



**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
del Instituto Politécnico Nacional**
Unidad Zacatenco

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias

COVID-19 apaga la expresión de claudina-5 y VE-cadherina en el endotelio de las vellosidades coriónicas y la decidua de la placenta humana

Biol. Sara Vega Torreblanca

Tesis para obtener el grado de

Maestría en Ciencias

En la especialidad de:

Fisiología Celular y Molecular

Director de la tesis:

Dra. Lorenza González Mariscal y Muriel

A mi familia:

*Mis padres Gerardo y Artemisa
Mis hermanas Sofía y Mariana*

A Jael Miranda, gracias por todo

A Carlos, Tere y Ofe

A Paris, Monina, Luna, Goliat, Kaffyh, Teo Claudino y Remi

Infinitas gracias por su cariño y apoyo

Este trabajo se realizó en el laboratorio 29 del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Cinvestav-IPN, bajo la dirección de la Dra. Lorenza González-Mariscal y Muriel, con la asesoría de la Dra. Guadalupe Estrada Gutierrez del Instituto Nacional de Perinatología y el Dr. Rubén Gerardo Contreras del Cinvestav. Se contó con una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt – número de CVU: 1008871).

Índice

Índice de abreviaturas	6
Resumen.....	8
Abstract	9
I. Introducción.....	10
1 SARS-CoV2.....	10
1.1 Origen.....	10
1.2 Características generales del virus SARS-CoV2	11
1.3 Mecanismo de Infección del SARS-CoV2.....	14
1.4 Receptores ACE-2.....	15
2 Cuadro clínico y estadísticas de la COVID-19.....	16
2.1 Transmisión viral.....	16
2.2 Síntomas	16
2.3 Población en riesgo.....	17
2.4 Estadística mundial y nacional actual	17
3 COVID-19 y embarazo	18
3.1 Cuadro clínico de la madre	18
3.2 Transmisión vertical del SARS-CoV2	20
4 Estructura placentaria.....	20
4.1 Citotrofoblasto y el sincitiotrofoblasto.....	21
4.2 Decidua	23
4.3 Vasos sanguíneos placentarios	23
5 Uniones estrechas y adherentes	24
5.1 Claudina 5.....	26
5.2 VE-cadherina	27
II. Justificación.....	28
III. Objetivo.....	29
IV. Hipótesis.....	29
V. Metodología.....	29
1 Selección de pacientes y obtención de muestras.....	29
2 Inmunofluorescencia	34

3 Obtención de las imágenes y análisis estadístico.....	35
VI. Resultados.....	35
1 La expresión de la claudina-5 disminuye en el endotelio de la decidua y de las vellosidades coriónicas de las placentas de las mujeres con COVID-19 severo	35
2 La expresión de la VE-cadherina disminuye en el endotelio de la decidua y de las vellosidades coriónicas de las placentas de las mujeres con COVID-19 severo	40
VII. Discusión	40
VIII. Conclusión.....	43
IX. Perspectivas.....	44
X. Referencias.....	44

Índice de abreviaturas

ACE-2	Enzima convertidora de angiotensina 2, del inglés Angiotensin Converting enzyme 2
COVID-19	Enfermedad por coronavirus 2019, del inglés Coronavirus Disease 2019
CTB	Citotrofoblasto
DSC	Células deciduales estromales
E	Proteína de la envoltura
ECL1	Asa extracelular 1, del inglés extracellular loop 1
ECL2	Asa extracelular 2, del inglés extracellular loop 2
ERGIC	Compartimiento intermedio de retículo-Golgi
HE	Proteína de la hemagglutinin-esterasa
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL-2	Interleucina 2
INPer	Instituto Nacional de Perinatología
JAM	Molécula de adhesión de las uniones, del inglés Junctional Adhesion Molecule
M	Proteína de la membrana
MAGI-1	Proteína MAGUK invertida 1, del inglés MAGUK inverted 1
MAGUK	Cinasa de guanilato asociada a la membrana, del inglés membrane associated guanylate kinase homologue
MERS-CoV	Síndrome respiratorio del Oriente Medio por coronavirus, del inglés Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus
MUPP1	Proteína con múltiples dominios PDZ 1, del inglés multi-PDZ domain protein 1
N	Proteína de la nucleocápside
Nsp	Proteínas no estructurales
Pals-1	Proteína asociada con LIN7 1, del inglés protein associated with LIN71
PATJ	Proteína de la unión estrecha asociada a Pals1, del inglés Pals1-associated tight junction protein

RBD	Dominio de unión al receptor, del inglés Receptor Binding Domain
S	Proteína de la espícula, del inglés Spike
S1	Subunidad 1 de la proteína S
S2	Subunidad 2 de la proteína S
SARS-CoV	Coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo, del inglés Severe acute respiratory syndrome coronavirus
SARS-CoV-2	Coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo 2, del inglés Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
SDRA	Síndrome de dificultad respiratoria aguda
STB	Sincitiotrofoblasto
TAMP	Proteína MARVEL asociada a la unión estrecha, del inglés TJ-associated MARVEL protein
TMPRSS2	Proteasa transmembranal/miembro 2 de la subfamilia serina, asociada al receptor ACE-2, del inglés Transmembrane protease/serine subfamily member 2
UA	Unión adherente
UE	Unión estrecha
uNK	Células asesinas naturales uterinas
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial, del inglés Vascular Endothelial Growth Factor
ZOs	Proteínas Zonula Occludens

Resumen

La COVID-19 es una enfermedad sistémica causada por el virus SARS-CoV2 que se originó en la ciudad de Wuhan, China y que ha alcanzado el rango de pandemia. Puede causar daño en varios tejidos, incluido el endotelio. Entre los grupos de riesgo de esta enfermedad se encuentran las mujeres embarazadas. Así, en el 2021 COVID-19 fue la primera causa de muerte materna en México e incrementó el porcentaje de niños prematuros. Como la COVID-19 daña al endotelio y genera un cuadro trombótico sistémico, en esta tesis se estudió su efecto sobre el endotelio placentario. En particular se evaluó la expresión de VE-cadherina y claudina-5 en el endotelio de la decidua y de las vellosidades coriónicas de mujeres con COVID-19 moderado y severo. Se encontró que ambas moléculas mantienen su expresión en el COVID-19 moderado en ambos tejidos, en cambio, en el cuadro severo la expresión de ambas proteínas disminuye significativamente tanto en la decidua como en las vellosidades coriónicas. Este efecto de la COVID-19 sobre el endotelio de la decidua y de las vellosidades coriónicas sugiere que la enfermedad severa genera un serio problema de perfusión fetal y materna dado que la VE-cadherina y la claudina-5 son proteínas de adhesión esenciales para la angiogénesis y el sellado de los vasos.

Abstract

COVID-19 is a systemic disease caused by the SARS-CoV2 virus that originated in the city of Wuhan, China and has reached pandemic status. It can cause damage to various tissues, including the endothelium. Pregnant women are among the high risk groups for this disease. Thus, in 2021 COVID-19 was the leading cause of maternal death in Mexico and increased the percentage of premature births. As COVID-19 damages the endothelium and generates a systemic thrombotic condition, in this thesis we studied the effect of this disease on the placental endothelium. In particular, we analyzed the expression of VE-cadherin and claudin-5 in the endothelium of the decidua and chorionic villi of women with moderate and severe COVID-19. We found that both molecules maintain their expression in the placental vessels of women with moderate COVID-19. However, in the severe condition the expression of VE-cadherin and claudin-5 decreases significantly both in the decidua and the chorionic villi. As VE-cadherin and claudin-5 are essential adhesion proteins for angiogenesis and vessel sealing, our results suggest that severe COVID-19 generates fetal and maternal malperfusion.

I. Introducción

En diciembre del 2019 en la ciudad de Wuhan, China, un grupo de pacientes presentó un cuadro de neumonía atípica. La mayoría de estos casos tenían en común el haber estado en el mercado de mariscos de la ciudad. Del tejido epitelial de las vías respiratorias de estos pacientes se aisló al virus causante de la enfermedad y por identidad genómica se encontró su parecido con el virus SARS-CoV (por las siglas en inglés de *Severe acute respiratory syndrome coronavirus*) de humanos. El nuevo virus se nombró SARS-CoV2 (Zhu et al., 2020) y la enfermedad por él producida se denominó COVID-19 (por las siglas en inglés de *Coronavirus Disease 2019*).

1 SARS-CoV2

1.1 Origen

SARS-CoV2, SARS-CoV y MERS-CoV (por las siglas en inglés de *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*), son coronavirus de origen zoonótico (Cui et al., 2019). Esto significa que pueden infectar a una nueva especie. Al respecto, la domesticación de animales de compañía o consumo, es relevante, ya que permite una mayor exposición a los patógenos de dichas especies, aumentando la probabilidad de que el patógeno infecte al humano.

Los murciélagos han sido vectores de transmisión de muchas especies virales a los humanos, utilizando en ocasiones a otras especies como intermediarios, principalmente a las domesticadas (Figura 1). Este fenómeno se ha identificado por la secuenciación de los genomas virales. En el caso de SARS-CoV2, se encontró que tiene una alta homología con el virus de murciélago BetaCoV/bat/Yunnan/RaTG13/2013 (Andersen et al., 2020), por lo que se propuso su transmisión de forma directa al humano. Sin embargo, la secuenciación del genoma viral reveló que contenía secuencias con un 91% de identidad a virus hallados en pangolines (Dimonaco & Salavati, 2021). Por ello, se hipotetiza, que el virus se originó en el murciélago, pero tuvo como intermediario al pangolín.

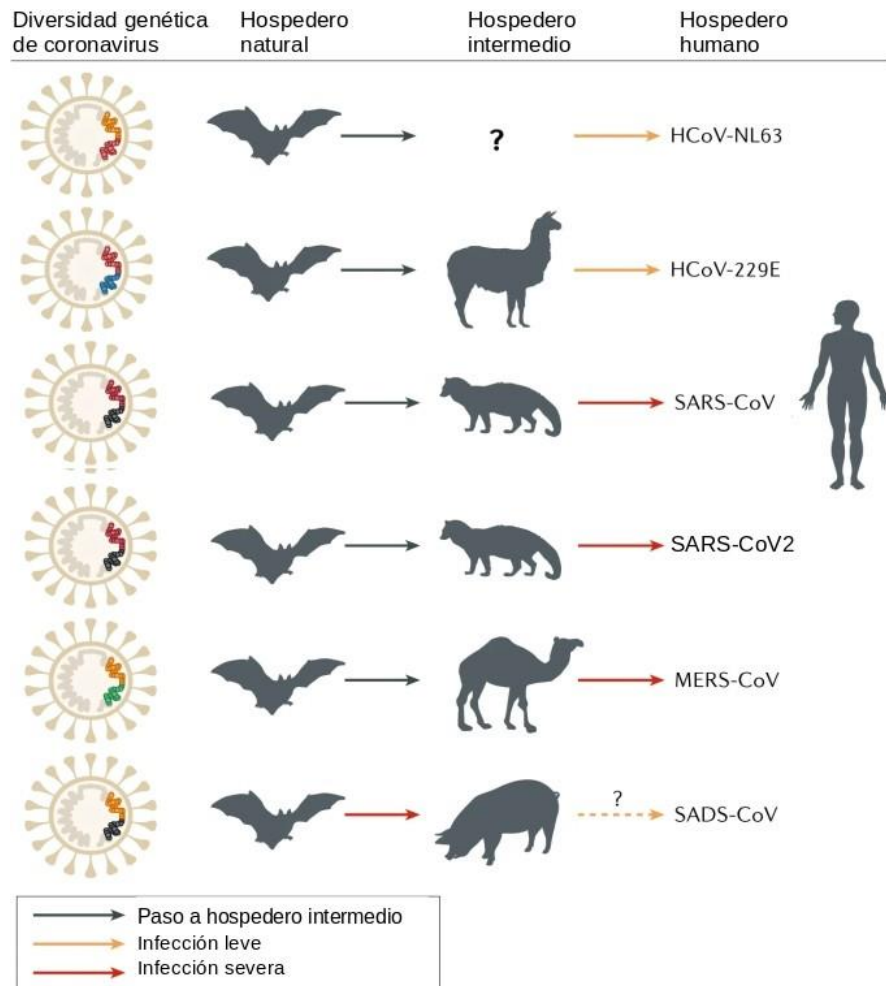


Figura 1. Diferentes virus de murciélagos transmitidos por zoonosis a humanos. En la primer columna se representan los genomas virales, en la segunda columna el hospedero original, en este caso el murciélago. En la tercer columna se representan los hospederos intermedios, mientras que en la última columna se muestran los virus resultantes de la zoonosis con capacidad de infectar al humano. Las flechas indican la dirección de la infección. Modificado de (Cui et al., 2019).

1.2 Características generales del virus SARS-CoV2

El SARS-CoV2 es un miembro de la familia *Coronaviridae* y la subfamilia *Orthocoronavirinae*, conocidos comúnmente como Coronavirus. El primer coronavirus descubierto fue el de la bronquitis infecciosa aviar, en 1937 por Fred Beaudette y Charles Hudson. Sin embargo, fue hasta 1967 en que June Almeida acuñó el término. Almeida y David Tyrrell obtuvieron imágenes por microscopía electrónica de cultivos

virales responsables de bronquitis humana y bronquitis infecciosa aviar, que revelaron que estos virus tienen una estructura circular con glicoproteínas que sobresalen de la superficie, a manera de corona, por lo que estos virus recibieron el nombre de coronavirus (Figura 2a) (Henry, 2020).

