	-4,74	Atrofia coriorretinal pigmentosa	(43)
PDE1A	-4,72	Uniones de cGMP (alteraciones metabólicas)	(44)
NTRK2	-3	Retraso mental, encefalopatía epiléptica	(45,46)
SCD5		Sordera congénita, alteración del desarrollo del sistema nervioso	(47)
DNALI1	-1,15	Disquinesia ciliar	(48)
TPR	-0,91	Síndrome de camptodactilia artropatía y pericarditis	(49)
NIPBL		Síndrome de Cornelia de Lange (dimorfismo facial, prognatismo maxilar), Microcefalia.	(50,51)
ADAM17	-0,88	Enfermedad neonatal inflamatoria de la piel y el intestino	(52)
ADAR		Discromatosis simétrica hereditaria (hiperpigmentación, maculas)	(53)
ANK3	-0,9	Desorden de desarrollo intelectual, Neurodegeneración y alteraciones mentales	(54,55)
KLHL20	-0,92	Patología del desarrollo anterior del ojo	(56)
SLC6A6	-1,09	Degeneración retinal	(57)
PPTC7	-1,21	Regulación de apoptosis	(58)
FAM169A	-1,03	Distrofia muscular Emery Dreifuss	(59)
EFNB2	-0,86	Alteración del desarrollo del sistema nervioso	(60)

FOXJ1	-1,48	Disquinesia ciliar	(61)
SHPRH	-1,28	Xeroderma pigmentosa (neurodegeneración relacionada con fotosensibilidad ocular y de piel)	(62)
DDHD1	-0,97	Paraplejia espástica autosómica	(63)
APAF1	-1,11	Defectos del tubo neural	(64)
NRAZ-NRA			
MARCHF10	7,7	Disquinesia ciliar	(65)
GRIN2C	7,9	Retinitis pigmentosa, Esquizofrenia, Autismo, Alteración en el desarrollo, Microcefalia	(66,67)
PRDM6	9,1	Alteración de formación arterial	(68)
CRYBA4	8,5	Microftalmia, alteración de formación del cristalino	(69)
C12orf42	7,6	Enfermedad de la pigmentación caracterizada por máculas hiper e hipopigmentadas reticuladas de distribución generalizada	(70)
MSS51	7,9	Discapacidad asociada al cromosoma X	(71)
HAND1	7,8	Formación alterada del corazón desde la cresta neural	(72)
MCIDAS	8,1	Disquinesia ciliar	(73)
ZNF385D	8,3	Dislexia	(74)
P2RX2	7,8	Tularemia, Gota (artritis)	(75,76)
PRR19	8	Isotropía alternante	(77)
SLC6A2	8,3	Ansiedad generalizada, desorden de hiperactividad	(78,79)
TMEM63C	8,2	Paraplejia espástica	(80)
SMIM43	9,3	Artrogriposis	(81)
PACSIN1	8,1	Endocitosis mediada por claritina	(82)
AVPR1B	-7,5	Diabetes insípida, Síndrome de Asperger	(83,84)
C11orf21	-8,5	Macroglosia, Falla en la diferenciación de células pluripotenciales	(85)
GPR4	-7,8	Síndrome de hipoventilación congénito, Cáncer de ovario	(86,87)
PLEKHD1	-8,6	Enfermedad infecciosa por virus del visión aleutiano	(88)
DHRS2	-8,05	Enfermedad del oído medio	(89)
SOX18	-8,1	Síndrome de hipotricosis, linfedema y telangiectasia	(90)
KCJNJ13	-9,2	Ataxia-epilepsia	(91,92)
ERVV-2	-8,05	Gen endógeno retrovirus	(93)
MAGEB3	-7,5	Melanoma	(94)
PTEN	-8,13	Es parte de la vía PI3K/AKT/mTOR y los inhibidores de mTOR, se relaciona con microcefalia y autismo	(95)
HKDC1	-8,6	Labio y paladar hendido, retinitis pigmentosa	(96,97)
LINC01234	-8	Carcinoma escamocelular y cáncer gástrico	(98,99)
GLIS3	-1,23	Encefalitis equina y epilepsia	(100)
KIFC1	-7,9	Transporte retrogrado Golgi-ER	(101)
NT5E	-9	Calcificaciones en articulaciones y arterias	(102)
FAM166B	-8,9	Enfermedad intestinal	(103)
FLI1	-7,9	Desarrollo del Sistema Nervioso	(104)

CEP170	-8,33	Microcefalia primaria	(105)
PROKR1	-8,08	Actividad del receptor del neuropéptido	(106)

En la **Tabla IV-5** se presentan un total de 72 genes con mayor magnitud del cambio en su expresión (38 en las células **NZ** y 34 en las células **NRAZ**) y las patologías que se han asociado con esos genes (*GeneCARDS*). El cambio de expresión génica fue mayor en las células NT-2 del linaje neural infectadas (**NRAZ**) según los valores de Log2FC. Sin embargo, las alteraciones patológicas relacionadas individualmente tanto en las células NT-2 embrionarias pluripotenciales (**NZ**) como en las NT-2 de linaje neural (**NRAZ**), coinciden con algunos de los signos y características reportadas en la literatura y en nuestra cohorte de pacientes estudiada en el **Capítulo II**. La microcefalia es la característica con mayor evidencia en el Síndrome congénito por ZIKV-SCZ (107), y los genes de mayor cambio tanto en el modelo de células embrionarias pluripotenciales (**NZ**) como en las diferenciadas neurales; presentando una sobreexpresión en los genes: *XRCC* y *ARL14EP*, y una infra expresión en el gen: *NIPBL*; y en el caso del linaje neural (**NRAZ**) se sobreexpresaron: *GRIN2C* y en infra expresión: *PTEN* y *CEP170*.

Las alteraciones oculares, el dimorfismo facial, epilepsia y el espectro autista citado desde la discapacidad cognitiva y alteraciones comportamentales, en conjunto describen el cuadro clínico reportado en los pacientes con infección congénita en los diferentes estudios clínicos; todos estos, de alguna manera representados por los genes que se sobreexpresaron o suprimieron su expresión en el modelo de células NT-2 en estadio pluripotencial y del linaje neural (**Tabla IV-5**) (1,107,108). Es importante resaltar, que tras la infección con ZIKV se sobreexpresaron en gran magnitud en las NT-2 del linaje neural (**NRAZ**) los genes *ZNF385D* y *SMIM43*, que se relacionan con dos de las condiciones clínicas mas frecuentes en niños con SCZ, dislexia y artrogriposis respectivamente (109–114); así como también hubo un grupo grande de genes con cambios relacionados con alteraciones oculares en los dos linajes celulares infectados, y que a su vez son frecuentemente reportados como parte del espectro clínico del SCZ (109,115,116).

Con relación al desarrollo facial encontramos genes en las NT-2 embrionarias pluripotenciales infectadas (**NZ**) relacionados con prognatismo maxilar, tal como la subexpresión de *NIPBL*, que fue un signo clínico común para los niños evaluados de nuestro estudio en el **Capítulo II** (50,51). Por otra parte, también se presentó en las NT-2 del linaje neural la infra expresión de los genes *C11orf21* (85) asociado al desarrollo de macroglosia y *HKDC1* de labio y paladar fisurado (96), anotaciones importantes para estudios futuros.

De la misma manera que para los otros genes discutidos anteriormente, la mayoría de cambios significativos en genes relacionados con el desarrollo neurológico y craneofacial, se presentaron en las células NT-2 de linaje neural infectadas (**NRAZ**). Esto se puede explicar porque la proporción de células en las NT2 embrionarias (**NZ**) es pluripotencial y de diferentes proporciones de precursores (no caracterizados) de otros linajes distintos al neurológico (14,16), pero también por

que la mayoría de células infectadas en **NRAZ** son neuronas y/o precursores neuronales (**Capítulo III, Figura III-6**).

De acuerdo con lo reportado en la literatura se extrajeron datos de genes que participan durante el desarrollo embrionario, en la formación del complejo craneofacial para evaluar la expresión diferencial, estos datos se resumen en la **Tabla IV-6**:

Tabla IV-6. Comparación de la expresión génica de familias de genes relacionados con neurogénesis y desarrollo craneofacial ($p < 0,05$).

Log2Fold Change				
GEN	NZ-N	p-adj	NRAZ-NRA	p-adj
GSK3B	-	-	0,54	0,00045
MED13L	-0,87	0,02	0,66	0,017
MASP1	-	-	-1,04	0,045
CYP26B	-	-	-1,697	0,001
MCPH1-DT	-	-	-1,17	7,4E-04
PHC1	-	-	0,9	8,07E-05
NOTCH2	-0,52	0,005	-	-
MYCBP2	-0,78	0,00007	0,67	0,0048
ID1	0,5	0,0016	-0,42	0,038
RXRA	-	-	-0,91	0,01
SNAI3	-	-	2,89	0,0039
TFAP2C	-	-	0,87	0,0009
TFAP2E	-	-	2,97	0,017
ZIC2	-	-	0,51	0,014
ZIC5	-	-	0,53	0,022
FGF19	-	-	-1,4	7,27E-06
FGFR4	-	-	-1,2	0,00084
FGF13-AS1	-	-	5,66	0,024
FGF4	-	-	6,74	0,00032
BMP4	-	-	-0,48	0,04
BMP8B	-	-	-1,5	0,03
FZD3	-	-	7,44	0,001
FZD5	-0,52	0,06	-	-
PAX5	-	-	7,02	0,0007
PHOX2A	-	-	1,18	0,04
HOXA-AS3	-	-	-1	0,02
HOXB-AS3	-	-	-0,9	0,007
HOXB1	-	-	-0,7	0,01
HOXA2	-	-	0,8	0,006
HOXB5	5,45	0,02	13,7	1,3E-13
HOXB8	2	0,01	10,8	2,3E-92
HOXB9	-6,62	2,82E-05	-	-

“-”= Sin Dato, no hubo diferencia estadística al comparar con el control, para ese gen

p = ajustado

Hay genes que orquestan la formación de la cara y por ende el complejo maxilofacial una vez se da el selle del tubo neural durante la embriogénesis. Estos se agrupan en varias familias: factor de crecimiento de fibroblastos (*FGF*), Wingless (*WNT*-en inglés), proteínas de morfogénesis ósea (*BMP*); así como los factores de transcripción que se estimulan para llevar a cabo sus funciones: las familias de factores *RUNX*, *SOX*, *DLX* y *MSX* (117). En la **Tabla IV-6** hay cambios significantes en genes relacionados con el desarrollo facial como *FZD3*, *PAX5*, *HOXB5*, *HOXB8*, *HOXA2* y *FGF4*; y así como los genes de la **Tabla IV-5** pueden relacionarse con aspectos del desarrollo anatómico y funcional del complejo maxilofacial, estos genes tienen participación fundamental y se relacionan con procesos patológicos como dimorfismo facial, craneosinostosis y paladar hendido (18).

Enriquecimiento de vías

Para establecer la interpretación funcional del cambio de expresión génica en las células NT-2 inducida por la infección con ZIKV, fue necesario enriquecer las anotaciones con las vías reportadas en los diferentes repositorios genéticos para humanos de acceso público. Para el caso de este estudio se presentan resultados de enriquecimiento en las células NT-2 embrionarias pluripotenciales (**NZ**) para los repositorios de Gene Ontology-Molecular features (**GO MF**-en inglés), Gene Ontology Biological process (**GO BP**) y *ClinVar* (**Figura IV-11**).

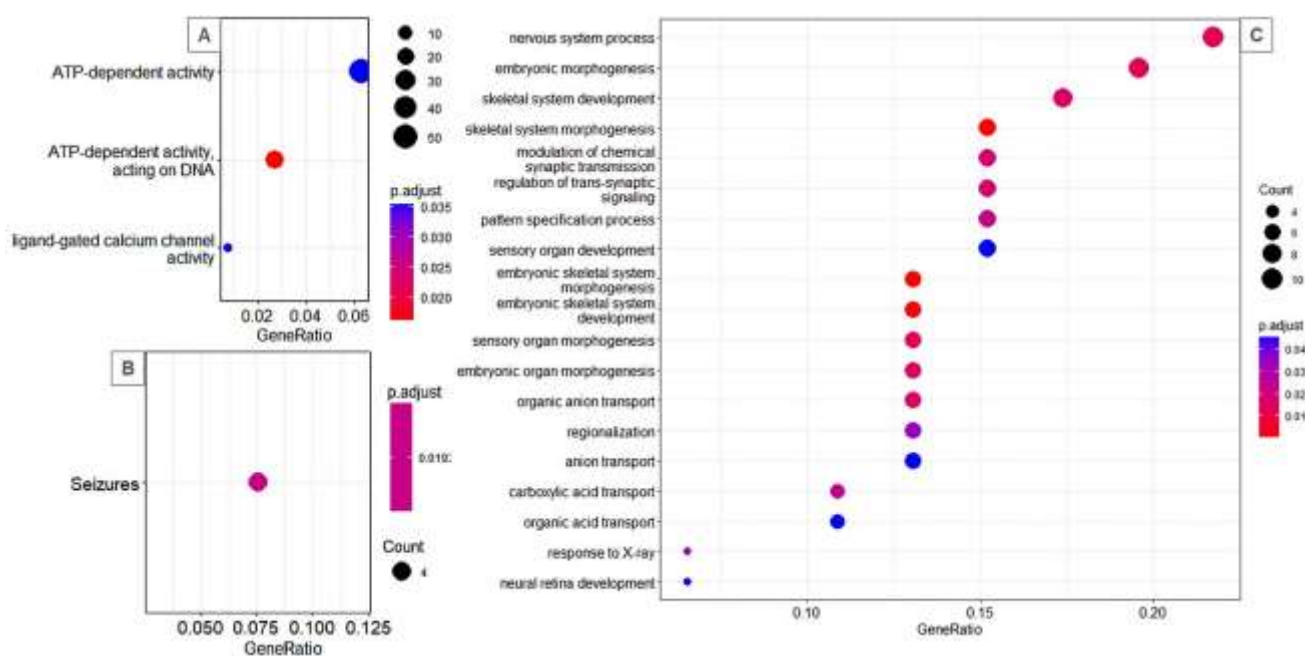


FIGURA IV-11. A. Enriquecimiento de genes relacionado con procesos moleculares de gene ontology (**GO MF**). B. Enriquecimiento de genes en el repositorio de variables en expresión génica clínica **ClinVar**. C. Enriquecimiento de genes relacionados con procesos biológicos en la base de datos Gene Ontology (**GO BP**).

De acuerdo al análisis de enriquecimiento, en las células NT-2 embriológicas pluripotenciales por Zika (NZ) principalmente se presentan significativamente alterados procesos moleculares relacionados con canales de calcio (**Figura IV-11A**), clínicamente se altera la vía relacionada con la presencia de convulsiones (*ClinVar*: *sceizures*) (**Figura IV-11B**) que es un signo clínico frecuentemente encontrado en niños con SCZ (118). Se presentan con significancia estadística, alterados procesos biológicos relacionados con el desarrollo embrionario, desarrollo sensorial, transporte de iones (incluido el calcio)(109) y desarrollo de la retina, este último también una secuela común de la infección congénita con ZIKV (2) (**Figura IV-11C**). En este análisis de las células NZ, no se identifican vías activadas como repuesta inmune a la infección como se reporta para otros modelos celulares humanos y murinos (1,119), y que pudiera deberse a la poca cantidad de células susceptibles a la infección en este estadio (**Capítulo III**).

Por otra parte, los cambios en las células NT-2 de linaje neural (NRAZ) enriquecieron funcionalmente vías para los repositorios de procesos biológicos y clínicos de Wikki Pathways (WP), KEGG y Gene Ontology (GO BP); así como para el repositorio de procesos moleculares de Gene Ontology (GO MF) (**Figura IV-12**).

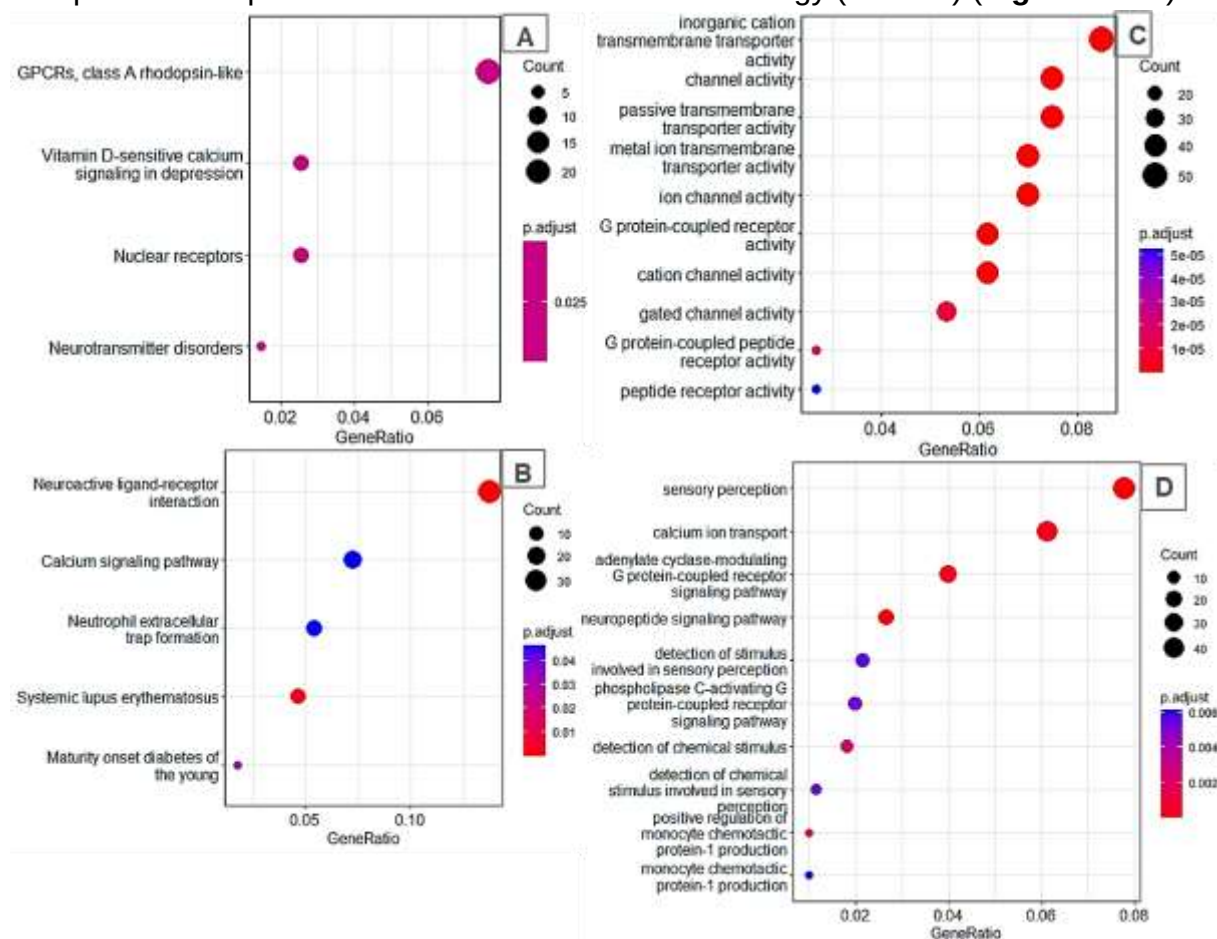


FIGURA IV-12. A. Enriquecimiento de genes relacionado con procesos reportados en el repositorio Wikki pathways (WP). B. Enriquecimiento de genes en el repositorio de expresión biológica y clínica

KEGG. C. Enriquecimiento de genes relacionado con procesos moleculares de Gene Ontology (**GO MF**). **D.** Enriquecimiento de genes relacionados con procesos biológicos en la base de datos Gene Ontology (**GO BP**).

En el análisis de las células NT-2 de linaje neural, la infección por ZIKV (**NRAZ**) muestra alteraciones en la expresión de genes relacionados con vías moleculares y biológicas del transporte de iones (especialmente del Calcio) al igual que para el caso de las células NT-2 embriológicas pluripotenciales e infectadas con ZIKV (**NZ**). Alteraciones en vías relacionadas con el calcio pudieran estar relacionada con las calcificaciones cerebrales en el SCZ (109). En contraste, en este estadio de las células NT-2 del linaje neural si se visualizan vías enriquecidas relacionadas con la respuesta inmune a la infección, sin embargo no aparece la vía del IFN tipo 1 como ha sido reportado previamente en otros modelos celulares (1,2,119), esto debe evaluarse en el futuro, porque puede estar relacionado con la proporción de progenitores neurales que tienen las líneas celulares en otros modelos de estudio (120). Si se identificó DEG en el *TNFRSF1*, reportado recientemente como parte de la respuesta a la infección por ZIKV, en el grupo **NRAZ-NRA**(1).

Clínicamente se muestran alteraciones que enriquecieron vías patológicas relacionadas con Diabetes juvenil y lupus eritematoso, dos condiciones de autoinmunidad que pudieran explicarse por el neurotropismo y que en algunas infecciones como el ZIKV generan un estado de autoinmunidad transitoria al parecer mediada por la hipófisis (121), sin embargo hay que seguir observando si se presentan algunos de estos síntomas de autoinmunidad o enfermedades metabólicas a medida que los niños con SCZ continúan su crecimiento y desarrollo. También se enriquecieron vías relacionadas con problemas de neurotransmisores y la percepción sensorial, alteraciones que clínicamente estuvieron presentes en el grupo de niños evaluados y descritos en el **Capítulo II**, quienes presentaron alteraciones desencadenadas por hipersensibilidad facial y perioral, y en algunos casos pérdida de la visión y audición; lo cual probablemente se puede relacionar con alteraciones en el desarrollo del Sistema Nervioso Periférico-SNP (122).