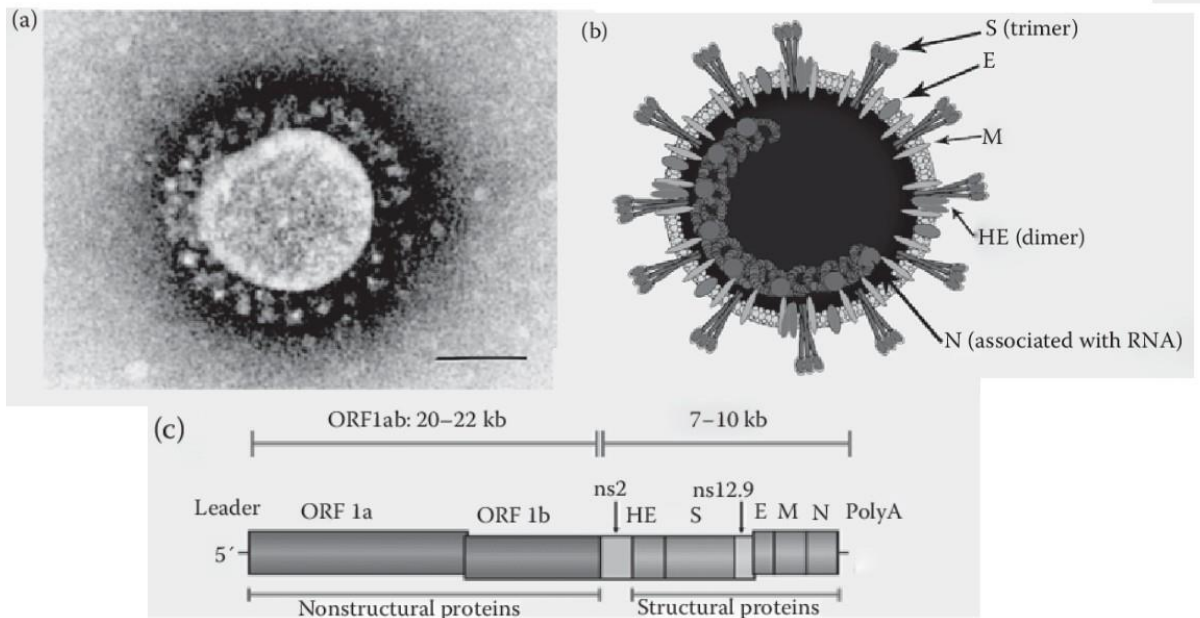


Figura 2. Vista general de los coronavirus. a) Microscopía electrónica de un coronavirus. b) Estructura general del coronavirus y sus proteínas estructurales: E, M, N, S, HE. c) Genoma de los coronavirus. En esta imagen además de observarse los sitios de codificación de las proteínas estructurales, se representan también las proteínas no estructurales del virus que le permiten la traducción y favorecen la infección (Sachan et al., 2021). ORF: Marco de lectura (Opening Read Frame); ns: proteínas no estructurales. Modificado de (Desforges et al., 2020).

Los coronavirus infectan a varias especies de aves y mamíferos, entre ellas a humanos, causando enfermedades gastrointestinales, respiratorias, hepáticas y neuronales (Weiss & Leibowitz, 2011; Wu et al., 2020). La subfamilia *Orthocoronavirinae* se divide en cuatro géneros: α , β , γ y δ . Los α y β coronavirus infectan únicamente a mamíferos y se asocian con enfermedades respiratorias en humanos y gastrointestinales en otros animales. Los γ y δ coronavirus infectan principalmente a aves, aunque algunos miembros del género pueden infectar a mamíferos (Cui et al., 2019). SARS-CoV2 pertenece al género β coronavirus, al tener

un 96% de identidad con el virus de murciélago BetaCoV/bat/Yunnan/RaTG13/2013, miembro de este mismo género (Nie et al., 2020).

Los coronavirus miden entre 60 y 140 nm de diámetro (Sharma et al., 2020). Su genoma es de los más grandes entre los virus de RNA, y está formado por RNA de cadena simple con dirección 5'→ 3', de aproximadamente 30 Kb (Figura 2c). Los coronavirus poseen una cantidad variable de proteínas no estructurales (Nsp) y de 4 a 5 genes que codifican para las proteínas estructurales S, M, E, N y HE (Figura 2b). La HE solo está presente en la subfamilia Betacoronavirus (Desforges et al., 2020). Las Nsp favorecen la infección al formar complejos que permiten la replicación y síntesis de los transcritos de las proteínas estructurales. El genoma del SARS-CoV2 contiene la información de 15 Nsp. Los genes pp1a y pp1ab codifican a las proteínas Nsp 1-11 y 1-16 respectivamente que conforman al complejo de replicación-transcripción que permite la síntesis de subgenomas que darán origen a las proteínas estructurales del virus (Karmakar et al., 2020).

La proteína espiga (S de *spike* en inglés) tiene un dominio transmembrana (Figura 2b), y su porción externa forma homotrimeros visibles por microscopía electrónica. La proteína S se integra por dos subunidades S1 y S2 que permiten al virus interactuar con los receptores celulares para llevar a cabo la infección (Cavanagh, 1995). La subunidad S1 contiene el dominio de unión al receptor RBD (por las siglas en inglés de *Receptor Binding Domain*), mientras que la S2 se une a la membrana (Naqvi et al., 2020). La proteína E de envoltura es una proteína estructural que se ancla a la membrana viral. Esta proteína es fundamental para el ensamblaje del virión y la forma final del mismo, pues cuando se muta pasa de redonda a alargada y comprimida (Liu et al., 2007). La proteína M de membrana, contiene tres dominios transmembrana e interactúa con todas las proteínas estructurales del virus. Esta interacción ayuda a mantener la forma de la envoltura viral. La proteína N de nucleocápside se asocia con el genoma viral y se organiza en una estructura helicoidal (Hogue & Machamer, 2014). La proteína HE de hemagglutinin-esterasa, tiene un dominio transmembrana, forma homotrimeros e interactúa con diferentes tipos de ácido salicílico, lo que se relaciona con la hemato-aglutinación (Weiss & Leibowitz, 2011).

Las cuatro proteínas estructurales del SARS-CoV2 S, M, E y N, tienen una alta homología (>90%) con las proteínas estructurales de MERS-CoV y el SARS-CoV (Naqvi et al., 2020), mientras que el dominio RBD tiene una homología del 91% con los coronavirus de pangolín (Dimonaco & Salavati, 2021).

1.3 Mecanismo de Infección del SARS-CoV2

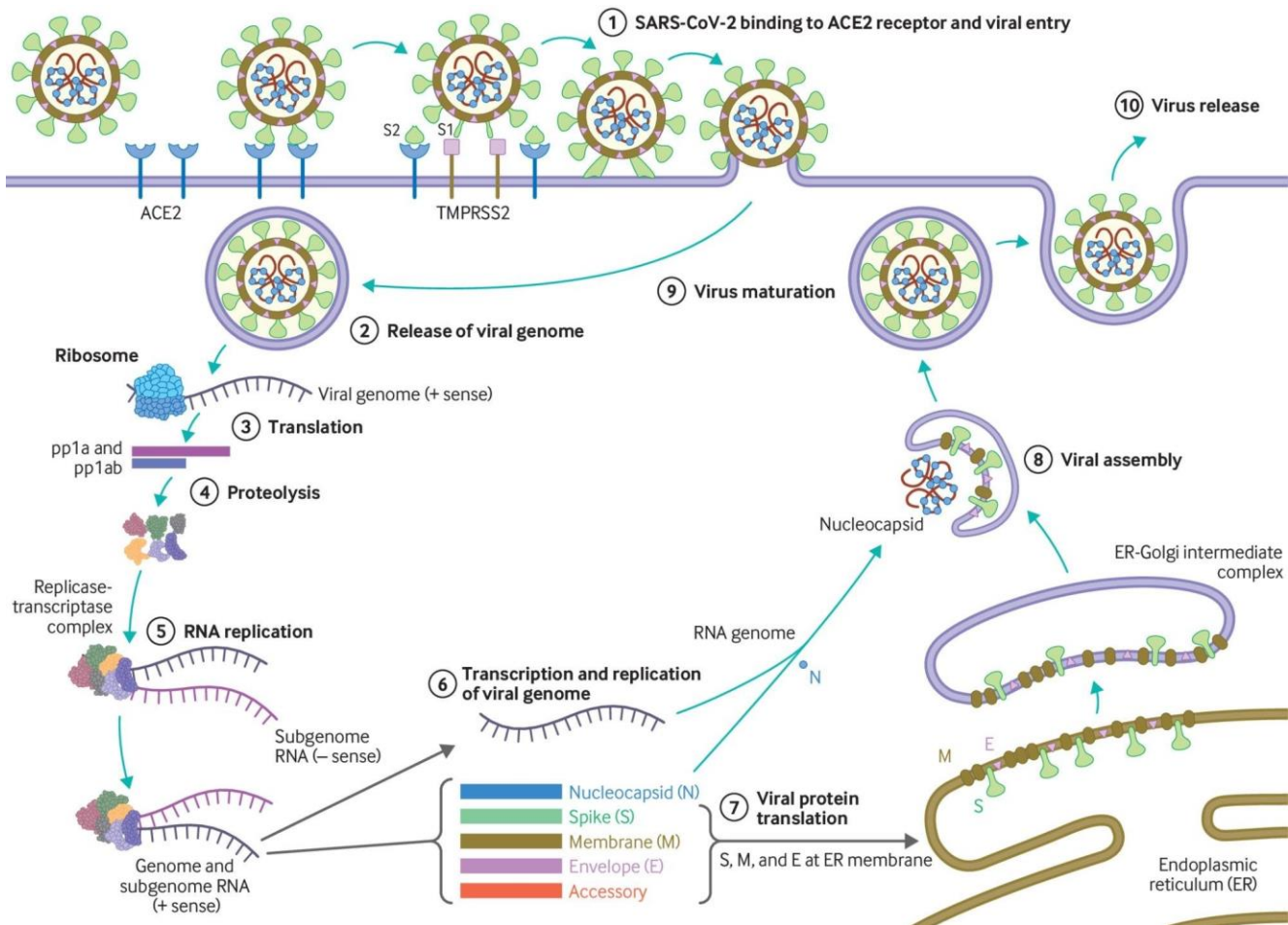


Figura 3. Ciclo de infección del SARS-CoV2. Primero, el virus reconoce al receptor ACE-2 y después de la acción de la proteasa TMPRSS2, ocurre la fusión de la membrana viral con la membrana celular. El genoma viral se libera en el citoplasma donde se traduce por la maquinaria celular, sintetizando un complejo de transcripción y replicación viral. El complejo sintetiza los transcritos de las proteínas virales estructurales que serán traducidos en el retículo, posteriormente serán transportados por la vía secretora retículo-Golgi, donde se ensamblarán. Finalmente los viriones serán transportados a la superficie celular donde se liberarán por exocitosis. Modificado de (Cevik et al., 2020)

La patogénesis del SARS-CoV2 comienza con la interacción de la proteína S viral con el receptor ACE-2 (por las siglas en inglés *Angiotensin Converting enzyme 2*) en las células del hospedero. El receptor ACE-2 se expresa abundantemente en las células epiteliales de pulmón y de intestino. La proteasa asociada al receptor ACE-2, TMPRSS2 (de las siglas en inglés *Transmembrane protease/serine subfamily member 2*) permite el anclaje del virión y la fusión de su membrana con la membrana celular (Sharma et al., 2020). Una vez que las membranas se fusionan, el RNA viral se libera en el citoplasma (Figura 3). Los transcritos virales se traducen en el retículo endoplásmico rugoso y se mueven a lo largo de la vía secretora atravesando el compartimiento intermedio de retículo-Golgi (ERGIC). En este punto la proteína S, después de ser glicosilada, forma trímeros y los viriones se ensamblan. Los nuevos viriones se transportan hacia la superficie celular en vesículas, y se liberan por exocitosis (Sachan et al., 2021).

1.4 Receptores ACE-2

El receptor ACE-2 es una enzima fundamental para la regulación de la presión sanguínea y el balance de electrolitos en los líquidos corporales. ACE-2 es un regulador negativo del sistema angiotensina-renina que transforma a la angiotensina II, un vasoconstrictor y factor proinflamatorio, en angiotensina 1-7, un vasodilatador. Esta transformación reduce la concentración de angiotensina II y contrarresta sus efectos con el aumento en la concentración de angiotensina 1-7 (Ragia & Manolopoulos, 2020). Además, ACE-2 facilita el transporte de aminoácidos a través de la membrana (Liu et al., 2020). El RNAm de ACE-2 se expresa en 72 tejidos humanos, incluidos pulmón, intestino, corazón, ojo, hígado, vejiga, riñón, páncreas, cerebro, próstata, testículos y placenta. La proteína ACE-2 se expresa principalmente en las células epiteliales alveolares tipo I y II de las vías respiratorias, así como en macrófagos, fibroblastos y células endoteliales del sistema respiratorio y del intestino delgado (Hamming et al., 2004; Zhao et al., 2020).

Una vez que la proteína S se ancla a ACE-2, el receptor se internaliza, generando un desequilibrio en el metabolismo de la angiotensina II, lo que daña a los

vasos sanguíneos pulmonares por la elevación de la presión sanguínea y la acción proinflamatoria (Lebeau et al., 2020).

2 Cuadro clínico y estadísticas de la COVID-19

2.1 Transmisión viral

Como otros coronavirus, el SARS-CoV2 se transmite de una persona infectada principalmente por gotas de saliva o de la mucosa nasal con un diámetro mayor a 5 µm, así como en aerosoles, por gotículas con un diámetro igual o menor a 5 µm. Cuando estas gotas se inhalan y transportan por el tracto respiratorio de una persona sana, el virus interactúa con los receptores ACE-2 de las células epiteliales, donde lleva a cabo su infección. La transmisión ocurre principalmente de persona a persona por contacto directo, en rangos menores a 2 m y por exposiciones breves, de 15 minutos aproximadamente (Cevik et al., 2020). También es posible la infección por contacto indirecto, cuando gotas con carga viral caen en las superficies de celulares, manijas o vasos de cristal (Harrison et al., 2020). Actividades como comer en proximidad, compartir dormitorio o espacios de trabajo con poca ventilación incrementan la probabilidad de contagio.

2.2 Síntomas

La incubación del virus es de 4-8 días posteriores a la infección (Han et al., 2020). Pasado el periodo de incubación comienzan a presentarse los síntomas, que varían según la intensidad de la enfermedad que puede ser leve, moderada ó grave. Los síntomas más comunes en un cuadro leve son: fiebre, fatiga, tos seca, dolor de garganta, estornudos y dolor muscular. A estos síntomas les siguen otros como escurrimiento nasal, dolor en la faringe y diarrea. Otros síntomas menos comunes son dolor de cabeza, anosmia y dolor abdominal (Cevik et al., 2020; Harapan et al., 2020). Una semana después de la aparición de los primeros síntomas, la enfermedad puede evolucionar a un cuadro grave con síntomas como disnea e hipoxemia. Si estos síntomas progresan derivarán en el síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA). Las personas con SDRA como su nombre lo indica, padecen dificultades serias para respirar y requieren del apoyo de un respirador. Posterior al SDRA se pueden presentar

un cuadro más grave que incluye choque séptico, acidosis metabólica y disfunción orgánica múltiple (Sachan et al., 2021).