Acercando la clínica de la infección congénita del Virus Zika con las ciencias básicas

En un esfuerzo por generar hipótesis que contribuyan al conocimiento de la historia natural de la infección congénita por ZIKV, tratamos de reconciliar los hallazgos obtenidos de lo reportado a este respecto en la literatura científica, con los resultados de nuestro estudio clínico (**Capítulo II**), el desarrollo del modelo de infección de NT-2 (**Capítulo III**) y el perfil de expresión génica del transcriptoma del ZIKV en un modelo in vitro de células madre embrionarias pluripotenciales y de su progenie diferenciada a neuronas/linaje neural. En la **Figura IV-13** se presentan los resultados innovadores de los transcritos genéticos reportados en este estudio, junto con la marca genética reportada anteriormente (algunos también en este estudio), todos asociados con los perfiles clínicos que se han descrito para el SCZ.

Hay algunos signos y síntomas reportados en la literatura como parte del SCZ, que ya tienen algunas asociaciones genéticas comprobadas con otros estudios clínicos, tejidos infectados con ZIKV de humanos, modelos animales y modelos celulares de infección con ZIKV (en color azul), algunos también encontrados por nosotros (en color morado). Sin embargo, según la evidencia presentada en los **Capítulos II, III y IV**, la infección con ZIKV altera o induce la expresión de otros genes en el modelo celular, con los que también se han documentado en general relaciones patológicas en la base de *GeneCards* y que hacen parte del SCZ (**Figura IV-13**). Los nuevos genes aquí reportados pueden explicar signos importantes del SCZ como en la microcefalia, epilepsia y malformaciones oculares del cristalino y pigmentaciones de retina (2,109,116).



Figura IV-13. Asociación patológica del SCZ y perfil de expresión genética. Se grafican los genes con mayor Log2Fold-Change en células NT-2 en los dos estadios, pluripotencial y neural, infectadas con ZIKV en su relación con los hallazgos clínicos mas frecuentes del SCZ. **Azul**= Genes previamente reportados a cada signo clínico, **Morado**= Genes encontrados con expresión diferencial en nuestro estudio y previamente (123) y **Verde**= Los genes propuestos por este estudio integrando los resultados de los **Capítulos II-III-IV**.

Por otra parte estamos reportando nuevas características clínicas del SCZ consecuencia de la afectación del desarrollo cráneo-facial, que se identificaron con alta frecuencia en la caracterización clínica del grupo de niños evaluados en el Capítulo II y se pueden relacionar con los genes que presentaron mayor magnitud de cambio de expresión en el modelo in vitro de infección ZIKV en las células humanas (pluripotenciales y neuronas/línea neural), como son la dislexia y el prognatismo maxilar (107,111,112,124). Estos últimos resultados también son novedosos y podrían ser el resultado de cambios genéticos generados por ZIKV, en células progenitoras mesenquimales de CCN o su progenie en el viscerocráneo,

que de acuerdo a nuestro modelo *in vitro* (**Tabla III-2**) también son afectadas por ZIKV; por ejemplo la sobreexpresión de *YAP* (como marcador mesenquimal) en **NZ** y *FGF1* (como marcador de factor de crecimiento de fibroblastos) en **NRAZ**; que nos sugiere algún tipo de afección explicada por la infección en estas células que juegan un papel importante en la diferenciación de las CCN y en la formación de la cara (18,125).

5.4. Conclusiones

La infección congénita por ZIKV afecta más a las células del linaje neural por su mayor susceptibilidad a la infección, lo que confirma las aberrantes consecuencias clínicas que observamos en la formación del SNC y SNP en los niños afectados durante el periodo de epidemia en Colombia. Sin embargo, otras afecciones clínicas craneofaciales, no precisamente derivadas de alteraciones neurodegenerativas por la infección con ZIKV, y que pueden explicarse por efectos directos o indirectos del virus en células precursoras mesenquimales que, según los resultados de nuestro estudio, son secuelas clínicas de la infección, pero de menor gravedad. A pesar de ser menores y diversas las secuelas anatómicas y funcionales sobre el desarrollo craneofacial tras la infección congénita por ZIKV, estas demandarán servicios de atención en Salud, para los que los profesionales de Salud y los sistemas que deben estar capacitados y estructurados para dar respuesta oportuna y eficiente.

A menos de que se genere un nuevo brote en los humanos, los modelos animales y celulares, seguirán siendo los escenarios que permitirán continuar construyendo la historia natural de esta enfermedad.

El modelo de infección celular permitió generar nuevo conocimiento del SCZ y entre ellos, genes asociados con la diabetes juvenil; y otros genes que explican la dislexia y el prognatismo maxilar.

5.5 Limitaciones y Recomendaciones

Se recomienda continuar con el seguimiento de los niños clínicamente desde la odontología y otras disciplinas para intervenir las secuelas de la infección congénita por ZIKV en el Valle del Cauca.

El desarrollo del modelo celular de NT-2 debe ser mejor caracterizado en estadio de diferenciación (con marcadores específicos de neurona inmadura y mesenquimales), ya que se visualizan diversos tipos celulares a partir de la estimulación con AR, y se sugiere que son células de naturaleza ectomesenquimal; y así con una mejor caracterización de los tipo celulares se pueden usar con otros patógenos neurotrópicos identificados o emergentes.

Se sugiere enriquecer el conocimiento (adicional de la perspectiva clínico-básica) del efecto de esta infección congénita y el impacto en sus familias y cuidadores; pues el amplio espectro clínico de la discapacidad y la limitada posibilidad de una rehabilitación genera altos costos económicos y sociales, poco identificados en nuestro país.

Finalmente es necesario difundir la información científica de esta patología a los profesionales de salud, comunidad científica y población en general.

5.6 Bibliografía

1. Gratton R, Tricarico PM, Agrelli A, Colaço da Silva HV, Coêlho Bernardo L, Crovella S, et al. In Vitro Zika Virus Infection of Human Neural Progenitor Cells: Meta-Analysis of RNA-Seq Assays. *Microorganisms*. 2020;8(2):270.
2. Singh PK, Khatri I, Jha A, Pretto CD, Spindler KR, Arumugaswami V, et al. Determination of system level alterations in host transcriptome due to Zika virus (ZIKV) Infection in retinal pigment epithelium. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–16.
3. Komarasamy TV, Adnan NAA, James W, Balasubramaniam VRMT. Zika Virus Neuropathogenesis: The Different Brain Cells, Host Factors and Mechanisms Involved. *Front Immunol*. 2022;13:773191.
4. Rolfe AJ, Bosco DB, Wang J, Nowakowski RS, Fan J, Ren Y. Bioinformatic analysis reveals the expression of unique transcriptomic signatures in Zika virus infected human neural stem cells. *Cell Biosci*. 2016;6(1):42.
5. Kozak RA, Majer A, Biondi MJ, Medina SJ, Goneau LW, Sajesh B V, et al. MicroRNA and mRNA dysregulation in astrocytes infected with Zika virus. *Viruses*. 2017;9(10):297.
6. Shah PS, Link N, Jang GM, Sharp PP, Zhu T, Swaney DL, et al. Comparative flavivirus-host protein interaction mapping reveals mechanisms of dengue and Zika virus pathogenesis. *Cell*. 2018;175(7):1931–45.
7. Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Babraham Bioinformatics, Babraham Institute, Cambridge, United Kingdom; 2010.
8. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 2013;29(1):15–21.
9. Liao Y, Smyth GK, Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*. 2014;30(7):923–30.
10. Love MI, Anders S, Huber W. Analyzing RNA-seq data with DESeq2. *Bioconductor*. 2017;2:1–63.
11. Piñero J, Bravo À, Queralt-Rosinach N, Gutiérrez-Sacristán A, Deu-Pons J, Centeno E, et al. DisGeNET: a comprehensive platform integrating information on human disease-associated genes and variants. *Nucleic Acids Res*. 2016;gkw943.
12. Abolpour Mofrad S, Kuenzel K, Friedrich O, Gilbert DF. Optimizing neuronal differentiation of human pluripotent NT 2 stem cells in monolayer cultures. *Dev Growth Differ*. 2016;58(8):664–76.
13. Andrews PW. Retinoic acid induces neuronal differentiation of a cloned human embryonal carcinoma cell line in vitro. *Dev Biol*. 1984;103(2):285–93.
14. Tonge PD, Andrews PW. Retinoic acid directs neuronal differentiation of human pluripotent stem cell lines in a non-cell-autonomous manner. *Differentiation*. 2010;80(1):20–30.

15. Hindley CJ, Condurat AL, Menon V, Thomas R, Azmitia LM, Davis JA, et al. The Hippo pathway member YAP enhances human neural crest cell fate and migration. *Sci Rep.* 2016;6(1):1–9.
16. Ackerman SL, Knowles BB, Andrews PW. Gene regulation during neuronal and non-neuronal differentiation of NTERA2 human teratocarcinoma-derived stem cells. *Mol brain Res.* 1994;25(1–2):157–62.
17. Martínez-Morales PL, Díez del Corral R, Olivera-Martínez I, Quiroga AC, Das RM, Barbas JA, et al. FGF and retinoic acid activity gradients control the timing of neural crest cell emigration in the trunk. *J Cell Biol.* 2011;194(3):489–503.
18. Naqvi S, Hoskens H, Wilke F, Weinberg SM, Shaffer JR, Walsh S, et al. Decoding the Human Face: Challenges and Progress in Understanding the Genetics of Craniofacial Morphology. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2022;
19. Pleasure SJ, Page C, Lee VM. Pure, postmitotic, polarized human neurons derived from NTERA 2 cells provide a system for expressing exogenous proteins in terminally differentiated neurons. *J Neurosci.* 1992;12(5):1802–15.
20. Hirka G, Prakash K, Kawashima H, Plotkin SA, Andrews PW, Gönczöl E. Differentiation of human embryonal carcinoma cells induces human immunodeficiency virus permissiveness which is stimulated by human cytomegalovirus coinfection. *J Virol.* 1991;65(5):2732–5.
21. Méndez-Maldonado K, Vega-López GA, Aybar MJ, Velasco I. Neurogenesis from neural crest cells: molecular mechanisms in the formation of cranial nerves and ganglia. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:635.
22. Mima T, Shigeno T. Lipocortin-1 fails to ameliorate cold-injury brain edema in the rat. In: *Brain Edema XI*. Springer; 2000. p. 307–10.
23. von Spreckelsen N, Kessler C, Brokinkel B, Goldbrunner R, Perry A, Mawrin C. Molecular neuropathology of brain-invasive meningiomas. *Brain Pathol.* 2022;32(2):e13048.
24. Zhao K, van der Spoel A, Castiglioni C, Gale S, Fujiwara H, Ory DS, et al. 19q13.12 microdeletion syndrome fibroblasts display abnormal storage of cholesterol and sphingolipids in the endo-lysosomal system. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Molecular Basis Dis.* 2018;1864(6):2108–18.
25. Wang J, Zhang W, Jiang H, Wu B-L. Mutations in HFM1 in recessive primary ovarian insufficiency. *N Engl J Med.* 2014;370(10):972–4.
26. Rahman MR, Islam T, Shahjaman M, Zaman T, Faruquee HM, Jamal MAHM, et al. Discovering biomarkers and pathways shared by alzheimer's disease and ischemic stroke to identify novel therapeutic targets. *Medicina (B Aires).* 2019;55(5):191.
27. Murray JE, Van Der Burg M, IJspeert H, Carroll P, Wu Q, Ochi T, et al. Mutations in the NHEJ component XRCC4 cause primordial dwarfism. *Am J Hum Genet.* 2015;96(3):412–24.
28. Mossink B, Negwer M, Schubert D, Nadif Kasri N. The emerging role of chromatin remodelers in neurodevelopmental disorders: a developmental perspective. *Cell Mol Life Sci.* 2021;78(6):2517–63.
29. Nieves-Moreno M, Noval S, Peralta J, Palomares-Bralo M, Del Pozo A, García-Miñaur S, et al. Expanding the phenotypic spectrum of PAX6 mutations: from congenital cataracts to nystagmus. *Genes (Basel).* 2021;12(5):707.
30. Turn RE, Linnert J, Gigante ED, Wolfrum U, Caspary T, Kahn RA. Roles for ELMOD2 and Rootletin in ciliogenesis. *Mol Biol Cell.* 2021;32(8):800–22.
31. Huttlin EL, Ting L, Bruckner RJ, Gebreab F, Gygi MP, Szpyt J, et al. The BioPlex network: a systematic exploration of the human interactome. *Cell.* 2015;162(2):425–40.
32. Tolay N, Buchberger A. Role of the Ubiquitin System in Stress Granule Metabolism.

- Int J Mol Sci. 2022;23(7):3624.
33. Van Deren DA, De S, Xu B, Eschenbacher KM, Zhang S, Capecchi MR. Defining the Hoxb8 cell lineage during murine definitive hematopoiesis. *Development*. 2022;149(8):dev200200.
 34. Gandhi T, Lee CC. Neural mechanisms underlying repetitive behaviors in rodent models of autism spectrum disorders. *Front Cell Neurosci*. 2021;14:592710.
 35. El-Asrag ME, Sergouniotis PI, McKibbin M, Plagnol V, Sheridan E, Waseem N, et al. Biallelic mutations in the autophagy regulator DRAM2 cause retinal dystrophy with early macular involvement. *Am J Hum Genet*. 2015;96(6):948–54.
 36. Birtel J, Eisenberger T, Gliem M, Müller PL, Herrmann P, Betz C, et al. Clinical and genetic characteristics of 251 consecutive patients with macular and cone/cone-rod dystrophy. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–11.
 37. Salian S, Scala M, Nguyen TTM, Severino M, Accogli A, Amadori E, et al. Epileptic encephalopathy caused by ARV1 deficiency: Refinement of the genotype–phenotype spectrum and functional impact on GPI-anchored proteins. *Clin Genet*. 2021;100(5):607–14.
 38. Tsumaki N, Tanaka K, Arikawa-Hirasawa E, Nakase T, Kimura T, Thomas JT, et al. Role of CDMP-1 in skeletal morphogenesis: promotion of mesenchymal cell recruitment and chondrocyte differentiation. *J Cell Biol*. 1999;144(1):161–73.
 39. Martinez-Duncker I, Dupré T, Piller V, Piller F, Candelier J-J, Trichet C, et al. Genetic complementation reveals a novel human congenital disorder of glycosylation of type II, due to inactivation of the Golgi CMP–sialic acid transporter. *Blood*. 2005;105(7):2671–6.
 40. Seo D, Kim D, Chae Y, Kim W. The ceRNA network of lncRNA and miRNA in lung cancer. *Genomics Inform*. 2020;18(4).
 41. Wang T, Guo H, Li Q, Wu W, Yu M, Zhang L, et al. The AMPK-HOXB9-KRAS axis regulates lung adenocarcinoma growth in response to cellular energy alterations. *Cell Rep*. 2022;40(8):111210.
 42. Dimitri P, Habeb AM, Garbuz F, Millward A, Wallis S, Moussa K, et al. Expanding the clinical spectrum associated with GLIS3 mutations. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(10):E1362–9.
 43. Li AS, Pasricha MV, Mishra K, Nguyen QD, Beres SJ, Wood EH. CRB1-associated retinal dystrophy presenting as self-resolving opsoclonus and posterior uveitis. *Am J Ophthalmol Case Reports*. 2022;26:101444.
 44. Bailey SD, Xie C, Do R, Montpetit A, Diaz R, Mohan V, et al. Variation at the NFATC2 locus increases the risk of thiazolidinedione-induced edema in the Diabetes REduction Assessment with ramipril and rosiglitazone Medication (DREAM) study. *Diabetes Care*. 2010;33(10):2250–3.
 45. Hamdan FF, Myers CT, Cossette P, Lemay P, Spiegelman D, Laporte AD, et al. High rate of recurrent de novo mutations in developmental and epileptic encephalopathies. *Am J Hum Genet*. 2017;101(5):664–85.
 46. Romoli M, Mazzocchetti P, D'Alonzo R, Siliquini S, Rinaldi VE, Verrotti A, et al. Valproic acid and epilepsy: from molecular mechanisms to clinical evidences. *Curr Neuropharmacol*. 2019;17(10):926–46.
 47. Lu X, Zhang Y, Chen L, Wang Q, Dong C, Qi Y, et al. Whole exome sequencing identifies SCD5 as a novel causative gene for autosomal dominant nonsyndromic deafness. *Eur J Med Genet*. 2020;63(5):103855.
 48. Fabczak H, Osinka A. Role of the novel Hsp90 co-chaperones in dynein arms' preassembly. *Int J Mol Sci*. 2019;20(24):6174.
 49. Yilmaz S, Uludağ Alkaya D, Kasapçopur Ö, Barut K, Akdemir ES, Celen C, et al. Genotype–phenotype investigation of 35 patients from 11 unrelated families with

- camptodactyly–arthropathy–coxa vara–pericarditis (CACP) syndrome. *Mol Genet genomic Med.* 2018;6(2):230–48.
50. Kean CM, Tracy CJ, Mitra A, Rahat B, Van Winkle MT, Gebert CM, et al. Decreasing Wapl dosage partially corrects embryonic growth and brain transcriptome phenotypes in Nipbl+/- embryos. *Sci Adv.* 2022;8(48):eadd4136.
 51. Castiglioni S, Di Fede E, Bernardelli C, Lettieri A, Parodi C, Grazioli P, et al. KMT2A: Umbrella Gene for Multiple Diseases. *Genes (Basel).* 2022;13(3):514.
 52. Blaydon DC, Biancheri P, Di W-L, Plagnol V, Cabral RM, Brooke MA, et al. Inflammatory skin and bowel disease linked to ADAM17 deletion. *N Engl J Med.* 2011;365(16):1502–8.
 53. Xing Q, Wang M, Chen X, Qian X, Qin W, Gao J, et al. Identification of a novel ADAR mutation in a Chinese family with dyschromatosis symmetrica hereditaria (DSH). *Arch Dermatol Res.* 2005;297(3):139–42.
 54. Hu H, Kahrizi K, Musante L, Fattahi Z, Herwig R, Hosseini M, et al. Genetics of intellectual disability in consanguineous families. *Mol Psychiatry.* 2019;24(7):1027–39.
 55. Ochneva A, Zorkina Y, Abramova O, Pavlova O, Ushakova V, Morozova A, et al. Protein Misfolding and Aggregation in the Brain: Common Pathogenetic Pathways in Neurodegenerative and Mental Disorders. *Int J Mol Sci.* 2022;23(22):14498.
 56. Shiels A. TRPM3_miR-204: a complex locus for eye development and disease. *Hum Genomics.* 2020;14(1):1–24.
 57. Preising MN, Görg B, Friedburg C, Qvarthava N, Budde BS, Bonus M, et al. Biallelic mutation of human SLC6A6 encoding the taurine transporter TAUT is linked to early retinal degeneration. *FASEB J.* 2019;33(10):11507–27.
 58. González-Mariscal I, Martin-Montalvo A, Vazquez-Fonseca L, Pomares-Viciano T, Sánchez-Cuesta A, Fernández-Ayala DJ, et al. The mitochondrial phosphatase PPTC7 orchestrates mitochondrial metabolism regulating coenzyme Q10 biosynthesis. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Bioenergetics.* 2018;1859(11):1235–48.
 59. Roux KJ, Kim DI, Raida M, Burke B. A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J Cell Biol.* 2012;196(6):801–10.
 60. Niethamer TK, Larson AR, O'Neill AK, Bershteyn M, Hsiao EC, Klein OD, et al. EPHRIN-B1 mosaicism drives cell segregation in craniofrontonasal syndrome hiPSC-derived neuroepithelial cells. *Stem cell reports.* 2017;8(3):529–37.
 61. Jin SC, Dong W, Kundishora AJ, Panchagnula S, Moreno-De-Luca A, Furey CG, et al. Exome sequencing implicates genetic disruption of prenatal neuro-gliogenesis in sporadic congenital hydrocephalus. *Nat Med.* 2020;26(11):1754–65.
 62. Lin J-R, Zeman MK, Chen J-Y, Yee M-C, Cimprich KA. SHPRH and HLTF act in a damage-specific manner to coordinate different forms of postreplication repair and prevent mutagenesis. *Mol Cell.* 2011;42(2):237–49.
 63. Mignarri A, Rubegni A, Tessa A, Stefanucci S, Malandrini A, Cardaioli E, et al. Mitochondrial dysfunction in hereditary spastic paraparesis with mutations in DDHD1/SPG28. *J Neurol Sci.* 2016;362:287–91.
 64. Zhao L, Liu D, Ma W, Gu H, Wei X, Luo W, et al. Bhlhe40/Sirt1 axis-regulated mitophagy is implicated in all-trans retinoic acid-induced spina bifida aperta. *Front cell Dev Biol.* 2021;1025.
 65. Coan M, Rampioni Vinciguerra GL, Cesaratto L, Gardenal E, Bianchet R, Dassi E, et al. Exploring the role of fallopian ciliated cells in the pathogenesis of high-grade serous ovarian cancer. *Int J Mol Sci.* 2018;19(9):2512.
 66. Scheppach C. High-and low-conductance NMDA receptors are present in layer 4 spiny stellate and layer 2/3 pyramidal neurons of mouse barrel cortex. *Physiol Rep.*