2.3 Población en riesgo

El SARS-CoV2 infecta tanto a hombres como a mujeres en todos los rangos de edad y condición. Sin embargo, hay una incidencia mayor de 3:1 en hombres respecto a mujeres en todos los grupos de edad. La mortalidad referente al sexo es de 2.8% en hombres y 1.7% en mujeres (Lebeau et al., 2020; Tay et al., 2020). Dentro del grupo de individuos sanos, las personas mayores de 65 años y las mujeres embarazadas representan las poblaciones de mayor riesgo al contraer la enfermedad. Las personas con 65 años o más presentan un índice de mortalidad más elevado debido a la mayor incidencia de comorbilidades en esta población. Las comorbilidades suben el riesgo de complicación de la enfermedad, indistintamente de la edad. Algunas de las comorbilidades asociadas con la letalidad del virus son: enfermedades crónicas pulmonares, hepáticas, renales y cardiovasculares como la hipertensión; diabetes, cáncer, obesidad, tabaquismo, así como condiciones y tratamientos que comprometen la respuesta del sistema inmune (Sharma et al., 2020).

2.4 Estadística mundial y nacional actual

Según datos de la Universidad Johns Hopkins (<https://coronavirus.jhu.edu/map.html>) aproximadamente 186 millones de personas se han infectado con SARS-CoV2, mientras que 4 millones han perdido la vida por la enfermedad. Los países más afectados por la COVID-19 son Estados Unidos, India y Brasil, que encabezan los primeros lugares en número de infectados (33, 30 y 19 millones de casos respectivamente) y de defunciones (606, 405 y 531 mil casos). México ocupa el lugar número 15 en personas afectadas con 2.5 millones de casos y el cuarto lugar en defunciones con 234,907 casos. Según la información difundida por la Secretaría de Salud (<https://datos.covid-19.conacyt.mx/>), la incidencia de la enfermedad por sexo fue de 49.92% mujeres y 50.08% varones, el 81.2% de los casos fueron ambulatorios con enfermedad de leve a moderada, y solo el 18% de los enfermos presentaron una o varias comorbilidades (hipertensión 16.6%, obesidad 13.8%,

diabetes 12.7 %, tabaquismo 7.2%). El rango de edad de la población con mayor incidencia fue de 25 a 60 años, siendo mayormente casos ambulatorios. En cambio, la mayoría de los casos que requirieron hospitalización se encontraron en el rango de 65 años en adelante. El rango de edad con mayor número de defunciones es de 50 años en adelante. Las defunciones generadas por la COVID-19 tienen un fuerte sesgo hacia los varones con un 62.4%, contra un 37.5% de mujeres. El 91.5% de los casos de defunción requirieron hospitalización y el 46% presentó una o varias comorbilidades (hipertensión 44.7%, diabetes 36.9%, obesidad 21.6%, tabaquismo 7.5%).

Respecto a las de mujeres embarazadas en México, hasta julio de 2021 se reportaron 17,711 con la COVID-19, de las cuales 354 fallecieron. Así, esta enfermedad se convirtió en el 2020 en la primera causa de muerte materna en México (Coppel, 2021). La mayoría de las mujeres infectadas falleció durante el último trimestre del embarazo (33.1%) o durante el puerperio (33%), el 18.3% padecía de obesidad, 11.4% de diabetes, 8.8% hipertensión y 3% asma (Secretaría de Salud, 2021). El Instituto Nacional de Perinatología (INPer) reportó que la infección por SARS-CoV2 incrementó la hospitalización de los recién nacidos por periodos de 7 días o más, y el 44% de los bebés infectados requirieron este tipo de hospitalización, en comparación con el 14% de los bebés no infectados. Además de esto, los bebés infectados incrementaron en un 10% el ingreso a las unidades de cuidados intensivos y en 11% los casos de hipertensión pulmonar.

3 COVID-19 y embarazo

3.1 Cuadro clínico de la madre

El embarazo genera cambios en el sistema inmune, respiratorio y cardiovascular de las mujeres. Estos cambios podrían aumentar la susceptibilidad para desarrollar un cuadro grave de la COVID-19 (Dashraath et al., 2020). Entre los cambios más relevantes asociados al desarrollo de la enfermedad está el cambio de fenotipo de los linfocitos T CD4+ de Th2 característico de la respuesta a helmintos y alérgenos, a Th1 que liberan IL-2 e interferón γ . Además se observa la activación de macrófagos que matan a los microbios fagocitados. Este cambio promueve la respuesta humoral, es

decir, de anticuerpos sobre la respuesta celular mediada por los linfocitos T, lo que podría disminuir la reactividad del sistema a la infección viral (Wastnedge et al., 2021).

La Organización Mundial de la Salud en un estudio de cohorte de 147 mujeres embarazadas con COVID-19, reportó que el 8% presentó un cuadro moderado, 1% la enfermedad grave y en 1% fue letal. Esto sugiere que la mayoría de las mujeres embarazadas con COVID-19 presenta cuadros leves en comparación con el resto de la población general. En las mujeres sanas con un cuadro moderado se observó un porcentaje similar de ingreso a las unidades de cuidados intensivos que en la población general. Sin embargo, lo que sí aumentó fue el porcentaje de partos prematuros que pasó de 19.7% a 37.7% y las cesáreas que subieron de 45% a 76.3% (Matar et al., 2020; Wang et al., 2021). Así mismo, de acuerdo al Centro de Control y Prevención de Enfermedades de los EUA se presentó una proporción mayor (12.9%) de nacimientos prematuros en las mujeres infectadas con COVID-19 durante el embarazo en comparación con la población general (10.2%) (Woodworth et al., 2020). En otro estudio realizado a 836 recién nacidos con madres diagnosticadas con COVID-19, se encontró que el 22% de los partos habían sido prematuros. Estos partos prematuros se dieron únicamente en mujeres con cuadros moderados y graves (Kyle et al., 2020). La causa de esta complicación no es clara, pero es posible que sea resultado del SDRA, frecuente en los casos graves, y de otras complicaciones como resultado de la enfermedad e independientes del embarazo (Wang et al., 2021).

También se ha visto que las mujeres con COVID-19 presentan un síndrome semejante a la preeclampsia, con síntomas iguales y resultados histopatológicos semejantes (Mendoza et al., 2020). Este es un desorden exclusivo del embarazo humano que se caracteriza por un estado generalizado y sistémico de vasoconstricción, estrés oxidativo, microembolia y disfunción de las células endoteliales, que conduce a hipertensión y proteinuria después de las 20 semanas de gestación (El-Sayed, 2017). El síndrome en mujeres embarazadas con COVID-19 similar a preeclampsia se cree que se ocasiona por la piroptosis inducida por la replicación y liberación del virus SARS-CoV2 (Tay et al., 2020). La piroptosis es la muerte celular inflamatoria que ocurre por señales de daño celular o de patógenos (Cruz et al., 2020). En la preeclampsia temprana, la piroptosis induce la liberación de alarminas y debris placentario en la

circulación materna (Cheng et al., 2019). Esto genera trombosis, depósitos de fibrina en los vasos, cariorrexis vascular en las vellosidades coriónicas e infarto vellosa, lo que promueve la disfunción placentaria y la restricción del crecimiento fetal (Shanes et al., 2020; Staff et al., 2020).

Por otra parte, algunos síntomas de la COVID-19 de la madre pueden afectar al producto. La fiebre es uno de los síntomas más comunes y puede asociarse al aumento de anomalías congénitas, incluyendo defectos en el tubo neural y abortos espontáneos durante la organogénesis. El tratamiento de este síntoma no debe ser con antiinflamatorios no esteroideos, pues estos se asocian con abortos espontáneos en los primeros meses e hipertensión pulmonar fetal después de la semana 30 de gestación (Wang et al., 2021).

3.2 Transmisión vertical del SARS-CoV2

Desde el inicio de la epidemia hasta la actualidad no se han reportado un gran número de recién nacidos con COVID-19, comparado al número de mujeres embarazadas afectadas por la enfermedad, por lo que se piensa que es baja la capacidad del virus de ser transmitido verticalmente. Sin embargo, el genoma de SARS-CoV2 se ha detectado en el plasma del cordón umbilical, las placentas a término, la mucosa vaginal y la leche materna. Además se han encontrado anticuerpos IgM e IgG en el plasma de cordón umbilical y en muestras de leche. Estas evidencias demuestran que la transmisión vertical del virus si ocurre (Alzamora et al., 2020; Fenizia et al., 2020).

4 Estructura placentaria

La placenta permite el intercambio gaseoso, de nutrientes y la eliminación de los productos de desecho entre la madre y el feto. Protege contra agentes infecciosos e impide el rechazo del sistema inmunológico de la madre hacia el feto. Tiene además una función endócrina, ya que produce diversas hormonas fundamentales para la modulación del sistema inmune, así como el desarrollo del embrión, tales como: gonadotropina coriónica humana, estrógenos, progesterona y lactógeno placentario (Rodríguez-Cortés & Mendieta-Zerón, 2014).

La placenta a término tiene forma circular con un diámetro de 15 a 20 cm, un grosor de 5 cm y un peso de 500 a 600 g. Tiene dos caras, una de ellas, la fetal se caracteriza por el brillo que le otorga la membrana amniótica, que recubre toda su extensión incluyendo al cordón umbilical que se inserta en el centro de la placenta. Subyacente al amnios, en la lámina coriónica se distinguen los vasos sanguíneos que confluyen a nivel del cordón umbilical con dos arterias y una vena. La placenta se forma en las 3 primeras semanas de la gestación. Comienza su formación en el momento que el trofoblasto hace contacto con el endometrio. Posteriormente el trofoblasto invade al endometrio y prolifera en su interior destruyendo el tejido y formando las lagunas trofoblásticas (Figura 4) (Serna, 2013). Esta invasión da inicio a la formación de tres estructuras fundamentales de la placenta: el citotrofoblasto (CTB), la decidua y el sincitiotrofoblasto (STB).

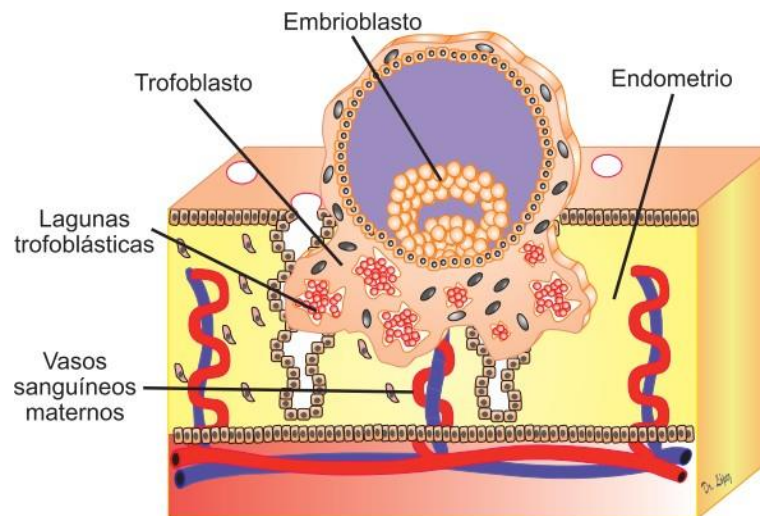


Figura 4. Formación de las primeras estructuras placentarias. Invasión del endometrio por el trofoblasto y formación de las lagunas trofoblásticas. Imagen tomada de (Serna, 2013).

4.1 Citotrofoblasto y el sincitiotrofoblasto

El desarrollo de la placenta humana depende de la diferenciación de las células del citotrofoblasto (CTB), las células epiteliales de la placenta. Este proceso ocurre por dos vías. En la primera las células del CTB se agregan en columnas que invaden el endometrio (Figura 5). Este fenómeno es esencial para anclar y sostener a la placenta.

Durante este proceso, las células del CTB invaden a las arterias espirales del útero y reemplaza al endotelio materno adoptando un fenotipo vascular. Esto permite que la sangre materna forme una gran laguna sanguínea, que baña al espacio intervelloso (Castellucci & Kaufmann, 2019). Esta ruptura del endotelio reduce la resistencia de las arterias. En la preeclampsia, esta invasión no se lleva a cabo eficientemente, lo que conduce a una inadecuada dilatación de las arterias espirales que lleva a isquemia placentaria y favorece la hipertensión sistémica (El-Sayed, 2017).

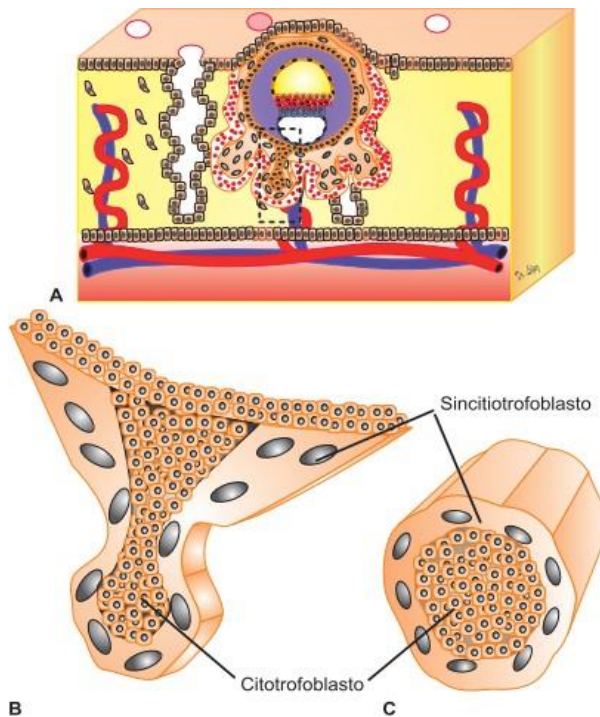


Figura 5. Vellosidades coriónicas A) Esquema que representa la formación de las vellosidades coriónicas. B) Corte longitudinal de la vellosidad. C) Esquema transversal de la vellosidad. Figura tomada de (Serna, 2013).

Por otro lado, las células del CTB que permanecen en el compartimento fetal se fusionan para formar una capa superficial de tejido sincitial conocido como sincitiotrofoblasto (STB) que cubre a las vellosidades coriónicas. Estas vellosidades están en contacto con la sangre materna presente en el espacio intervelloso y son las responsables del intercambio de gases y nutrientes con el feto.

Conforme avanza la gestación, las células del CTB de las vellosidades coriónicas entran en apoptosis dejando únicamente al STB como la capa epitelial de intercambio de nutrientes y desechos entre el tejido materno y fetal (Mori et al., 2007). El STB también funciona como el tejido endocrino de la placenta ya que sintetiza progesterona y gonadotropina coriónica humana. Esta última evita el reconocimiento del feto por los macrófagos del sistema inmune de la madre y favorece la diferenciación del CTB a células del STB (Carter, 1976).

4.2 Decidua

Las células del endometrio, inducidas por el efecto de la progesterona y el contacto del CTB se diferencian a células deciduales estromales (DSC), el principal componente de la decidua. Durante el embarazo, las DSC van muriendo por apoptosis, al mismo tiempo que se desarrollan otras estructuras de la placenta. La diferenciación y apoptosis de las DSC es crucial para que se produzca una invasión controlada del trofoblasto (Leno Durán, 2011).

Durante el proceso de decidualización hay un aumento de células del sistema inmune, con predominio de los leucocitos deciduales, cuya población está compuesta en un 70% de células naturales asesinas uterinas (uNK). En un ciclo menstrual normal, las uNK ayudan a la diferenciación y renovación del endometrio, mientras que en la decidualización regulan la invasión trofoblástica y la angiogénesis, desapareciendo gradualmente después de la semana 20 de gestación, y estando totalmente ausentes en la decidua a término. También hay macrófagos que constituyen el 20% del las células inmunitarias en el tejido, y cuya presencia se regula por estrógenos y progesterona. En cambio, los linfocitos T ocupan el 10% de la población leucocitaria total (Rodríguez-Cortés & Mendieta-Zerón, 2014).

4.3 Vasos sanguíneos placentarios

Al finalizar la segunda semana de gestación, el mesodermo corial extraembrionario invade el centro de las vellosidades coriónicas para formar los vasos sanguíneos fetales (Figura 6). En la tercera semana el mesodermo embrionario se diferencia en tejido conjuntivo y forma los vasos sanguíneos (Figura 6D). A partir de

esta etapa se establece el intercambio materno-fetal, los nutrientes que provienen de la sangre materna atraviesan la vellosidad coriónica para llegar a la sangre fetal. Para ello tienen que atravesar al: sincitiotrofoblasto, el citotrofoblasto, el tejido conjuntivo y el endotelio capilar (Figura 6D) (Serna, 2013).

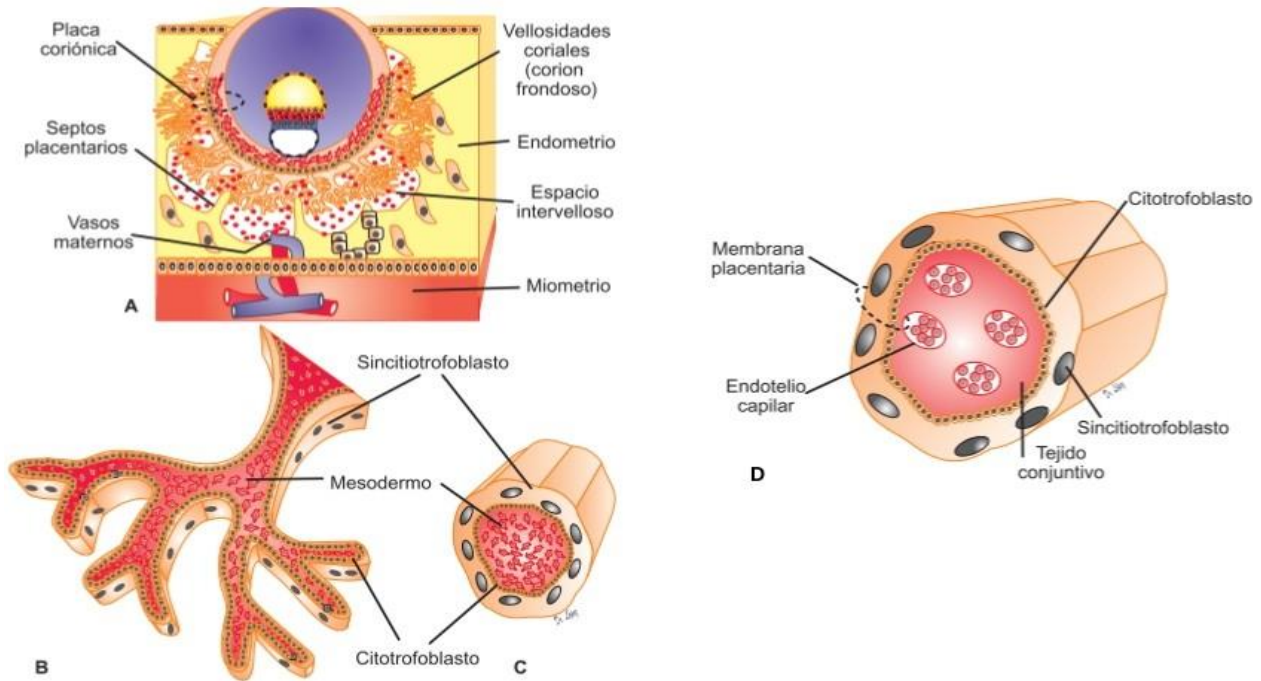


Figura 6. Formación de los vasos sanguíneos fetales. A) Corte placentario. B) Invasión del mesodermo fetal en el CTB. C) Corte transversal de una vellosidad coriónica. D) Diferenciación del mesodermo en endotelio y tejido conjuntivo. Imagen tomada de Serna, 2013

5 Uniones estrechas y adherentes

Las células epiteliales se encuentran polarizadas, es decir su membrana plasmática tiene dos regiones distintas bioquímica y funcionalmente, la región apical y la basolateral. La membrana de cada una de estas regiones tiene una composición particular de proteínas y lípidos que se encuentran delimitadas por las uniones estrechas (UE). Estas uniones funcionan como un regulador de la permeabilidad paracelular en los tejidos, ya que forman canales o barreras para el paso de iones y moléculas por el espacio lateral entre las células adyacentes (Diamond, 1977).

Las UE tienen además, una función de cerca, ya que evitan la libre difusión de las proteínas y lípidos en el plano de la membrana de la región apical a la basolateral y

viceversa. De esta manera las UE mantienen la polaridad epitelial (Cereijido et al., 1993).

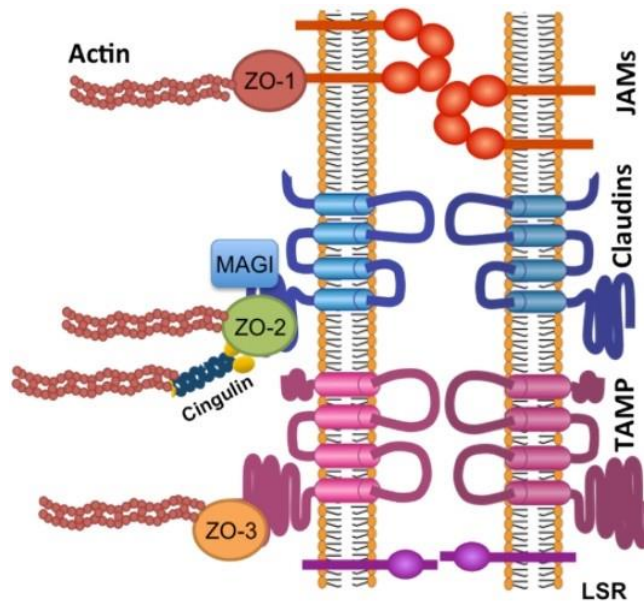


Figura 7. Composición de las uniones estrechas. El contacto inicial de dos células vecinas en la UE se establece por medio de las proteínas JAM y en caso de ser una unión tricelular por las angulinas (LSR). Posteriormente la interacción también se hace con las proteínas TAMPs y las claudinas. Estas proteínas integrales se asocian a las proteínas periféricas de la UE como ZO-1, ZO-2, ZO-3, MAGI y cingulina que a su vez interactúan con el citoesqueleto de actomiosina. Tomado de González-Mariscal et al., 2008).

Las UE se componen de proteínas transmembranales que en el espacio intercelular interactúan con las de la célula vecina, y proteínas periféricas que funcionan como un puente entre las proteínas transmembranales y el citoesqueleto de actina (Figura 7). Entre las proteínas periféricas destacan: las proteínas Zonula Occludens (ZO), las MAGI-1 (de las siglas en inglés de MAGUK inverted 1), afadina, MUPP1 (de las siglas en inglés de multi-PDZ domain protein-1), PATJ (de las siglas en inglés de Pals1-associated tight junction protein), Pals1 (de las siglas en inglés protein associated with LIN7 1), cingulina y paracingulina (González-Mariscal et al., 2003).

Entre las proteínas transmembranales se encuentran las proteínas JAM (de las siglas en inglés de Junctional Adhesion Molecule) con un solo pase transmembranal y dos regiones semejantes a IgG; las angulinas (LSR) con un solo pase transmembranal

y una región semejante a IgG (Furuse et al., 2014; Garrido-Urbani et al., 2014), la familia de las proteínas TAMP (de las siglas en inglés de *TJ-associated MARVEL Proteins*) con cuatro pasos transmembranales que incluye a ocludina, tricelulina y marvel D3, y las claudinas (Raleigh et al., 2010; Steed et al., 2009).

Las claudinas tienen cuatro pasos transmembranales y dos asas extracelulares asimétricas: la mayor ECL1 (de las siglas en inglés de *extracellular loop 1*) y la menor ECL2 que interactúan con otras claudinas (Furuse et al., 2014). La ECL1 contiene en su secuencia el motivo W-LW-C-C, que se conserva en todas las claudinas (Suzuki et al., 2014) así como aminoácidos con carga que determinan la selectividad iónica de la vía paracelular. En cambio la ECL2 regula la interacción en cis con otra claudina (Rossa et al., 2014). Se han identificado 27 claudinas diferentes (Mineta et al., 2011). Algunas como la 1,3 y 4 son ubicuas, mientras que otras son tejido-específicas como por ejemplo la claudina-5, característica del endotelio (Gonzalez-Mariscal et al., 2008; Suzuki et al., 2017).

Las uniones adherentes (UA) se encuentran justo por debajo de las UE en las células epiteliales. Estas uniones no son exclusivas de las células epiteliales y se encuentran también en otras células como los cardiomiocitos. Su función es regular la tensión y mantener la forma de las células. Su proteína transmembranal es la cadherina, una glicoproteína que requiere de calcio extracelular para activarse. La cadherina interactúa con otras cadherinas de la propia célula (interacción en cis) y de las células adyacentes (interacción en trans). Dependiendo del tejido, en las UA se expresan distintas cadherinas, la N en tejido neural, la E en tejido epitelial, la P en la placenta y la VE en el endotelio vascular. Las cadherinas se asocian en la cara citosólica a las cateninas y a la vinculina. Estas proteínas interactúan con los filamentos de actina que forman un anillo que rodea la región apical y mantiene la tensión celular. Las uniones adherentes también tienen una función de señalización. Así, por ejemplo, la β -catenina actúa como co-factor transcripcional de la vía de Wnt (Lodish et al., 2016).

5.1 Claudina-5

La claudina-5 se expresa intensamente en el endotelio y en menor medida en otros tejidos como el intestino delgado (Amasheh et al., 2005; Morita et al., 1999),

donde actúa como barrera al reducir la permeabilidad paracelular. La sobreexpresión de la claudina-5 en las células epiteliales aumenta la resistencia transepitelial y reduce la conductancia de cationes monovalentes (Wen et al., 2004). La claudina-5 es esencial para el desarrollo de la barrera hemato-encefálica ya que los ratones knockout de esta claudina presentan una barrera hemato-encefálica permeable y mueren rápidamente después del nacimiento (Nitta et al., 2003). En enfermedades como la de Crohn o síndromes como la preeclampsia, la expresión de la claudina-5 disminuye lo que aumenta la permeabilidad del epitelio o endotelio y disminuye la resistencia paracelular del tejido (Liévano et al., 2006; Zeissig et al., 2007).

5.2 VE-cadherina

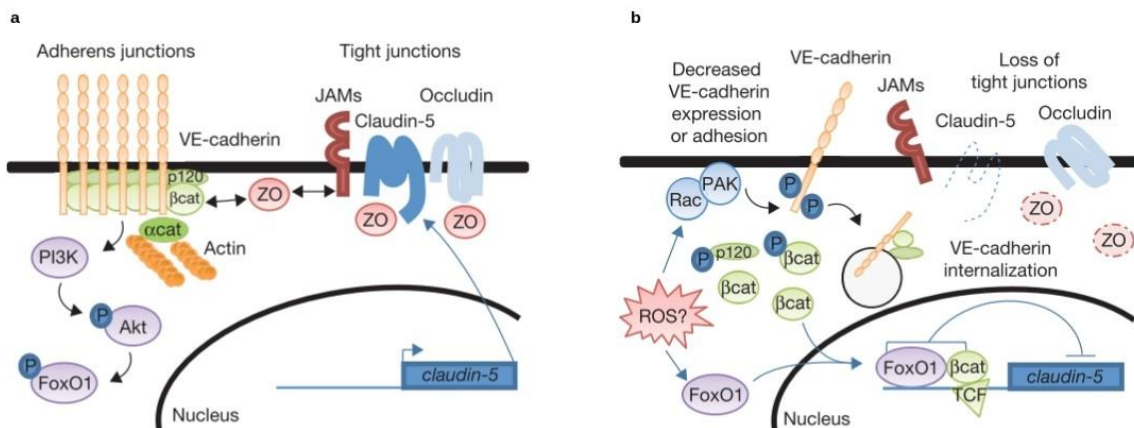


Figura 8. Regulación de la expresión de la claudina-5 por la VE-cadherina. a) La integridad del endotelio se mantiene gracias a la expresión de la VE-cadherina, que evita la acumulación citoplásmica de β-catenina y FoxO1, lo que permite la expresión de la claudina-5 y el mantenimiento de las UE. b) La internalización de la VE-cadherina favorece la formación del complejo represor FoxO1-β-catenina, que impide la transcripción de la claudina-5 lo que ocasiona la pérdida de las UE y la ruptura de la barrera endotelial. Imagen modificada de (Gavard & Gutkind, 2008).

La VE-cadherina regula la adhesión célula-célula en el endotelio por medio de interacciones homofílicas de su región extracelular, mientras que su región citosólica se

une a α , β y γ -cateninas (Conacci-Sorrell et al., 2002). La VE-cadherina es fundamental para la angiogénesis y la regulación de las UE del endotelio. El knockout de VE-cadherina en los ratones ocasiona defectos durante la angiogénesis que derivan en muerte fetal (Carmeliet et al., 1999). Durante la angiogénesis, el VEGF (por las siglas en inglés de *Vascular Endothelial Growth Factor*) induce la fosforilación e internalización de la VE-cadherina, lo que desestabiliza a las UA y aumenta la permeabilidad del endotelio (Lampugnani et al., 2006). Además de su función en la adhesión celular, la VE-cadherina regula la expresión de la claudina-5. Cuando la VE-cadherina se internaliza, aumenta la cantidad de β -catenina libre y del factor de transcripción FoxO1. Esto permite la formación del complejo β -catenina/FoxO1 que se transloca al núcleo, se une al promotor de claudina-5 y evita su transcripción, dando como resultado la pérdida de la barrera endotelial. En cambio, cuando la β -catenina está presente en las UA, se activa la vía PI3K, lo que conduce a la fosforilación de AKT que a su vez fosforila a FoxO1, lo que evita que este factor entre al núcleo y bloquee la transcripción de la claudina-5 (Figura 8) (Taddei et al., 2008).