- 2016;4(24):e13051.
67. Morisada N, Ioroi T, Taniguchi-Ikeda M, Juan Ye M, Okamoto N, Yamamoto T, et al. A 12p13 GRIN2B deletion is associated with developmental delay and macrocephaly. *Hum genome Var.* 2016;3(1):1–3.
 68. Hong L, Li N, Gasque V, Mehta S, Ye L, Wu Y, et al. Prdm6 controls heart development by regulating neural crest cell differentiation and migration. *JCI insight.* 2022;7(4).
 69. Billingsley G, Santhiya ST, Paterson AD, Ogata K, Wodak S, Hosseini SM, et al. CRYBA4, a novel human cataract gene, is also involved in microphthalmia. *Am J Hum Genet.* 2006;79(4):702–9.
 70. Cui H, Guo S, He H, Guo H, Zhang Y, Wang B. SASH1 promotes melanin synthesis and migration via suppression of TGF- β 1 secretion in melanocytes resulting in pathologic hyperpigmentation. *Int J Biol Sci.* 2020;16(7):1264.
 71. Chagas JAC, Soares MAKM, Franco LVR, Barros MH. Overexpression of MRX9 impairs processing of RNAs encoding mitochondrial oxidative phosphorylation factors COB and COX1 in yeast. *J Biol Chem.* 2022;298(8).
 72. Erhardt S, Zheng M, Zhao X, Le TP, Findley TO, Wang J. The Cardiac Neural Crest Cells in Heart Development and Congenital Heart Defects. *J Cardiovasc Dev Dis.* 2021;8(8):89.
 73. Núñez-Ollé M, Stracker TH, Gil-Gómez G. CCNO mutations in NPH? Aging (Albany NY). 2018;10(2):158.
 74. Unger N, Heim S, Hilger DI, Bludau S, Pieperhoff P, Cichon S, et al. Identification of phonology-related genes and functional characterization of Broca's and Wernicke's regions in language and learning disorders. *Front Neurosci.* 2021;15.
 75. Seveau S, Turner J, Gavrillin MA, Torrelles JB, Hall-Stoodley L, Yount JS, et al. Checks and balances between autophagy and inflammasomes during infection. *J Mol Biol.* 2018;430(2):174–92.
 76. El-Maadawy WH, Hassan M, Badawy MH, AbuSeada A, Hafiz E. Probenecid induces the recovery of renal ischemia/reperfusion injury via the blockade of Pannexin 1/P2X7 receptor axis. *Life Sci.* 2022;308:120933.
 77. Singh R, Cohen ASA, Poulton C, Hjortshøj TD, Akahira-Azuma M, Mendiratta G, et al. Deletion of ERF and CIC causes abnormal skull morphology and global developmental delay. *Mol Case Stud.* 2021;7(3):a005991.
 78. Hernandez MH, Bote V, Serra-LLovich A, Cendros M, Salazar J, Mestres C, et al. CES1 and SLC6A2 Genetic Variants As Predictors of Response To Methylphenidate in Autism Spectrum Disorders. *Pharmgenomics Pers Med.* 2022;951–7.
 79. Yan J-Z, Liu J-L, Li X-Z, Zhang Z-X, Liu R-B, Zhang C, et al. Effectiveness, Acceptability and Safety of Pharmaceutical Management for Combat-Related PTSD in Adults Based on Systematic Review of Twenty-Two Randomized Controlled Trials. *Front Pharmacol.* 2022;12:805354.
 80. Tábara LC, Al-Salmi F, Maroofian R, Al-Futaisi AM, Al-Murshedi F, Kennedy J, et al. TMEM63C mutations cause mitochondrial morphology defects and underlie hereditary spastic paraplegia. *Brain.* 2022;145(9):3095–107.
 81. Burns DT, Donkervoort S, Müller JS, Knierim E, Bharucha-Goebel D, Fageih EA, et al. Variants in EXOSC9 disrupt the RNA exosome and result in cerebellar atrophy with spinal motor neuronopathy. *Am J Hum Genet.* 2018;102(5):858–73.
 82. Regan P, Mitchell SJ, Kim S-C, Lee Y, Yi JH, Barbati SA, et al. Regulation of synapse weakening through interactions of the microtubule associated protein tau with PACSIN1. *J Neurosci.* 2021;41(34):7162–70.
 83. Viggiano D, Bruchfeld A, Carriazo S, de Donato A, Endlich N, Ferreira AC, et al.

- Brain dysfunction in tubular and tubulointerstitial kidney diseases. *Nephrol Dial Transplant*. 2022;37(Supplement_2):ii46–55.
84. Kim A, Knudsen JG, Madara JC, Benrick A, Hill TG, Kadir LA, et al. Arginine-vasopressin mediates counter-regulatory glucagon release and is diminished in type 1 diabetes. *Elife*. 2021;10:e72919.
 85. Zhang F, Chen JY. HOMER: a human organ-specific molecular electronic repository. In: *BMC bioinformatics*. Springer; 2011. p. 1–16.
 86. Guyenet PG, Stornetta RL, Bayliss DA. Central respiratory chemoreception. *J Comp Neurol*. 2010;518(19):3883–906.
 87. Yang L, Wang J, Gong X, Fan Q, Yang X, Cui Y, et al. Emerging Roles for LGR4 in Organ Development, Energy Metabolism and Carcinogenesis. *Front Genet*. 2021;12.
 88. Karimi K, Farid AH, Myles S, Miar Y. Detection of selection signatures for response to Aleutian mink disease virus infection in American mink. *Sci Rep*. 2021;11(1):1–13.
 89. Ngo CC, Massa HM, McMonagle BA, Perry CF, Nissen MD, Sloots TP, et al. Predominant Bacterial and Viral Otopathogens Identified Within the Respiratory Tract and Middle Ear of Urban Australian Children Experiencing Otitis Media Are Diversely Distributed. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;14.
 90. Dailey C, Oshodi RB, Boull C, Aggarwal A. Expanding the clinical spectrum of SOX18-related Hypotrichosis-lymphedema-telangiectasia-renal defect syndrome. *Eur J Med Genet*. 2022;104607.
 91. Miyamae M, Diamond I, Weiner MW, Camacho SA, Figueredo VM. Regular alcohol consumption mimics cardiac preconditioning by protecting against ischemia–reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci*. 1997;94(7):3235–9.
 92. Huttlin EL, Bruckner RJ, Paulo JA, Cannon JR, Ting L, Baltier K, et al. Architecture of the human interactome defines protein communities and disease networks. *Nature*. 2017;545(7655):505–9.
 93. Kjeldbjerg AL, Villesen P, Aagaard L, Pedersen FS. Gene conversion and purifying selection of a placenta-specific ERV-V envelope gene during simian evolution. *BMC Evol Biol*. 2008;8(1):1–11.
 94. Cai P, Lu Y, Yin Z, Wang X, Zhou X, Li Z. Trophinin is an important biomarker and prognostic factor in osteosarcoma: data mining from oncomine and the cancer genome atlas databases. *Biomed Res Int*. 2021;2021.
 95. Abghari FZ, Moradi Y, Akouchekian M. PTEN gene mutations in patients with macrocephaly and classic autism: A systematic review. *Med J Islam Repub Iran*. 2019;33:10.
 96. Aylward A, Cai Y, Lee A, Blue E, Rabinowitz D, Haddad Jr J, et al. Using whole exome sequencing to identify candidate genes with rare variants in nonsyndromic cleft lip and palate. *Genet Epidemiol*. 2016;40(5):432–41.
 97. Zhang L, Sun Z, Zhao P, Huang L, Xu M, Yang Y, et al. Whole-exome sequencing revealed HKDC1 as a candidate gene associated with autosomal-recessive retinitis pigmentosa. *Hum Mol Genet*. 2018;27(23):4157–68.
 98. Li J, Chen Z, Tian L, Zhou C, He MY, Gao Y, et al. LncRNA profile study reveals a three-lncRNA signature associated with the survival of patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Gut*. 2014;63(11):1700–10.
 99. Chen X, Chen Z, Yu S, Nie F, Yan S, Ma P, et al. Long Noncoding RNA LINC01234 Functions as a Competing Endogenous RNA to Regulate CBFβ Expression by Sponging miR-204-5p in Gastric Cancer Oncogenic Roles of LINC01234 in GC. *Clin Cancer Res*. 2018;24(8):2002–14.
 100. Jetten AM. GLIS1–3 transcription factors: critical roles in the regulation of multiple

- physiological processes and diseases. *Cell Mol Life Sci.* 2018;75(19):3473–94.
101. Mittal K, Choi DH, Klimov S, Pawar S, Kaur R, Mitra AK, et al. A centrosome clustering protein, KIFC1, predicts aggressive disease course in serous ovarian adenocarcinomas. *J Ovarian Res.* 2016;9(1):1–11.
 102. Vieceli Dalla Sega F, Fortini F, Severi P, Rizzo P, Gardi I, Cimaglia P, et al. Cardiac Calcifications: Phenotypes, Mechanisms, Clinical and Prognostic Implications. *Biology (Basel).* 2022;11(3):414.
 103. Wiecek S, Wojtyniak A, Pindur B, Machnikowska-Sokołowska M, Gruszczyńska K, Grzybowska-Chlebowczyk U. Analysis of the Clinical Course of Primary Sclerosing Cholangitis in Paediatric Population—Single Center Study. *Medicina (B Aires).* 2021;57(7):663.
 104. Li L, Yu J, Cheng S, Peng Z, Ben-David Y, Luo H. Transcription factor Fli-1 as a new target for antitumor drug development. *Int J Biol Macromol.* 2022;
 105. Zhang W, Yang S-L, Yang M, Herrlinger S, Shao Q, Collar JL, et al. Modeling microcephaly with cerebral organoids reveals a WDR62–CEP170–KIF2A pathway promoting cilium disassembly in neural progenitors. *Nat Commun.* 2019;10(1):1–14.
 106. Lattanzi R, Miele R. Versatile Role of Prokineticins and Prokineticin Receptors in Neuroinflammation. *Biomedicines.* 2021;9(11):1648.
 107. Silva LV de O, Hermont AP, Magnani IQ, Martins CC, Borges-Oliveira AC. Oral alterations in children with microcephaly associated to congenital Zika syndrome: A systematic review and meta-analyses. *Spec Care Dent.* 2022;
 108. Martins MM, Alves da Cunha AJL, Robaina JR, Raymundo CE, Barbosa AP, Medronho R de A. Fetal, neonatal, and infant outcomes associated with maternal Zika virus infection during pregnancy: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2021;16(2):e0246643.
 109. del Campo M, Feitosa IML, Ribeiro EM, Horovitz DDG, Pessoa ALS, França GVA, et al. The phenotypic spectrum of congenital Zika syndrome. *Am J Med Genet Part A.* 2017;173(4):841–57.
 110. Moore CA, Staples JE, Dobyns WB, Pessoa A, Ventura C V, da Fonseca EB, et al. Congenital Zika syndrome: characterizing the pattern of anomalies for pediatric healthcare providers. *JAMA Pediatr.* 2017;171(3):288.
 111. Aragón N, Díaz C, Contreras A. Dental, Occlusal, and Craniofacial Features of Children With Microcephaly Due to Congenital Zika Infection: 3 Cases Report From Valle del Cauca, Cali—Colombia—2020. *Cleft Palate-Craniofacial J [Internet].* 2021 Feb 10;58(10):1318–25. Available from: <https://doi.org/10.1177/1055665621990978>
 112. Andrade LM, Baker Meio MD, Gomes Jr SC, Souza JP, Figueiredo MR, Costa RP, et al. Language delay was associated with a smaller head circumference at birth in asymptomatic infants prenatally exposed to the Zika virus. *Acta Paediatr.* 2021;
 113. Candelo E, Sanz AM, Ramirez-Montaña D, Diaz-Ordoñez L, Granados AM, Rosso F, et al. A Possible Association Between Zika Virus Infection and CDK5RAP2 Mutation. *Front Genet.* 2021;12:530028.
 114. Calle-Giraldo JP, Rojas CA, Hurtado IC, Barco C, Libreros D, Sánchez PJ, et al. Outcomes of congenital Zika virus infection during an outbreak in Valle del Cauca, Colombia. *Pediatr Infect Dis J.* 2019;38(7):735–40.
 115. Moore CA, Staples JE, Dobyns WB, Pessoa A, Ventura C V, Fonseca EB da, et al. Characterizing the Pattern of Anomalies in Congenital Zika Syndrome for Pediatric Clinicians. *JAMA Pediatr [Internet].* 2017 Mar 1;171(3):288–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27812690>
 116. Reynolds MR, Jones AM, Petersen EE, Lee EH, Rice ME, Bingham A, et al. Vital Signs: Update on Zika Virus-Associated Birth Defects and Evaluation of All U.S. Infants with Congenital Zika Virus Exposure - U.S. Zika Pregnancy Registry, 2016.