II. Justificación

En el 2020 la causa número uno de muerte materna en México fue COVID-19, por arriba de la pre-eclampsia y la hemorragia en el parto. Así mismo, aumentó el número de cesáreas y partos prematuros a nivel mundial. Las manifestaciones clínicas de COVID-19 en las mujeres son diversas, y poco se sabe del impacto de la enfermedad en la fisiología de la placenta.

El virus SARS-CoV2 se detecta en la placenta y su receptor ACE2 está presente en diversas células placentarias incluyendo al endotelio. El SARS-CoV2 infecta a las células endoteliales del cuerpo provocando acumulación de células inflamatorias, trombosis, apoptosis y piroptosis. Ello podría explicar el síndrome de daño microvascular y la trombosis sistémica de los pacientes con COVID-19 severo.

La VE-cadherina y la claudina-5 son respectivamente, proteínas de las UA y UE de los endotelios, que permiten la adhesión célula-célula y la formación de la barrera paracelular endotelial, que evita la fuga del plasma de los vasos. Es importante analizar si la expresión de VE-cadherina y claudina-5 se altera en el endotelio de la decidua y

las vellosidades coriónicas de las placentas de mujeres con COVID-19, porque esto revelaría la existencia de un problema en la perfusión placentaria materna y fetal.

III. Objetivo

Analizar si la claudina-5 y la VE-cadherina del endotelio placentario disminuyen en placentas de mujeres con COVID-19.

IV. Hipótesis

Ya que el virus SARS-CoV2 infecta a los endotelios y su receptor ACE2 está presente en el endotelio placentario, es probable que disminuya la expresión de VE-cadherina y claudina-5 en el endotelio de la decidua y las vellosidades coriónicas de las mujeres con COVID-19, especialmente en aquellas con la forma severa de la enfermedad.

V. Metodología

1 Selección de pacientes y obtención de muestras

El grupo de pacientes a estudiar lo seleccionó un equipo interdisciplinario de gineco-obstetras, infectólogos e investigadores del INPer, que realizaron las pruebas descritas a continuación. El protocolo del estudio siguió la Declaración de Principios Éticos de Helsinki para la Investigación Médica con seres humanos. Se realizaron pruebas de RT-PCR (Protocolo La Charité/Berlin) a todas las mujeres embarazadas ingresadas al INPer para la detección del virus SARS-CoV2, aún en las mujeres asintomáticas. Tanto para las pacientes control, como las positivas a la COVID-19 se seleccionaron aquellas que no presentaron comorbilidades como preeclampsia y diabetes que se sabe afectan al endotelio. Las pacientes firmaron el consentimiento informado. El tejido placentario de 11 mujeres positivas a la COVID-19 que incluye a 5 con la patología moderada y 6 en el cuadro severo, y a 4 mujeres control, fue obtenido inmediatamente después del nacimiento efectuado por cesárea (Tablas 1-3). La prueba de RT-PCR para la detección del virus SARS-CoV2 se realizó en un fragmento disgregado del tejido placentario de cada una de las pacientes.

Tabla 1. Datos clínicos de las pacientes control y sus recién nacidos

	Cnt1	Cnt2	Cnt3	Cnt4
Edad de la madre	24	17	17	20
Comorbilidades de la madre	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Peso de la madre (kg)	SD	53.7	62.1	65
Altura de la madre (m)	SD	1.67	1.64	1.59
Edad gestacional al momento del diagnóstico (semanas)	13.6	38.1	40.2	30.3
Edad gestacional al momento del alumbramiento (semanas)	13.6	38.1	40.2	30.3
Tipo de nacimiento	Legrado	Cesárea	Cesárea	Cesárea
Peso del recién nacido (g)	SD	2315	3170	1320
Sexo del recién nacido	SD	M	F	F
Clasificación del peso del recién nacido	SD	PEG	AEG	AEG
Conteo de glóbulos blancos	7500	6600	10500	11300
Conteo de linfocitos (%)	9	15.1	10.1	9.8
Conteo de plaquetas	187000	236000	274000	167000
Tiempo de trombina (s)	11	9.5	10.9	10.8
Tiempo de protrombina (s)	26.9	24.9	36.2	29.6

Cnt, control; SD, sin datos; F, femenino; M, masculino; AEG, apropiado para la edad gestacional; PEG, pequeño para edad gestacional.

Tabla 2. Datos clínicos de las pacientes y sus recién nacidos con COVID-19 moderado

	mCV1	mCV2	mCV3	mCV4	mCV5
Edad de la madre	28	20	34	19	20
Comorbilidades de la madre	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Peso de la madre (kg)	0	65.4	93.7	75	57
Altura de la madre (m)	0	1.69	1.67	1.59	1.5
Fase de la COVID-19	Aguda	Aguda	Aguda	Aguda	Aguda
Prueba PCR de la madre	+	+	+	+	+
Prueba PCR del recién nacido-feto	+	+	+	+	+
Prueba PCR de la placenta	-	-	-	-	-
Síntomas de la COVID-19	Tos Dolor de cabeza	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno
Edad gestacional al momento del diagnóstico (semanas)	13	40.3	39.5	33.4	26.4
Edad gestacional al momento del alumbramiento (semanas)	13	40.4	39.5	33.5	26.6
Tipo de nacimiento	Legrado	Cesárea	Cesárea	Cesárea	Cesárea
Peso del recién nacido (g)	SD	3410	3615	1946	978
Sexo del recién nacido	SD	M	M	M	F
Clasificación del peso del recién nacido	SD	AEG	PEG	AEG	AEG

	mCV1	mCV2	mCV3	mCV4	mCV5
Conteo de glóbulos blancos	SD	8400	7900	10200	107700
Conteo de linfocitos (%)	SD	30.1	17	2.9	11
Conteo de plaquetas	SD	224000	208000	177000	341000
Tiempo de trombina (s)	SD	9.2	10.3	10.8	10.3
Tiempo de protrombina (s)	SD	29.8	23.8	28.6	30.4

mCV, COVID-19 moderado; SD, sin datos; F, femenino; M, masculino; AEG, apropiado para la edad gestacional; PEG, pequeño para edad gestacional; GEG, grande para edad gestacional.

Tabla 3. Datos clínicos de las pacientes y sus recién nacidos con COVID-19 severo

	sCV1	sCV2	sCV3	sCV4	sCV5	sCV6
Edad de la madre	37	25	25	37	36	39
Comorbilidades de la madre	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Peso de la madre (kg)	91	67	66	60	75.5	77.5
Altura de la madre (m)	1.65	1.55	1.6	1.5	1.6	1.64
Fase de la COVID-19	Aguda	Aguda	Aguda	Aguda	Aguda	Aguda
Prueba PCR de la madre	+	+	+	+	+	+
Prueba PCR del recién nacido-feto	-	-	-	-	-	-
Prueba PCR de la placenta	-	-	-	-	-	-
Síntomas de la COVID-19	Disnea mialgias diarrea artralgia	Tos fiebre disnea mialgia artralgia	Tos fiebre disnea mialgia artralgia	Tos fiebre mialgia artralgia	Tos fiebre disnea	Tos fiebre disnea

	sCV1	sCV2	sCV3	sCV4	sCV5	sCV6
		rinorrea	diarrea rinorrea			
Edad gestacional al momento del diagnóstico (semanas)	27.6	34.6	28	38	39.1	39.1
Edad gestacional al momento del alumbramiento (semanas)	27.6	34.6	28	38	39.1	39.1
Tipo de nacimiento	Cesárea	Cesárea	Cesárea	Cesárea	Cesárea	Cesárea
Peso del recién nacido (g)	1600	2200	1250	2640	2330	2900
Sexo del recién nacido	F	F	F	F	F	M
Clasificación del peso del recién nacido	AEG	AEG	AEG	AEG	PEG	AEG
Conteo de glóbulos blancos	11200	8900	16500	7600	9900	8800
Conteo de linfocitos (%)	16.3	9.5	4.7	24.2	24.1	24
Conteo de plaquetas	365000	218000	347000	327000	275000	232000
Tiempo de trombina (s)	10.8	9.6	10	10.9	13.6	16.4
Tiempo de protrombina (s)	30.8	30.7	22.6	21.5	24.7	23
Aspartato amino-transferasa (U/L)	28	48	28	22	10	28
Alanina amino-transferasa (U/L)	8	24	8	14	10	56
Creatinina (mg/dL)	0.52	1.14	0.53	0.6	0.49	0.64

	sCV1	sCV2	sCV3	sCV4	sCV5	sCV6
Fibrogeno (mg/dL)	681	485	856	479	498	601
Dímero-D (ng/mL)	1267	1346	1739	3500	5993	4716
Procalcitonina	0.12	1.72	0.28	1.18	0.02	0.05
Rayos X o tomografía	+	+	+	+	+	+
Intubación orotraqueal	+	-	+	-	-	-
Oxígeno suplementario	-	+	-	+	+	+

sCV, COVID-19 severo; SD, sin datos; F, femenino; M, masculino; AEG, apropiado para la edad gestacional; PEG, pequeño para edad gestacional; GEG, grande para edad gestacional.

2. Inmunofluorescencia

COVID-19 es una enfermedad infecciosa, por ello el tejido placentario se trabajó en un laboratorio con nivel de bioseguridad 3 (BSL3) del INPer. Allí se embebió el tejido placentario en bloques de parafina y después, se cortó en secciones de 1 μm de grosor. Las secciones se trasladaron al Cinvestav Zacatenco, donde se calentaron por 18 h a 60 °C, se desparafinaron en xileno (Cat. X3s-4; Fisher Scientific, Loughborough, Leicestershire, UK), y se rehidrataron en etanol al 100% (Cat. E-7023; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 90%, 70% y 50%. Para recuperar los epítopes las secciones se incubaron por 40 minutos en solución amortiguadora de citratos 10 mM a 95 °C. En seguida, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.2% por 10 minutos y se bloquearon con BSA (libre de IgG, Cat. 1331-A, Research Organics, Cleveland, OH, USA) por 1 hora. Posteriormente, las muestras se incubaron a 4 °C en una cámara húmeda con un anticuerpo policlonal de conejo contra claudina-5 (Cat. 34-1600, Invitrogen, Camarillo, CA, USA) y otro monoclonal de ratón contra VE-cadherina (Cat. sc-9989, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Se utilizaron anticuerpos de burro, acoplados a Alexa 647 contra IgG de ratón (Cat. A31571, Invitrogen) y conejo (Cat. A31573, Invitrogen). Los núcleos se detectaron con DAPI (Cat. 422801; Biolegend, San Diego, CA, USA). Para disminuir la autofluorescencia del tejido se añadió el sistema True

View™ (Cat. SP-8400, laboratorios Vector , Burlingame, CA, USA) antes del montaje final de los cortes.

3 Obtención de las imágenes y análisis estadístico

Las imágenes se obtuvieron en el microscopio confocal SP8 (Leica, Weitzlar, Germany). Se utilizó el software Fiji-ImageJ (Instituto Nacional de Salud Mental, Bethesda, MD, USA) para obtener los valores de intensidad de fluorescencia, y se evaluaron 3 campos aleatorios por condición experimental. Las figuras muestran imágenes representativas de esos campos.

Se realizaron pruebas de F con corrección de Welch para varianzas desiguales, seguidas por las pruebas de comparaciones múltiple de Bonferroni y Dunnet. Para el caso de la fluorescencia de la VE-cadherina en las vellosidades coriónicas, por tratarse de datos sin distribución normal, se usó la prueba de Kruskal-Wallis y su prueba de comparaciones múltiples.

VI. Resultados

1 La expresión de la claudina-5 disminuye en el endotelio de la decidua y de las vellosidades coriónicas de las placentas de las mujeres con COVID-19 severo

El análisis de las inmunofluorescencias no reveló cambios significativos en la expresión de la claudina-5 en la decidua (Figura 9 a,b) o las vellosidades coriónicas (Figura 10 a,b) en mujeres con el cuadro moderado de la COVID-19 respecto a las controles. En la mujeres con un cuadro severo de la enfermedad se observó una disminución significativa de la expresión de la claudina-5 tanto en la decidua (Figura 9 a,b) como en las vellosidades coriónicas (Figura 10 a,b). En el endotelio, la claudina-5 es fundamental para el sellado de las UEs (Morita et al., 1999). Por ello, estos resultados sugieren que en las mujeres con COVID-19 las UEs del endotelio decidual y las vellosidades coriónicas se vuelven permeables conforme aumenta la severidad de la enfermedad.