- MMWR Morb Mortal Wkly Rep [Internet]. 2017 Apr 7;66(13):366–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28384133>
117. ARCHES B, POUCHES P. Embryology and Development of the Facial Skeleton. *Aesthetic Surg Facial Skeleton-e-b*. 2021;117.
 118. Bentes AA, Crispim APC, Marinho PES, Viegas ECC, Loutfi KS, Guedes I, et al. Neurologic Manifestations of Noncongenital Zika Virus in Children. *J Pediatr*. 2021;237:298–301.
 119. Shaily S, Upadhya A. Zika virus: Molecular responses and tissue tropism in the mammalian host. *Rev Med Virol*. 2019;29(4):e2050.
 120. Baggiani M, Dell'anno MT, Pistello M, Conti L, Onorati M. Human neural stem cell systems to explore pathogen-related neurodevelopmental and neurodegenerative disorders. *Cells*. 2020;9(8):1–31.
 121. Martínez CM, Cortina IR. Diabetes insipidus and Zika virus. *Rev Cuba Endocrinol*. 2020;31(3):1–9.
 122. Carod-Artal FJ. Neurological complications of Zika virus infection. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2018;16(5):399–410.
 123. Naveed M, Kazmi SK, Amin M, Asif Z, Islam U, Shahid K, et al. Comprehensive review on the molecular genetics of autosomal recessive primary microcephaly (MCPH). *Genet Res (Camb)*. 2018;100.
 124. Ribeiro RA, Mattos A, Meneghim MDC, Vedovello SAS, Borges TMD, Santamaria M. Oral and maxillofacial outcomes in children with microcephaly associated with the congenital Zika syndrome. *Eur J Orthod*. 2021;43(3):346–52.
 125. Shellard A, Mayor R. Chemotaxis during neural crest migration. In: *Seminars in cell & developmental biology*. Elsevier; 2016. p. 111–8.

6. Anexos

6.1 Bibliografía Complementaria

<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>

<https://www.wikipathways.org/index.php/WikiPathways>

<https://www.orpha.net>

<https://rarediseases.org>

6.2 Instrumento de recolección de datos

Recolección de datos desarrollo craneofacial en niños con infección

Se han guardado todos los cambios en Drive

Enviar

Preguntas Respuestas Configuración

Recolección de datos: "Características del desarrollo craneofacial y dental en pacientes de 3 a 5 años con Zika congénito en el Suroccidente Colombiano 2019-2021"

Descripción del formulario

Nombre completo del paciente

Fecha de respuesta corta

Número de identificación *

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
	Fecha respuesta	Nombre completo del paciente	Número de identificación	Tipo de identificación	Nombre completo de la madre	Nombre completo del padre	Fecha de la cita	Fecha de parto	Ciudad gestación
1	10/09/2020	10:45:41	Sandra Velazquez	1108421001 RC	Clara Corina Mesa	MA	20/10/2020	20/10/2016	
2	10/09/2020	10:45:41	Sandra Velazquez	1144200000 RC	Valentina Uribe Ospina		10/10/2020		
3	10/09/2021	10:48:00	Luzmila Delgado Perez	1202799020 RC	Viviana Perez		4/10/2020		
4	10/09/2021	10:48:09	Maria Solis	1191200000 RC	MD		20/10/2020		
5	10/09/2021	10:48:09	Sandra Velazquez	1109551001 RC	Clara Corina Mesa		10/10/2020		
6	10/09/2021	10:48:09	Thiago Martinez Gómez	1120279090 RC	Rhody andrea gomez mejia		27/9/2020		
7	10/09/2021	11:40:42	Sobrado Garcia	1110377204 RC	Solange		20/10/2020		
8	10/09/2021	12:44:15	Maria José Rivera Arismendi	1110379404 RC	Estefanía Arismendi		01/10/2020		
9	10/09/2021	13:03:07	Mullias Uribe	1144200000 RC	Valentina Uribe Ospina		10/10/2020		
10	10/09/2021	13:21:22	Ana Sofia Ochoa	1202799020 RC	Paula		01/10/2020		
11	10/09/2021	13:35:57	Gabriel Echeverri	1110379508 RC	nd		01/10/2020		
12	10/09/2021	13:53:11	Jorge Andres Velazquez	1104847010 RC	Johanna		10/11/2020		
13	10/09/2021	15:17:14	Mabel Hernandez	1111111111 SIN DATO	nd		01/10/2020		
14	10/09/2021	15:57:35	Robeth Chung	1109681005 RC	nd		20/10/2020		
15	20/09/2021	22:15:32	Enayit Salas Belandier	1202799020 RC	Yara Correa Becerra		4/10/2020		
16	20/09/2021	22:32:09	Ana Helen Isordia	1109681005 RC	Yarel barboza		4/10/2020		
17	20/09/2021	22:51:19	Jesus Antonio Herrera	1202799020 RC	Isabel gomez		20/10/2020		
18	20/09/2021	0:15:49	Maria Jose Luna	1109681005 RC	Adriana Luna Franco		20/10/2020		
19	20/09/2021	0:45:12	Sandra Solis	1109681005 RC	Laura Margarita Pacheco		20/10/2020		
20	20/09/2021	1:07:04	Angela Patricia Cardillo Lopez	1109681005 RC	Aracelly Lopez		20/10/2020		

Respuestas de formulario 1 10/1/2024 10:55:55

6.2 Aval del Comité de Ética

Comité Institucional de Revisión de Ética Humana
Facultad de Salud
Universidad del Valle

ACTA DE APROBACIÓN N° 010-2018

Proyecto: **INFECCIÓN CONGENITA POR VIRUS DEL ZIKA: EFECTOS EN EL DESARROLLO CRANEOFACIAL DE NIÑOS DEL VALLE DEL CAUCA Y CAUCA-COLOMBIA; Y SUS IMPLICACIONES EN LA REDUCCIÓN DEL RIESGO EN MUJERES EMBARAZADAS**

Presentado por: **NATALIA ARAGÓN VELEZ / ADOLFO CONTRERAS RENGIFO / BEATRIZ PARRA PATIÑO / JUAN FERNANDO ARIAS /**

Código Interno: **074-018** Fecha en que fue sometido: **21** Día, **5** Mes, **2018** Año

El Consejo de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle, ha establecido el Comité Institucional de Revisión de Ética Humana (CIREH), el cual está regido por la Resolución 008430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud; los principios de la Asamblea Médica Mundial expuestos en su Declaración de Helsinki de 1964, última revisión en 2002; y el Código de Regulaciones Federales, título 45, parte 46, para la protección de sujetos humanos, del Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos 2000.

Este Comité certifica que:

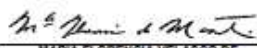
- Sus miembros revisaron los siguientes documentos del presente proyecto:

☒ Protocolo de investigación	☒ Instrumento de recolección de datos
☒ Formulario de consentimiento informado	☐ Soportes solicitados por el CIREH
☐ Cartas de las instituciones participantes	☐ Resultados de evaluación por otros comités (si aplica)
- El presente proyecto fue evaluado y aprobado por el Comité.
- Según las categorías de riesgo establecidas en el artículo 11 de la Resolución N° 008430 de 1993 del Ministerio de Salud, el presente estudio tiene la siguiente **Clasificación de Riesgo**:

☐ SIN RIESGO	☒ RIESGO MEDIO	☐ RIESGO MAYOR DEL MÍNIMO
-------------------------------------	--	--
- Las **medidas** que están siendo tomadas para proteger a los sujetos humanos son adecuadas.
- La forma de obtener el **consentimiento** informado de los participantes en el estudio es adecuada.
- Informará** inmediatamente a las directivas institucionales:
 - Todo deserción de los investigadores a las solicitudes del Comité.
 - Cualquier suspensión o terminación de la aprobación por parte del Comité.
 - Lesiones a sujetos humanos.
 - Problemas imprevistos que involucren riesgos para los sujetos u otras personas.
 - Cualquier cambio o modificación a este proyecto que no haya sido revisado y aprobado por el Comité.

Comité Institucional de Revisión de Ética Humana
Facultad de Salud
Universidad del Valle

- El presente proyecto ha sido **aprobado** por un periodo de un (1) año a partir de la fecha de aprobación. Los proyectos de duración mayor a un año, deberán ser sometidos nuevamente con todos los documentos para revisión actualizados.
- El **investigador principal** deberá informar al Comité:
 - Cualquier cambio que se proponga introducir en este proyecto. Estos cambios no podrán iniciarse sin la revisión y aprobación del Comité excepto cuando sean necesarios para eliminar peligros inminentes para los sujetos.
 - Cualquier problema imprevisto que involucre riesgos para los sujetos u otros.
 - Cualquier evento adverso serio dentro de las primeras 24 horas de ocurrido, al secretario(s) y al presidente.
 - Cualquier conocimiento nuevo respecto al estudio, que pueda afectar la tasa riesgo/beneficio para los sujetos participantes.
 - Cualquier decisión tomada por otros comités de ética.
 - La terminación prematura o suspensión del proyecto explicando la razón para esto.
 - El investigador principal deberá presentar un informe al final del año de aprobación. Los proyectos de duración mayor a un año, deberán solicitar la renovación del aval adjuntando los documentos solicitados por el CIREH.

Firma: 
Nombre: **MARIA FLORENCIA VELASCO DE MARTINEZ**
Capacidad representativa: **PRESIDENTE**
Fecha: **16** Día, **05** Mes, **2019** Año
Teléfono: **5185677**

6.3 Artículo publicado el 10 de febrero de 2021 en el American Cleft Palate-Craniofacial Association

Check for updates



Clinical Case Report

Dental, Occlusal, and Craniofacial Features of Children With Microcephaly Due to Congenital Zika Infection: 3 Cases Report From Valle del Cauca, Cali—Colombia—2020

The Cleft Palate-Craniofacial Journal
1-8
© 2021, American Cleft Palate-Craniofacial Association
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/105566621990978
journals.sagepub.com/home/cpc
SAGE

Natalia Aragón, DDS, MSc^{1,2}, Catalina Díaz, DDS, Pedodontist¹, and Adolfo Contreras, DDS, MSc, PhD^{1,2}

Abstract

Objective: Describes dental, occlusal, and craniofacial characteristics of 3 children aged 3 to 4 years with microcephaly due to congenital Zika infection in Cali Valle del Cauca, 2020.

Design: Three children case report with congenital Zika virus microcephaly.

Setting: Institutional

Patients: Three children with maternal viral infection confirmed by polymerase chain reaction during first trimester of pregnancy were included and were born from 2016 to 2017.