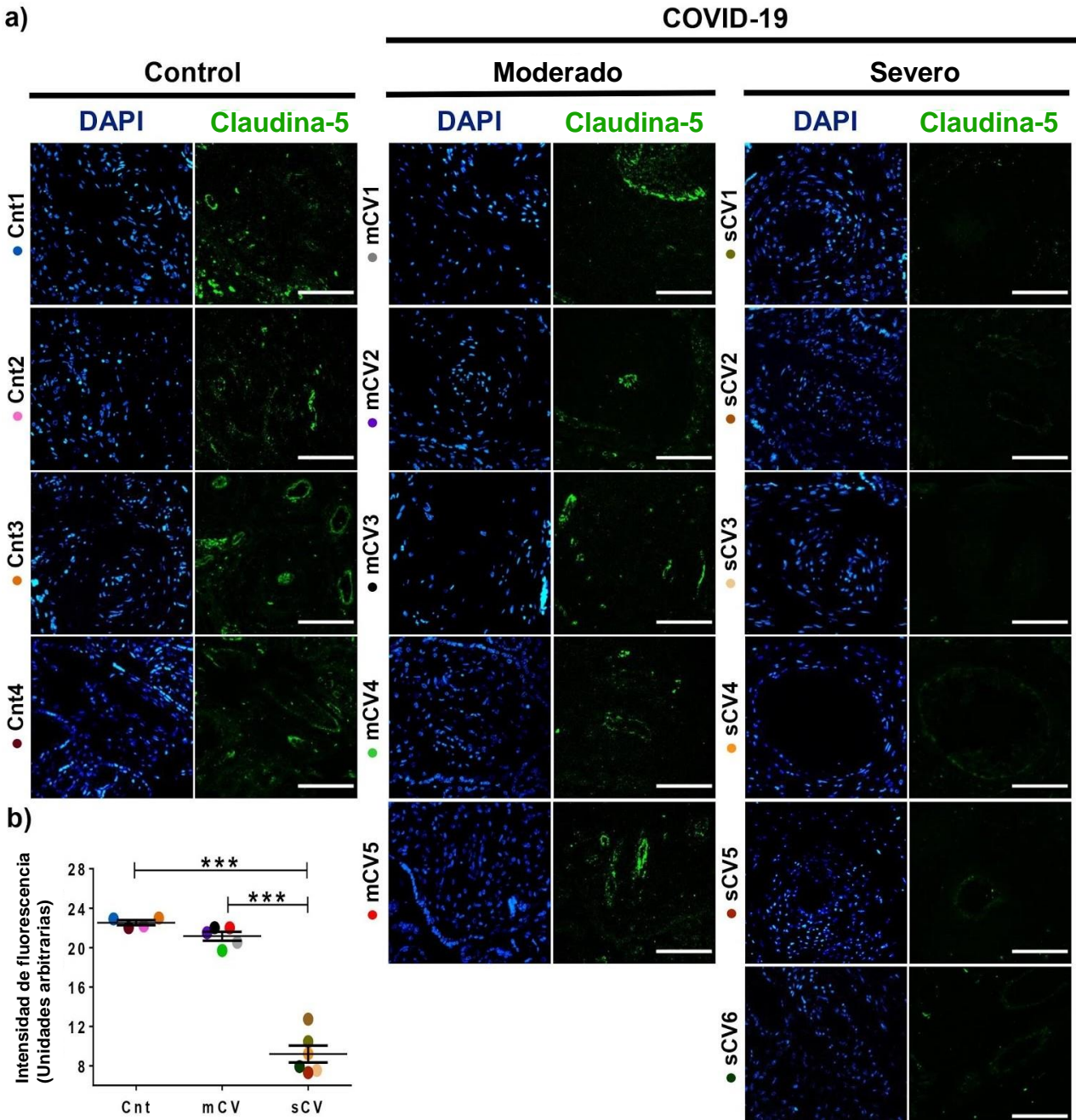


Figura 9. La expresión de claudina-5 disminuye en el endotelio de la decidua de mujeres con COVID-19 severo. Los bloques de parafina de las placentas de mujeres con COVID-19 y control se cortaron en secciones de 1 μ m, se desparafinaron y procesaron para inmunofluorescencia con anticuerpos contra la claudina-5. a) Imágenes representativas de la claudina-5 en la decidua. Núcleos teñidos en DAPI. Barra, 100 μ m. b) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia hecha en tres imágenes independientes de cada condición. Los datos se representan como media \pm DE. Prueba de F con corrección de Welch, seguida por las pruebas de comparaciones múltiples de Bonferroni y Dunnett, ***, $p < 0.001$

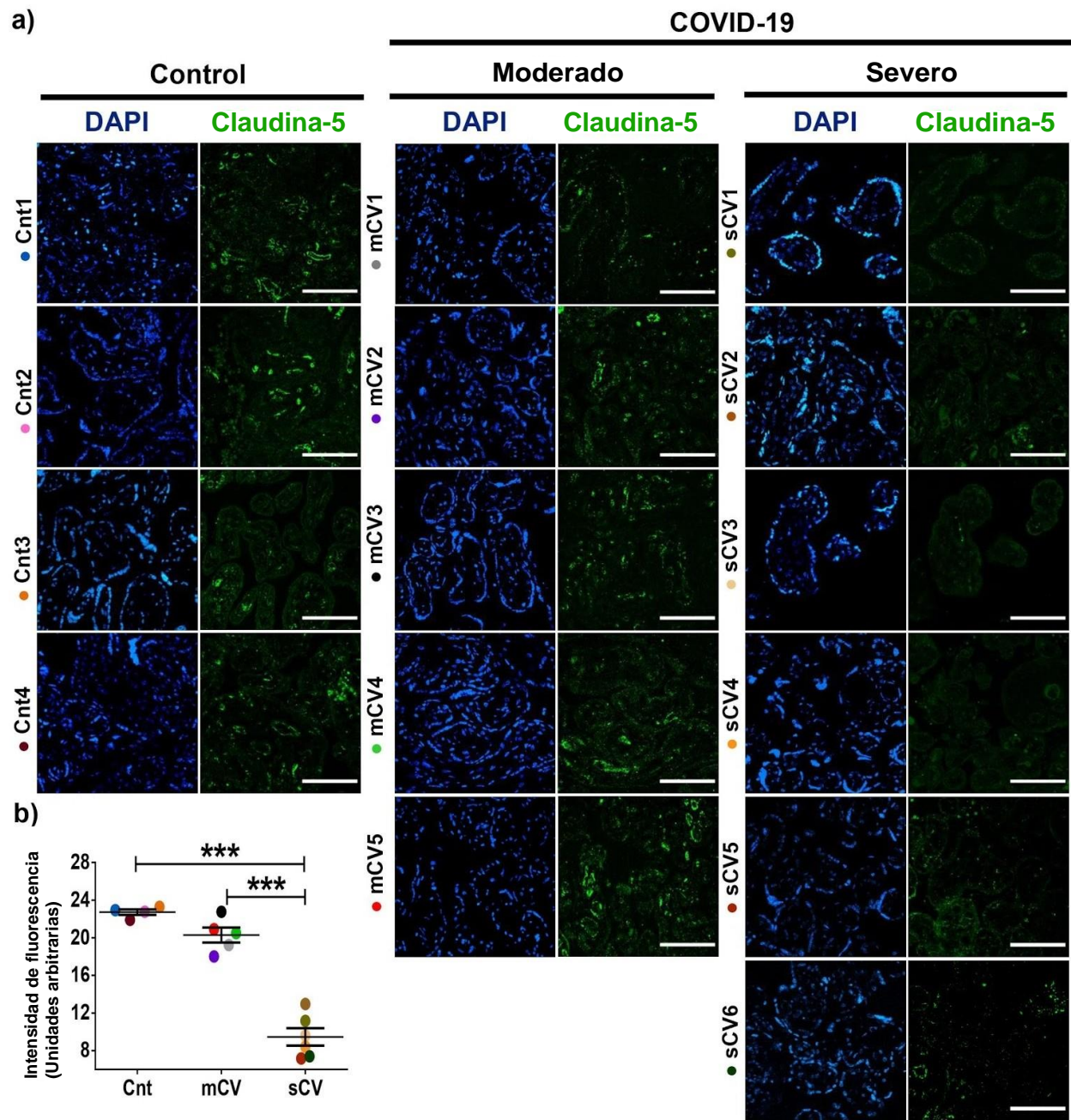


Figura 10. La expresión de claudina-5 disminuye en el endotelio de las vellosidades coriónicas de mujeres con COVID-19 severo. Los bloques de parafina de las placentas de mujeres con COVID-19 y control se cortaron en secciones de 1 μ m, se desparafinaron y procesaron para inmunofluorescencia con anticuerpos contra la claudina-5. a) Imágenes representativas de la claudina-5 en las vellosidades coriónicas. Núcleos teñidos en DAPI. Barra, 100 μ m. b) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia hecha en tres imágenes independientes de cada condición. Los datos se representan como media \pm DE. Prueba de F de ANOVA de una vía, seguida por las pruebas de comparaciones múltiples de Bonferroni y Dunnett. ***, $p < 0.001$

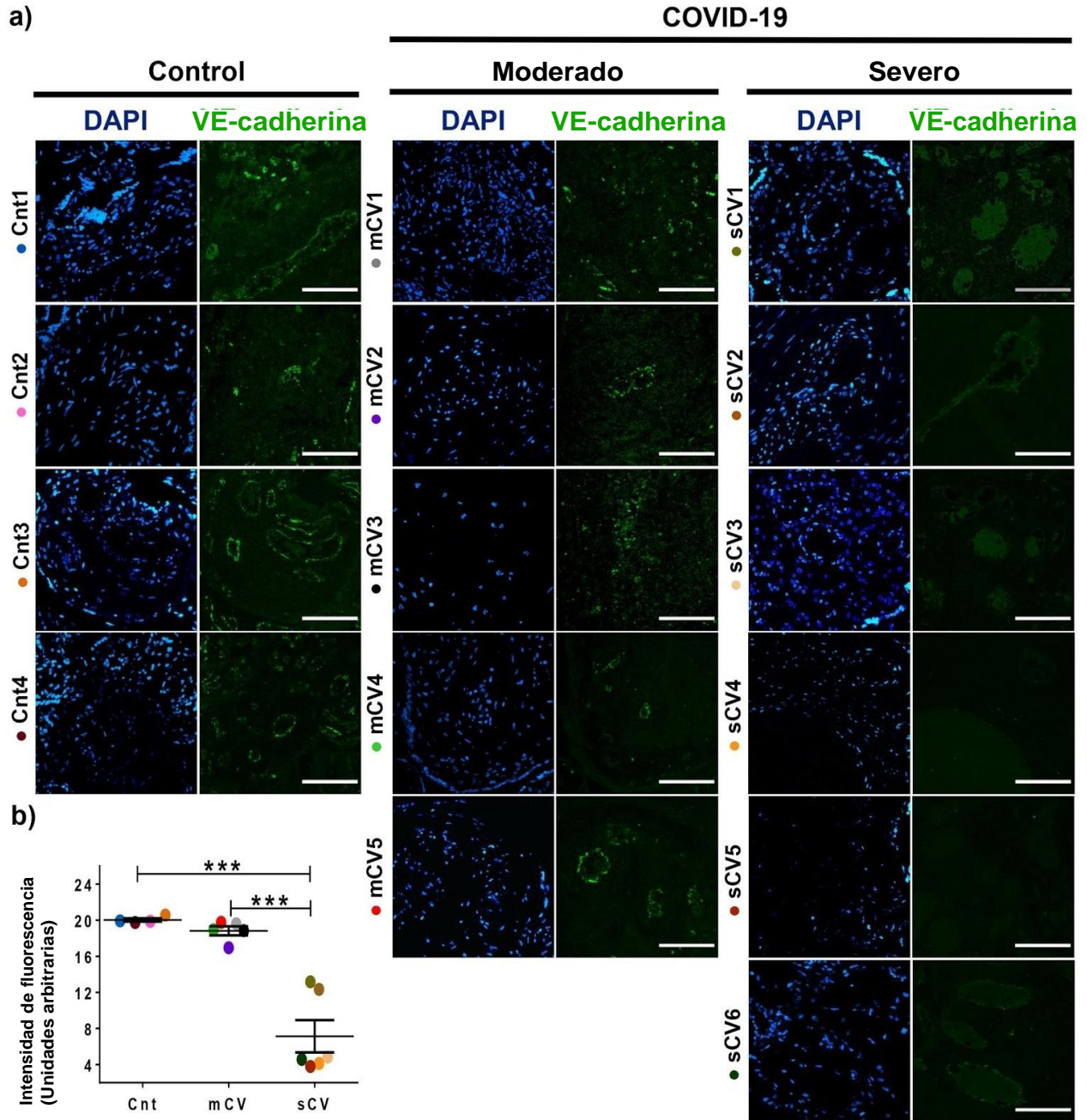


Figura 11. La expresión de VE-cadherina disminuye en el endotelio de la decidua de mujeres con COVID-19 severo. Los bloques de parafina de las placentas de mujeres con COVID-19 y control se cortaron en secciones de 1 μ m, se desparafinaron y procesaron para inmuofluorescencia con anticuerpos contra la VE-cadherina. a) Imágenes representativas de la VE-cadherina en la decidua. Núcleos teñidos en DAPI. Barra, 100 μ m. b) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia hecha en tres imágenes independientes de cada condición. Los datos se representan como media \pm DE. Prueba de F con corrección de Welch, seguida por las pruebas de comparaciones múltiples de Bonferroni y Dunnett, ***, $p < 0.001$

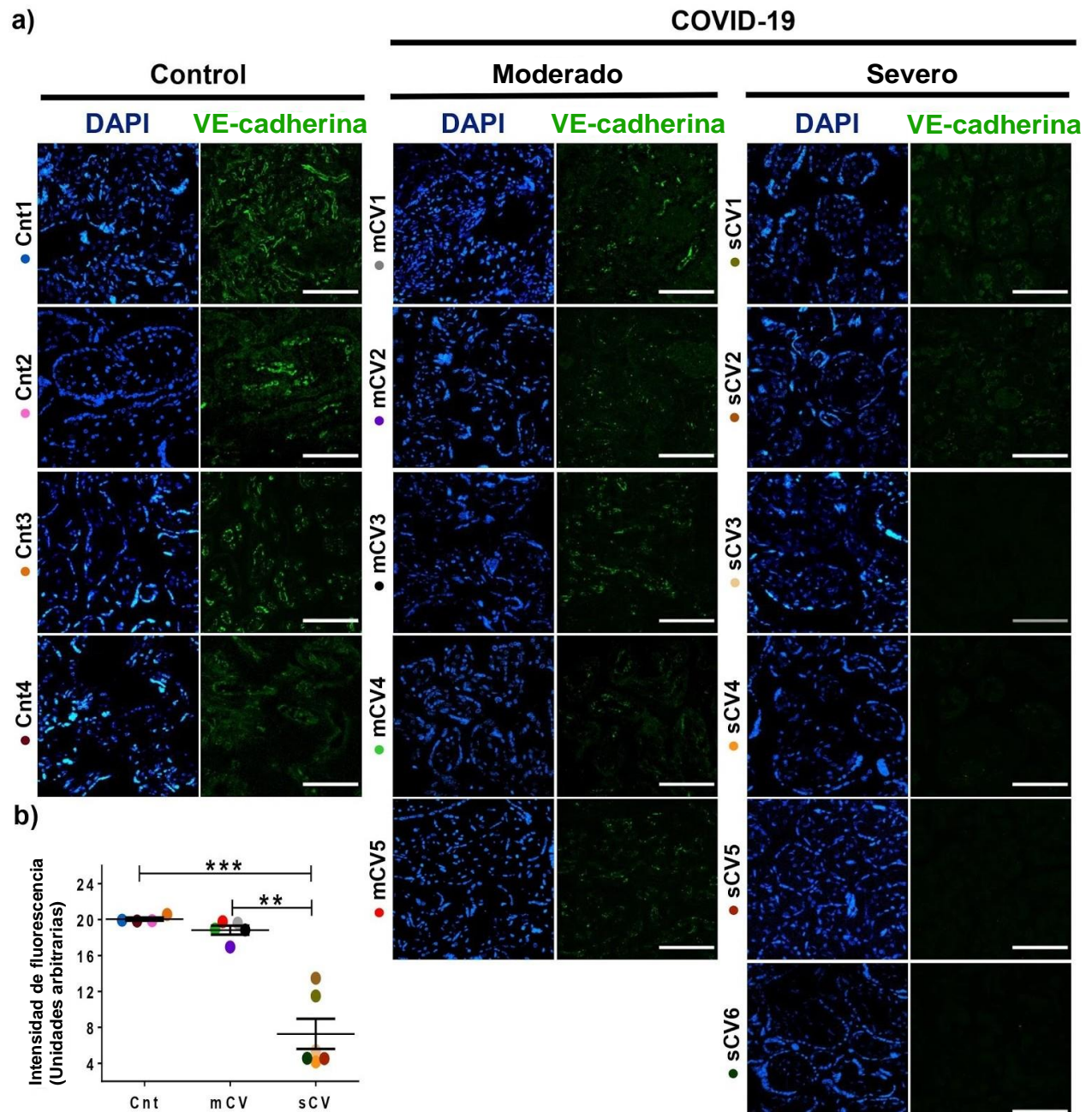


Figura 12. La expresión de VE-cadherina disminuye en el endotelio de las vellosidades coriónicas de mujeres con COVID-19 severo. Los bloques de parafina de las placentas de mujeres con COVID-19 y control se cortaron en secciones de 1 μ m, se desparafinaron y procesaron para inmuofluorescencia con anticuerpos contra la VE-cadherina. a) Imágenes representativas de la VE-cadherina en las vellosidades coriónicas. Núcleos teñidos en DAPI. Barra, 100 μ m. b) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia hecha en tres imágenes independientes de cada condición. Los datos se representan como media \pm DE. Prueba de Kruskal-Wallis seguida por su prueba de comparaciones múltiples, ** $p = 0.02$, *** $p < 0.001$.

2 La expresión de la VE-cadherina disminuye en el endotelio de la decidua y de las vellosidades coriónicas de las placentas de las mujeres con COVID-19 severo

La VE-cadherina es una proteína crucial de las UAs de las células endoteliales (Crosby et al., 2005), y su alteración deriva en un aumento de la permeabilidad vascular (Corada et al., 2001). El análisis de inmunofluorescencia no reveló un cambio significativo en la expresión de la VE-cadherina en la decidua de las mujeres con un cuadro moderado de COVID-19 respecto a las mujeres control. En cambio, en las placentas de mujeres con el cuadro severo de la enfermedad, se observa una disminución significativa en la expresión de VE-cadherina en la decidua (Figura 11 a,b). Un fenómeno similar ocurre en las vellosidades coriónicas, donde no hay un cambio significativo en la expresión de VE-cadherina en el cuadro moderado de COVID-19 en comparación con los controles, mientras que se observa una disminución significativa de la expresión de la VE-cadherina en el cuadro severo de la enfermedad (Figura 12 a,b). Estos resultados refuerzan las observaciones hechas con claudina-5 y en conjunto sugieren que la COVID-19 aumenta la permeabilidad paracelular del endotelio en la decidua y las vellosidades coriónicas.

VII. Discusión

La COVID-19 puede inducir daño en la microvasculatura y síndrome trombótico detonado por diversos mecanismos que incluyen la tormenta de citocinas, la vasooclusión hipóxica, la activación directa de las células inmunitarias y sanguíneas por la infección viral y la generación de auto-anticuerpos que reconocen fosfolípidos y proteínas unidas a los fosfolípidos (Zuo et al., 2020). El SARS-CoV2 se ha detectado en la placenta, y su receptor ACE-2 se encuentra en muchos endotelios. Por ello, en este trabajo se estudió si se altera la expresión de la claudina-5 y la VE-cadherina en el endotelio de la decidua y las vellosidades coriónicas de placentas de mujeres con COVID-19. El complejo de adhesión célula-célula de las células endoteliales, está formado por las UE y las UA y en estas estructuras la claudina-5 y la VE-cadherina respectivamente, son esenciales para el sellado de los vasos sanguíneos que mantiene la perfusión sanguínea placentaria.

Nuestros resultados muestran que no hay cambios significativos en la expresión de VE-cadherina y claudina-5 en la decidua o las vellosidades coriónicas de las mujeres con un cuadro moderado de la enfermedad respecto a las pacientes control. En cambio, en las pacientes con un cuadro severo de la enfermedad, la cantidad de claudina-5 y VE-cadherina en el endotelio disminuye drásticamente. Estas observaciones revelan que tanto las proteínas de la UE como las de la UA son sensibles al daño inducido por la COVID-19, y demuestran que el deterioro en el complejo de unión apical del endotelio placentario se correlacionan con la severidad de la enfermedad.

En estudios previos se analizó la expresión de proteínas de la UA y UE en las vellosidades coriónicas de la placenta humana a término. Así, se encontró que el STB expresa E-cadherina, ZO-1 y ZO-2, JAM-B, occludina y claudinas -1, -3, -4, -5, -7 y -16, mientras que los vasos sanguíneos del parénquima de las vellosidades coriónicas expresan ZO-1, occludina, JAM-C y las claudinas -1, -3, -4 y -5 (Liévano et al., 2006; Miranda et al., 2019). ZO-1, JAM-C, y claudina-5 se encuentran tanto en vasos grandes como pequeños, mientras que la occludina y las claudinas -1, -3, y -4 solo están presentes en los vasos grandes.

La VE-cadherina previamente se estudió en las células endoteliales de la decidua y las vellosidades coriónicas de la placenta humana (Leach et al., 1993; Li et al., 2015), así como en el STB, donde se vió que su expresión decrece hacia el término del embarazo normal. Sin embargo, se observó que esto no sucede en la preeclampsia (Groten et al., 2010). La expresión de la VE-cadherina en cambio, no se afecta por preeclampsia en el endotelio de las vellosidades coriónicas (Li et al., 2015).

La diabetes mellitus es otra enfermedad ligada a la disfunción del endotelio (Takeda et al., 2020; Tooke, 1995). En la diabetes gestacional tratada con insulina se observó una disminución en la expresión de VE-cadherina en el endotelio de las vellosidades coriónicas (Babawale et al., 2000). En contraste, las placentas de mujeres con diabetes tipo 1, tipo 2 y diabetes gestacional no tratadas con insulina muestran una expresión normal de VE-cadherina en los vasos de las vellosidades coriónicas (Baumüller et al., 2015).

Por otra parte, se reportó que la cantidad de claudinas -1 y -5 presente en la fracción insoluble de Tritón X-100, que corresponde a las claudinas asociadas al

citoesqueleto de actomiosina, disminuye en las placentas con preeclampsia, en comparación con las placentas sanas (Liévano et al., 2006). Lo que sugiere que esta enfermedad disminuye el sellado de las UEs.

Esta última observación es interesante porque en las mujeres embarazadas con COVID-19 se ha descrito un síndrome similar a la preeclampsia, con síntomas y características histopatológicas comunes (Mendoza et al., 2020). Este síndrome deriva en disfunción placentaria y restricción del crecimiento fetal (Staff et al., 2020), lo cual es de esperarse también cuando se daña la perfusión placentaria por ausencia de claudina-5 y VE-cadherina en el endotelio placentario.

Por otra parte, también es importante mencionar que en estas mismas placentas aquí estudiadas, en el INPer se analizó la expresión del factor Von Willebrand (vWf). Este factor juega un papel crítico en la homeostasis, ya que estabiliza al factor VIII en la circulación y media las interacciones entre plaquetas y endotelio, y plaqueta-plaqueta en condiciones de alto estrés de fricción (South & Lane, 2018).

El vWf forma multímeros ultralargos que cuando hay estrés de fricción, atrapan a las plaquetas circulantes en los sitios de daño endotelial. En condiciones normales la metaloproteinasa ADAMS13 corta al vWf en unidades mas pequeñas y menos trombogénicas (South & Lane, 2018). En la microangiopatía trombótica como la presente en la púrpura o la sepsis severa, se genera un exceso de vWf y una deficiencia de ADAMS13 (Santonja et al., 2020). Así mismo, en placentas con COVID-19 severo el nivel en plasma de vWf aumenta (Helms et al., 2020; Huisman et al., 2020; Morici et al., 2020), mientras que la actividad de ADAMS13 permanece a nivel normal (Escher et al., 2020) o disminuye (Huisman et al., 2020; Morici et al., 2020).

La investigación del INPer demostró que en las mismas muestras de placentas aquí estudiadas, la expresión del vWf aumenta en la COVID-19 moderada en comparación con las placentas control, tanto en los vasos de la decidua como de las vellosidades coriónicas. Este aumento en la expresión es aun más significativo en el caso de las placentas de mujeres con COVID-19 severo.

Así mismo, en el INPer se realizó un análisis histopatológico de estas placentas que reveló en los casos de COVID-19 moderado, vasculopatía decidual caracterizada por necrosis fibrinoide, cariorrexis vellosidades avasculares, maduración vellosa

acelerada y corangiosis. En el tejido placentario de mujeres con COVID-19 severo se observaron infartos en el parénquima con acumulación de fibrina, inflamación aguda y crónica en las vellosidades coriónicas, trombosis de vellosidades intermedias con remodelación de la pared vascular, obliteración de los vasos, malaperfusión vascular materna severa con maduración acelerada vellosa e incremento de nudos sinciciales. En cambio en las placentas control no se detectaron alteraciones histológicas.

Finalmente, para confirmar el estado inflamatorio de las placentas derivadas de mujeres con COVID-19, se cuantificó el número de macrófagos fetales, también conocidos como células de Hofbauer, en el parénquima de las vellosidades coriónicas. Se encontró un aumento de células de Hofbauer en las vellosidades coriónicas de las mujeres con COVID-19 severo en comparación con las placentas control y el tejido proveniente de mujeres con COVID-19 moderado.

Estos datos junto con los nuestros de VE-cadherina y claudina-5 indican que las placentas de mujeres con COVID-19 exhiben una condición trombótica con daño microvascular sensible a la severidad de la enfermedad y sugieren que la COVID-19 severa compromete la perfusión de la placenta y la progresión del embarazo. Los resultados de esta tesis junto con los arriba descritos hechos en el INPer generaron la siguiente publicación:

Flores-pliego, A., Miranda, J., Vega-torreblanca, S., Valdespino-v, Y., Helguera-repetto, C., Espejel-núñez, A., Borboa-olivares, H., Espino, S., Mateu-rogell, P., Ram, V., Cardona-p, A., Gonz, R. O., Gonz, L., & Estrada-gutierrez, G. (2021). *Molecular Insights into the Thrombotic and Microvascular Injury in Placental Endothelium of Women with Mild or Severe COVID-19*. 1-21.

VIII. Conclusión

La COVID-19 daña el endotelio de la decidua y de las vellosidades coriónicas porque apaga la expresión de proteínas de adhesión esenciales para la angiogénesis y el sellado de los vasos. Esto contribuye a que las placentas de mujeres con COVID-19 presenten daños en la microvasculatura y síndrome trombótico que se correlaciona con la gravedad de la enfermedad.

IX. Perspectivas

Los resultados hasta ahora reportados se obtuvieron de pacientes con COVID-19, pero sus placentas fueron negativas al virus SARS-CoV2 por PCR. Esto indica, que el daño que observamos fue por un efecto sistémico de la enfermedad, muy probablemente asociado a la tormenta de citocinas, la vaso-oclusión hipóxica, la activación de las células del sistema inmune o la generación de autoanticuerpos, que se presenta en la COVID-19 severa.

En el futuro queremos analizar el daño a las UE del STB y el endotelio de las vellosidades coriónicas en placentas donde esté presente el virus SARS-CoV2. En particular pensamos analizar a la proteína Pals1 de la UEs ya que previamente se vio que la proteína E del SARS-CoV se une a ella y la secuestra en el compartimiento intermedio del Golgi (Teoh et al., 2010). Además, mediante un análisis in silico y modelación molecular, se determinó que la proteína E del SARS-CoV2 es incluso más afín por Pals1 que la misma proteína del SARS-CoV (De Maio et al., 2020).

X. Referencias

- Alzamora, M. C., Paredes, T., Caceres, D., Webb, C. M., Valdez, L. M., & La Rosa, M. (2020). Severe COVID-19 during Pregnancy and Possible Vertical Transmission. *American Journal of Perinatology*, 1(212), 861-865. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1710050>
- Amasheh, S., Schmidt, T., Mahn, M., Florian, P., Mankertz, J., Tavalali, S., Gitter, A. H., Schulzke, J. D., & Fromm, M. (2005). Contribution of claudin-5 to barrier properties in tight junctions of epithelial cells. *Cell and Tissue Research*, 321(1), 89-96. <https://doi.org/10.1007/s00441-005-1101-0>
- Andersen, K. G., Rambaut, A., Lipkin, W. I., Holmes, E. C., & Garry, R. F. (2020). The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nature Medicine*, 26(4), 450-452. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0820-9>
- Babawale, M. O., Lovat, S., Mayhew, T. M., Lammiman, M. J., James, D. K., & Leach, L. (2000). *GDM junct.*
- Baumüller, S., Lehnen, H., Schmitz, J., Fimmers, R., & Müller, A. M. (2015). The impact of Insulin treatment on the expression of vascular endothelial cadherin and beta-catenin in human fetoplacental vessels. *Pediatric and Developmental Pathology*, 18(1), 17-23. <https://doi.org/10.2350/13-11-1400-OA.1>

- Breslin, N., Baptiste, C., Gyamfi-Bannerman, C., Miller, R., Martinez, R., Bernstein, K., Ring, L., Landau, R., Purisch, S., Friedman, A. M., Fuchs, K., Sutton, D., Andrikopoulou, M., Rupley, D., Sheen, J.-J., Aubey, J., Zork, N., Moroz, L., Mourad, M., ... Goffman, D. (2020). Coronavirus disease 2019 infection among asymptomatic and symptomatic pregnant women: two weeks of confirmed presentations to an affiliated pair of New York City hospitals. *American Journal of Obstetrics & Gynecology MFM*, 2(2), 100118. <https://doi.org/10.1016/j.ajogmf.2020.100118>
- Carmeliet, P., Lampugnani, M. G., Moons, L., Breviario, F., Compernelle, V., Bono, F., Balconi, G., Spagnuolo, R., Oosthuysen, B., Dewerchin, M., Zanetti, A., Angellilo, A., Mattot, V., Nuyens, D., Lutgens, E., Clotman, F., De Ruiter, M. C., Groot, A. G. De, Poelmann, R., ... Dejana, E. (1999). Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell*, 98(2), 147-157. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81010-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81010-7)
- Carter, J. (1976). The effect of progesterone, oestradiol and HCG on cell-mediated immunity in pregnant mice. *Reproduction*, 46(1), 211-216. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0460211>
- Castellucci, M., & Kaufmann, P. (2019). Basic Structure of the Villous Trees. In *Pathology of the Human Placenta* (Vol. 53, Issue 9, pp. 50-120). Springer New York. https://doi.org/10.1007/0-387-26742-5_6
- Cavanagh, D. (1995). The Coronavirus Surface Glycoprotein. *The Coronaviridae*, 73-113. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1531-3_5
- Center for Systems Science and Engineering (CSSE) at Johns Hopkins University . (2020). COVID-19 Dashboard by the Center for Systems Science and Engineering (CSSE) at Johns Hopkins University . 11 de julio 2021, de Johns Hopkins University Sitio web: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>
- Cereijido, M., Gonzalez-Mariscal, L., Contreras, R. G., Gallardo, J. M., Garcia-Villegas, R., & Valdes, J. (1993). The making of a tight junction. *Journal of Cell Science*, 106(SUPPL. 17), 127-132. https://doi.org/10.1242/jcs.1993.supplement_17.18
- Cevik, M., Kuppalli, K., Kindrachuk, J., & Peiris, M. (2020). Virology, transmission, and pathogenesis of SARS-CoV-2. *BMJ*, 371, m3862. <https://doi.org/10.1136/bmj.m3862>
- Cheng, S. Bin, Nakashima, A., Huber, W. J., Davis, S., Banerjee, S., Huang, Z., Saito, S., Sadovsky, Y., & Sharma, S. (2019). Pyroptosis is a critical inflammatory pathway in the placenta from early onset preeclampsia and in human trophoblasts exposed to hypoxia and endoplasmic reticulum stressors. *Cell Death and Disease*, 10(12). <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2162-4>
- Conacci-Sorrell, M., Zhurinsky, J., & Ben-Ze'ev, A. (2002). The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *Journal of Clinical Investigation*, 109(8), 987-991. <https://doi.org/10.1172/jci200215429>