← → ↻ scientumciencias.gov.co/pub/index/#/revistas/homologadas/detalle/02045

Buscador Clasificación Histórico de revistas Registro de información Homologación Noticias		
Cleft Palate-Craniofacial Journal		
Calificación	Vigencia	Síres
A2	Ene 2021 - Dic 2021	Index MedicusIndex MedicusIndex MedicusJournal Citation Reports - JCR Journal Citation Reports - JCR Journal Citation Reports - JCR Journal Citation Reports - JCR Scimago Journal Rank - SJRScimago Journal Rank - SJRScimago Journal Rank - SJR
A1	Ene 2019 - Dic 2020	Journal Citation Reports - JCR Journal Citation Reports - JCR Journal Citation Reports - JCR Journal Citation Reports - JCR Scimago Journal Rank - SJRScimago Journal Rank - SJRScimago Journal Rank - SJR

Segundo artículo sometido: Revista Clinical Oral Investigations

Clinical Oral Investigations - Receipt of Manuscript 'Craniofacial and dental...'

Externo Σ Recibidos x



Clinical Oral Investigations <ninotimothy.garcia@springernature.com>

lun, 22 ago 2022, 12:40



para mí ▾

🌐 inglés ▾ > español ▾ Traducir mensaje

Desactivar para: inglés x

Ref: Submission ID 214d9389-45e7-4656-97a0-491a7745e5ba

Dear Dr Aragon,

Please note that you are listed as a co-author on the manuscript "Craniofacial and dental development in children aged 3-5 years with congenital Zika syndrome", which was submitted to Clinical Oral Investigations on 22 August 2022 UTC.

If you have any queries related to this manuscript please contact the corresponding author, who is solely responsible for communicating with the journal.

Kind regards,

Editorial Assistant

Clinical Oral Investigations

Categoría Q1 (2022)

6.4 Ponencias Nacionales



CERTIFICADO

La ponencia "*Microcefalia y su relación con agentes infecciosos neurotrópicos (TORCH y Zika): revisión de la literatura*" fue presentada en el VIII Encuentro Regional de Investigación Odontológica (Santiago de Cali, septiembre 10 y 11 de 2020)

Ponente: Sarah Figueroa Marín. CC. 1144071816

Coinvestigadores: Juan Pablo Moreno Varela, María Paula Reyes Duque, Adolfo Contreras, Adriana Jaramillo

23/6/2021

Correo de Universidad del Valle - Participación de la 2da Semana Internacional CT&I



NATALIA ARAGON VELEZ <natalia.aragon@correounivalle.edu.co>

Participación de la 2da Semana Internacional CT&I

13 mensajes

cienciatecnologiaeinnovacion@valledelcauca.gov.co
 <cienciatecnologiaeinnovacion@valledelcauca.gov.co>
 Para: natalia.aragon@correounivalle.edu.co

13 de marzo de 2021,
 0:34

Señor(a):

Natalia Aragón Vélez
 Universidad del Valle

Estimado. Ponente,

El Departamento del Valle del Cauca ha programado la 2da Semana Internacional de Competitividad, Ciencia, Tecnología e Innovación a realizarse del 15 y al 26 de marzo de 2021, de manera simultánea en la ciudad de Cali y los municipios de Cartago, Buga, Tuluá, Palmira y Buenaventura, Bolívar, La Unión, Obando, Caicedonia, El Dovio, Sevilla, Candelaria, Pradera, Yumbo Yotoco, Calima Darién y Zarzal.

La temática del evento se enmarca en los siete focos estratégicos fundamentales para el desarrollo integral y sostenible del departamento del Valle del Cauca, establecidos en la Política Pública Departamental de Competitividad, Ciencia, Tecnología e Innovación: Biodiversidad, Agroindustria-agropecuaria, Energía, Logística y servicios, Salud, Educación y Turismo.

El propósito fundamental del evento es promover el intercambio y divulgación, en espacios académicos como foros, conferencias, seminarios, talleres; mediante encuentros de actores de las cuatro (4) hélice de ecosistema académicos, empresarios, servidores públicos y sociedad civil organizada de la esfera local regional, nacional e internacional.

Por tal motivo, oficializamos su participación virtual, que esta dirigida al Distrito Especial de Cali el Día: 26 de Marzo 2020, en el horario, Hora: 3:30.-4:00

La ponencia seleccionada fue:

Actividad: Desarrollo craneofacial en niños con infección congénita por Zika en el Valle del Cauca

Si requiere ampliación de la información o tiene dudas por favor comuníquese con sus contactos orientadores :Angelica Maria Tello Murillo; Telf 3182597528; correo: angematemu85@gmail.com

Igualmente es de suma importancia que realice su presentación en la plantilla de Power Point adjunta manteniendo la forma y estilo y la envíe más tardar el viernes 17 de Marzo a sus contactos orientadores.

Agradecemos su participación como actor del ecosistema de Ciencia, Tecnología e Innovación.

Atentamente,

Sandra de Las Lajas Torres Paz
 Subdirectora de estudios socioeconómicos Ciencia Tecnología e Innovación

Adjunto plantilla ponente y guía de ponente https://drive.google.com/file/d/1jcDyMwOZq25KUpq8AUt5GmIX8T1h_uHS/view?usp=sharing
<https://drive.google.com/file/d/1knYHAtGGYT-P0vz1buGbgDDahQURs1p/view?usp=sharing>



Trabajos >

Formatos >

Evaluaciones >

Descargar Excel Con todos mis trabajos

Trabajos registrados por mí

Mostrar 10 filas

Buscar:

Identificación del trabajo	Agenda	Ponentes	Evento	Opciones y Calificaciones
V80149-2051 - Células embrionarias NTERA2 como modelo para entender las secuelas del Zika congénito	Con Agenda 2022-10-19: 5:40 pm - 6:00 pm Salón 503, Escuela de Odontología Asistido	Natalia Aragón	XXIV SIMPOSIO DE INVESTIGACIONES DE LA FACULTAD DE SALUD, Consecuencias de la Pandemia "Una Mirada Global"	Ver Editar Desactivar

6.5 Premio Nacional



La Asociación Internacional para la Investigación en Odontología
División Colombia

Confiere el
PREMIO A LA MEJOR PROPUESTA Y AVANCE DE TESIS DOCTORAL

al trabajo titulado ***Desarrollo craneofacial de niños con Zika en el Valle del Cauca. UNIVERSIDAD DEL VALLE - CALI***, presentado por **Natalia Aragón, Catalina Díaz, y Adolfo Contreras**
UNIVERSIDAD DEL VALLE

En constancia se firma a los 5 días del mes de noviembre de 2021, en Bogotá D.C

Paula Alejandra Baldián
Paula Alejandra Baldián
Presidenta
IADR-División Colombia

Edgar O. Beltrán
Edgar O. Beltrán
Secretario Ejecutivo
IADR-División Colombia

6.6 Ponencias Internacionales


IADR
 International Association
 for Dental Research

VERIFICATION OF ATTENDANCE AND PRESENTATION

The International Association for Dental Research verifies that:

Natalia Aragón

attended the 2021 IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition,
July 21-24, 2021, and presented:

Oral and Craniofacial features in children with congenital ZIKV infection

ADA CERP® Continuing Education
Recognition Program

ADA CERP is a service of the American Dental Association to assist dental professionals in identifying quality providers of dental education. ADA CERP does not approve or endorse individual courses or instructors, nor does it imply acceptance of credit hours by boards of dentistry.

Concerns or complaints about a CE provider may be directed to the provider or to the Commission for Continuing Education Provider Recognition at ADA.org/CERP.

The International Association for Dental Research is an ADA CERP Recognized Provider.



Christopher H. Fox, D.M.D., D.H.Sc.
Chief Executive Officer, IADR/AADR


IADR
 International Association
 for Dental Research

VERIFICATION OF ATTENDANCE AND PRESENTATION

The International Association for Dental Research verifies that:

Natalia Aragón Velez

attended the 2022 IADR/APR General Session & Exhibition Virtual Experience,
June 20-25, 2022, and presented:

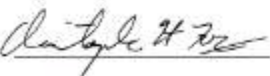
NTERA2: embryonic-cell model to study some congenital Zika features

ADA CERP® Continuing Education
Recognition Program

ADA CERP is a service of the American Dental Association to assist dental professionals in identifying quality providers of dental education. ADA CERP does not approve or endorse individual courses or instructors, nor does it imply acceptance of credit hours by boards of dentistry.

Concerns or complaints about a CE provider may be directed to the provider or to the Commission for Continuing Education Provider Recognition at ADA.org/CERP.

The International Association for Dental Research is an ADA CERP Recognized Provider.



Christopher H. Fox, D.M.D., D.H.Sc.
Chief Executive Officer, IADR/AADCR

----- Forwarded message -----

De: 2022 IADR/APR General Session & Exhibition <onbehalf@abstractcentral.com>

Date: mié., 26 de enero de 2022 8:57 p. m.

Subject: 2022 IADR/APR General Session Abstract Submitted (3723040)

To: <natalia.aragon@correounivalle.edu.co>

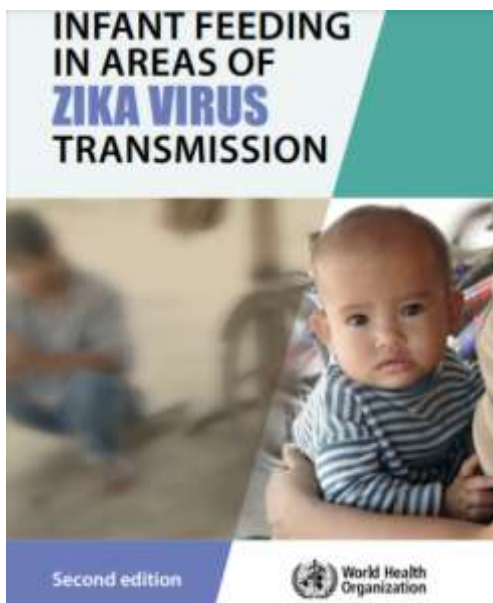
Wednesday, 26-Jan-2022

Dear Prof. Natalia Aragón,

You are receiving this notification because you have submitted an abstract for the 2022 IADR/APR General Session & Exhibition. Your abstract (ID#: 3723040) entitled, "NTERA2: embryonic-cell model to study some congenital Zika features," has been successfully submitted. Please retain a record of this message. Final decision and presentation status notifications for this abstract will only be sent to the designated Presenting Author of the abstract listed as:

Presenting Author: Prof. Natalia Aragón

6.7 Participación como revisora en una comunicación de la OMS



ANNEX 7. PEER REVIEWERS

Dr Natalia Aragon Velez

Universidad del Valle
Cali, Colombia

Dr Adriana Benavides

Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición en Salud (INCIENSA)
San Jose, Costa Rica

Dr Pierre Buekens

Center for Emerging Reproductive and Perinatal Epidemiology (CERPE), Tulane University
New Orleans, United States of America

Dr Erica Ota

St. Luke's International University
Tokyo, Japan

Ms Diana Valencia

United States Centers for Disease Control and Prevention
Atlanta, United States of America

Dr Stanley Zlotkin

Global Child Health, MIMIC4Life, Hospital for Sick Children, University of Toronto
Toronto, Canada

Note: The names and affiliations of peer reviewers are provided here as an acknowledgement and by no means indicate their endorsement of the recommendations in this guideline. The acknowledgement of the peer reviewers does not necessarily represent the views, decisions or policies of the institutions with which they are affiliated.

7. Material suplementario

Registro fotográfico. Imágenes: Fotografías y radiografías (de algunos casos) evaluados de niños con y sin SCZ.

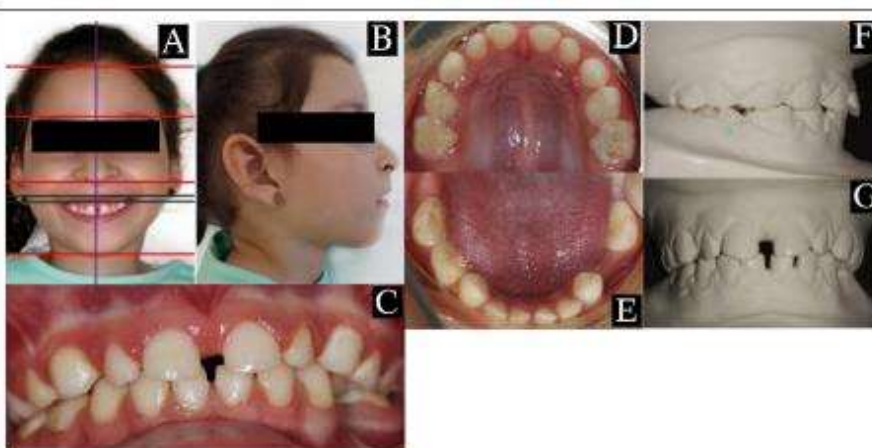
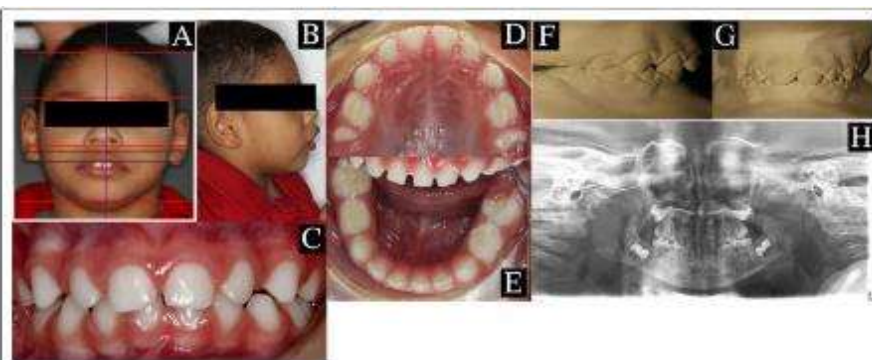
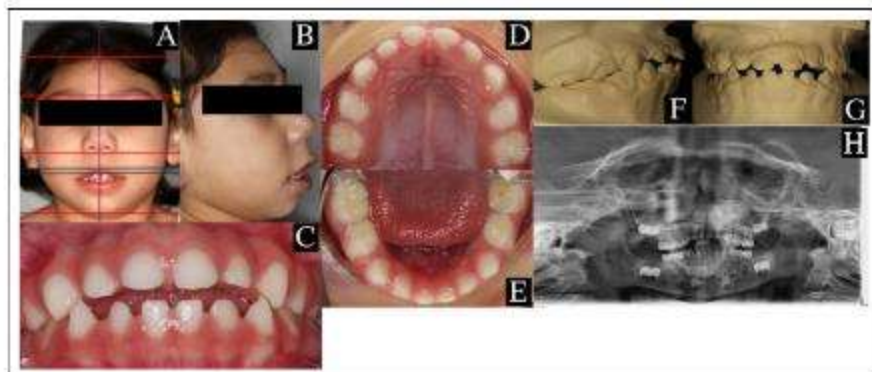






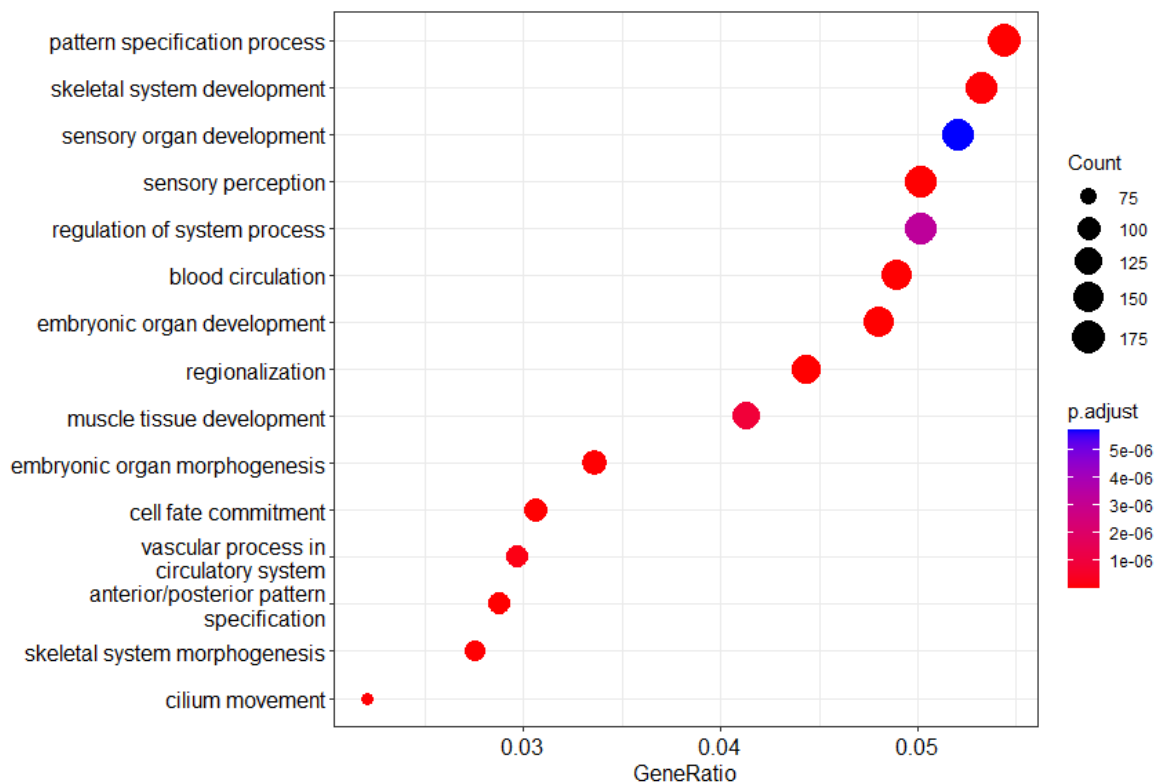
Figura Suplementaria 1.

Figura Suplementaria 1. Vías de enriquecimiento ($FDR > 2$ y $p < 0,05$) de **GOprocess** en células NT2 diferenciadas a linaje neural versus células NT-2 embrionarias pluripotenciales (**NRA-N**).

Figura Suplementaria 2.

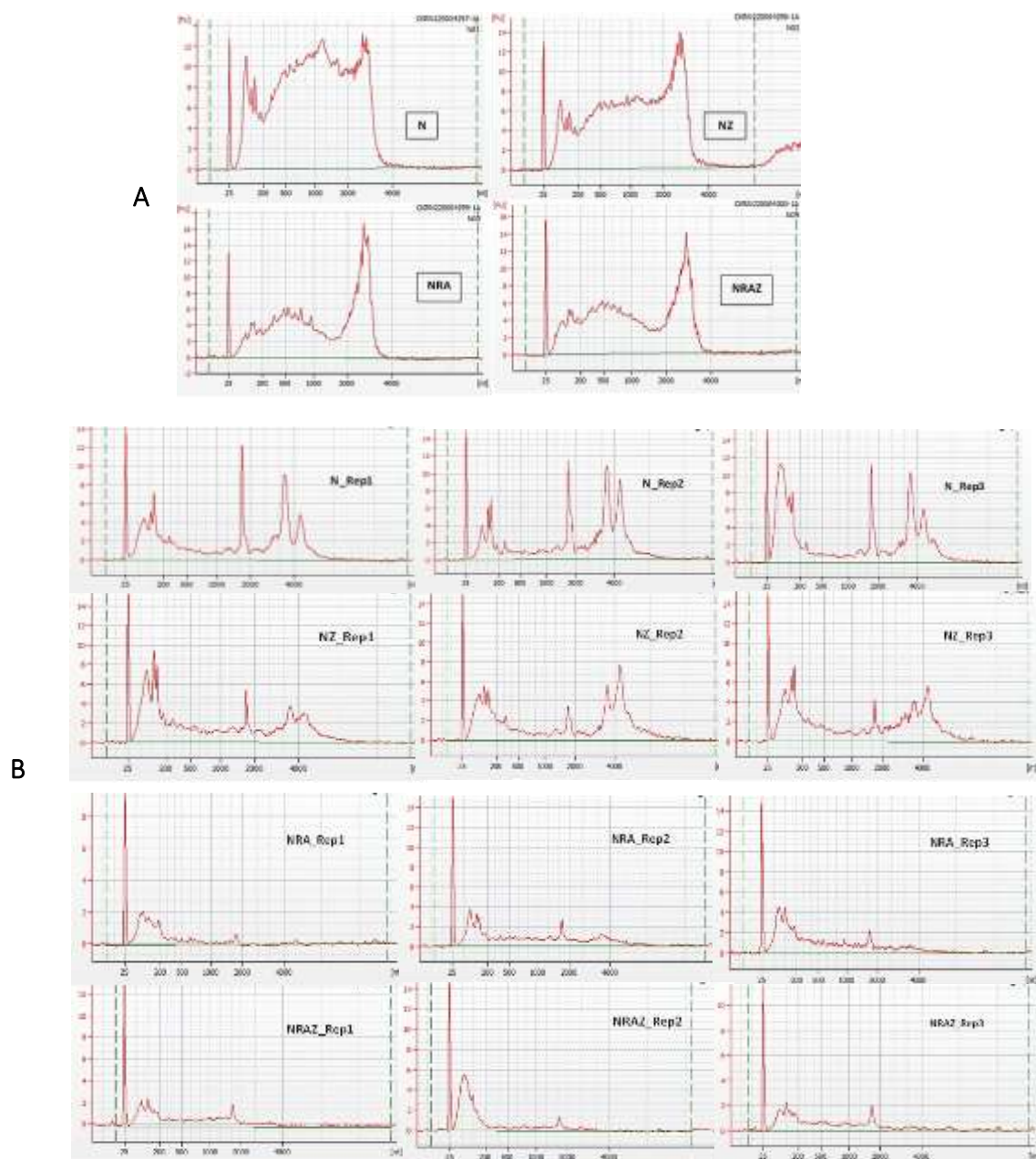


Figura Suplementaria 1. A: Curvas RIN del experimento piloto con muestras N-NZ-NRA-NRAZ. **B:** Curvas RIN del experimento con tras replicas biológicas de cada tipo de cultivo (Indiferenciadas= **N Rep 1,2,3**. Indiferenciadas infectadas= **NZ Rep 1,2,3**. Diferenciadas con AR= **NRA Rep 1,2,3**. Diferenciadas con AR infectadas= **NRAZ Rep1,2,3**.

Figura Suplementaria 3. Análisis de PCA, tres réplicas de cada experimento.