- Conacyt, Secretaría de Salud. (2020). COVID-19 México, Información general. 11 de julio del 2020, de Conacyt Sitio web: <https://datos.covid-19.conacyt.mx/>
- Coppel, E. (2021). Los bebés de la pandemia : el futuro de los recién nacidos con SARS-CoV-2. *Gato Pardo*, 1-33. <https://gatopardo.com/reportajes/los-bebes-en-la-pandemia-la-covid-19-en-el-hospital-de-perinatologia-inper/>
- Corada, M., Liao, F., Lindgren, M., Lampugnani, M. G., Breviario, F., Frank, R., Muller, W. A., Hicklin, D. J., Bohlen, P., & Dejana, E. (2001). Monoclonal antibodies directed to different regions of vascular endothelial cadherin extracellular domain affect adhesion and clustering of the protein and modulate endothelial permeability. *Blood*, 97(6), 1679-1684. <https://doi.org/10.1182/blood.V97.6.1679>
- Crosby, C. V., Fleming, P. A., Argraves, W. S., Corada, M., Zanetta, L., Dejana, E., & Drake, C. J. (2005). VE-cadherin is not required for the formation of nascent blood vessels but acts to prevent their disassembly. *Blood*, 105(7), 2771-2776. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-06-2244>
- Cruz-Martín-del-Campo, S. L., González-Espinosa, C., Ruiz-Quiñonez, A. K., & Carranza-Aguilar, C. J. (2020). Tipos de muerte celular y sus implicaciones clínicas. *El Residente*, 15(3), 97-112. <https://doi.org/10.35366/95960>
- Cui, J., Li, F., & Shi, Z. L. (2019). Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*, 17(3), 181-192. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>
- Dashraath, P., Wong, J. L. J., Lim, M. X. K., Lim, L. M., Li, S., Biswas, A., Choolani, M., Mattar, C., & Su, L. L. (2020). Coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic and pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 222(6), 521-531. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2020.03.021>
- De Maio, F., Lo Cascio, E., Babini, G., Sali, M., Della Longa, S., Tilocca, B., Roncada, P., Arcovito, A., Sanguinetti, M., Scambia, G., & Urbani, A. (2020). Improved binding of SARS-CoV-2 Envelope protein to tight junction-associated PALS1 could play a key role in COVID-19 pathogenesis. *Microbes and Infection*, 106408. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2020.08.006>
- Desforges, M., Meessen-pinard, M., & Talbot, P. J. (2020). Human Coronaviruses: Respiratory Pathogens Revisited as Infectious Neuroinvasive, Neurotropic, and Neurovirulent Agents. In *Neuroviral Infections* (Issue February, pp. 112-141). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b15082-10>
- Diamond, J. M. (1977). Twenty-first Bowditch lecture. The epithelial junction: bridge, gate, and fence. *Physiologist*, 20(1), 10-18.
- Dimonaco, N. J., & Salavati, M. (2021). *Computational Analysis of SARS-CoV-2 and SARS-Like*. 1-22.

- El-Sayed, A. A. F. (2017). Preeclampsia: A review of the pathogenesis and possible management strategies based on its pathophysiological derangements. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 56(5), 593-598. <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2017.08.004>
- Escher, R., Breakey, N., & Lämmle, B. (2020). ADAMTS13 activity, von Willebrand factor, factor VIII and D-dimers in COVID-19 inpatients. *Thrombosis Research*, 192(January), 174-175. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2020.05.032>
- Fenizia, C., Biasin, M., Cetin, I., Vergani, P., Mileto, D., Spinillo, A., Gismondo, M. R., Perotti, F., Callegari, C., Mancon, A., Cammarata, S., Beretta, I., Nebuloni, M., Trabattoni, D., Clerici, M., & Savasi, V. (2020). Analysis of SARS-CoV-2 vertical transmission during pregnancy. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18933-4>
- Flores-pliego, A., Miranda, J., Vega-torreblanca, S., Valdespino-v, Y., Helguera-repetto, C., Espejel-núñez, A., Borboa-olivares, H., Espino, S., Mateu-rogell, P., Ram, V., Cardona-p, A., Gonz, R. O., Gonz, L., & Estrada-gutierrez, G. (2021). *Molecular Insights into the Thrombotic and Microvascular Injury in Placental Endothelium of Women with Mild or Severe COVID-19*. 1-21.
- Furuse, M., Izumi, Y., Oda, Y., Higashi, T., & Iwamoto, N. (2014). Molecular organization of tricellular tight junctions. *Tissue Barriers*, 2(3), e28755-1-e28755-6. <https://doi.org/10.4161/tisb.28960>
- Garrido-Urbani, S., Bradfield, P. F., & Imhof, B. A. (2014). Tight junction dynamics: The role of junctional adhesion molecules (JAMs). *Cell and Tissue Research*, 355(3), 701-715. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1820-1>
- Gavard, J., & Gutkind, J. S. (2008). VE-cadherin and claudin-5: it takes two to tango. *Nature Cell Biology*, 10(8), 883-885. <https://doi.org/10.1038/ncb0808-883>
- González-Mariscal, L., Betanzos, A., Nava, P., & Jaramillo, B. E. (2003). Tight junction proteins. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 81(1), 1-44. [https://doi.org/10.1016/S0079-6107\(02\)00037-8](https://doi.org/10.1016/S0079-6107(02)00037-8)
- Gonzalez-Mariscal, L., Quirós, M., Díaz-Coránguez, M., Bautista, P., Anderson, J. M., & Van Itallie, C. M. (2008). Tight junctions. In *Current Biology* (Vol. 18, Issue 20). <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.07.083>
- Groten, T., Gebhard, N., Kreienberg, R., Schleißner, E., Reister, F., & Huppertz, B. (2010). Differential expression of VE-cadherin and VEGFR2 in placental syncytiotrophoblast during preeclampsia - New perspectives to explain the pathophysiology. *Placenta*, 31(4), 339-343. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2010.01.014>
- Hamming, I., Timens, W., Bulthuis, M. L. C., Lely, A. T., Navis, G. J., & van Goor, H. (2004). Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *Journal of Pathology*, 203(2), 631-637. <https://doi.org/10.1002/path.1570>

- Han, Q., Lin, Q., Jin, S., & You, L. (2020). Coronavirus 2019-nCoV: A brief perspective from the front line. In *Journal of Infection* (Vol. 80, Issue 4, pp. 373-377).
<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.02.010>
- Harapan, H., Itoh, N., Yufika, A., Winardi, W., Keam, S., Te, H., Megawati, D., Hayati, Z., Wagner, A. L., & Mudatsir, M. (2020). Coronavirus disease 2019 (COVID-19): A literature review. *Journal of Infection and Public Health*, 13(5), 667-673.
<https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.03.019>
- Harrison, A. G., Lin, T., & Wang, P. (2020). Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends in Immunology*, 41(12), 1100-1115.
<https://doi.org/10.1016/j.it.2020.10.004>
- Helms, J., Tacquard, C., Severac, F., Leonard-Lorant, I., Ohana, M., Delabranche, X., Merdji, H., Clere-Jehl, R., Schenck, M., Fagot Gandet, F., Fafi-Kremer, S., Castelain, V., Schneider, F., Grunebaum, L., Anglés-Cano, E., Sattler, L., Mertes, P. M., & Meziani, F. (2020). High risk of thrombosis in patients with severe SARS-CoV-2 infection: a multicenter prospective cohort study. *Intensive Care Medicine*, 46(6), 1089-1098. <https://doi.org/10.1007/s00134-020-06062-x>
- Henry, R. (2020). Etymologia: Coronavirus. *Emerging Infectious Diseases*, 26(5), 1027-1027.
<https://doi.org/10.3201/eid2605.ET2605>
- Hogue, B. G., & Machamer, C. E. (2014). Coronavirus Structural Proteins and Virus Assembly. *Nidoviruses*, 179-200. <https://doi.org/10.1128/9781555815790.ch12>
- Huisman, A., Beun, R., Sikma, M., Westerink, J., & Kusadasi, N. (2020). Involvement of ADAMTS13 and von Willebrand factor in thromboembolic events in patients infected with SARS-CoV-2. *International Journal of Laboratory Hematology*, 42(5), e211-e212.
<https://doi.org/10.1111/ijlh.13244>
- Karmakar, D., Lahiri, B., Ranjan, P., Chatterjee, J., Lahiri, P., & Sengupta, S. (2020). Road Map to Understanding SARS-CoV-2 Clinico-Immunopathology and COVID-19 Disease Severity. *Pathogens*, 10(1), 5. <https://doi.org/10.3390/pathogens10010005>
- Kyle, M. H., Glassman, M. E., Khan, A., Fernández, C. R., Hanft, E., Emeruwa, U. N., Scripps, T., Walzer, L., Liao, G. V., Saslaw, M., Rubenstein, D., Hirsch, D. S., Keown, M. K., Stephens, A., Mollicone, I., Bence, M. L., Gupta, A., Sultan, S., Sibbles, C., ... Dumitriu, D. (2020). A review of newborn outcomes during the COVID-19 pandemic. *Seminars in Perinatology*, 44(7), 151286. <https://doi.org/10.1016/j.semperi.2020.151286>
- Lampugnani, M. G., Orsenigo, F., Gagliani, M. C., Tacchetti, C., & Dejana, E. (2006). Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments. *Journal of Cell Biology*, 174(4), 593-604.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200602080>

- Leach, L., Clark, P., Lampugnani, M. G., Arroyo, A. G., Dejana, E., & Firth, J. A. (1993). Immunoelectron characterisation of the inter-endothelial junctions of human term placenta. *Journal of Cell Science*, 104(4), 1073-1081. <https://doi.org/10.1242/jcs.104.4.1073>
- Lebeau, G., Vagner, D., Frumence, É., Ah-Pine, F., Guillot, X., Nobécourt, E., Raffray, L., & Gasque, P. (2020). Deciphering SARS-CoV-2 virologic and immunologic features. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16), 1-40. <https://doi.org/10.3390/ijms21165932>
- Leno Durán, E. (2011). *Comparación de las células deciduales estromales humanas y sus precursoras las células endometriales: fenotipo antigénico, diferenciación, apoptosis y relación funcional con linfocitos*.
- Li, Y., Zhao, Y. J., Zou, Q. Y., Zhang, K., Wu, Y. M., Zhou, C., Wang, K., & Zheng, J. (2015). Preeclampsia Does Not Alter Vascular Growth and Expression of CD31 and Vascular Endothelial Cadherin in Human Placentas. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 63(1), 22-31. <https://doi.org/10.1369/0022155414558063>
- Liévano, S., Alarcón, L., Chávez-Munguía, B., & González-Mariscal, L. (2006a). Endothelia of term human placentae display diminished expression of tight junction proteins during preeclampsia. *Cell and Tissue Research*, 324(3), 433-448. <https://doi.org/10.1007/s00441-005-0135-7>
- Liévano, S., Alarcón, L., Chávez-Munguía, B., & González-Mariscal, L. (2006b). Endothelia of term human placentae display diminished expression of tight junction proteins during preeclampsia. *Cell and Tissue Research*, 324(3), 433-448. <https://doi.org/10.1007/s00441-005-0135-7>
- Liu, A., Zhang, X., Li, R., Zheng, M., Yang, S., Dai, L., Wu, A., Hu, C., Huang, Y., Xie, M., & Chen, Q. (2020). Overexpression of the SARS-CoV-2 receptor ACE2 is induced by cigarette smoke in bronchial and alveolar epithelia. *Journal of Pathology*, 2(October 2020), 17-30. <https://doi.org/10.1002/path.5555>
- Liu, D. X., Yuan, Q., & Liao, Y. (2007). Coronavirus envelope protein: A small membrane protein with multiple functions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(16), 2043-2048. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7103-1>
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A., & Martin, K. C. (2016). *Molecular cell biology* (8th ed.). Freeman Macmillan Learning. http://www.ghbook.ir/index.php?name=فرهنگ و رسانه های و option=com_dbook&task=readonline&book_id=13650&page=73&chckhash=ED9C9491B4&Itemid=218&lang=fa&tmpl=component
- Matar, R., Alrahmani, L., Monzer, N., Debiante, L. G., Berbari, E., Fares, J., Fitzpatrick, F., & Murad, M. H. (2020). Clinical Presentation and Outcomes of Pregnant Women With Coronavirus Disease 2019: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases*, April, 1-13. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa828>

- Mendoza, M., Garcia-Ruiz, I., Maiz, N., Rodo, C., Garcia-Manau, P., Serrano, B., Lopez-Martinez, R. M., Balcells, J., Fernandez-Hidalgo, N., Carreras, E., & Suy, A. (2020). Pre-eclampsia-like syndrome induced by severe COVID-19: a prospective observational study. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, *127*(11), 1374-1380. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.16339>
- Mineta, K., Yamamoto, Y., Yamazaki, Y., Tanaka, H., Tada, Y., Saito, K., Tamura, A., Igarashi, M., Endo, T., Takeuchi, K., & Tsukita, S. (2011). Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Letters*, *585*(4), 606-612. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.01.028>
- Miranda, J., Martín-Tapia, D., Valdespino-Vázquez, Y., Alarcón, L., Espejel-Nuñez, A., Guzmán-Huerta, M., Muñoz-Medina, J. E., Shibayama, M., Chávez-Munguía, B., Estrada-Gutiérrez, G., Lievano, S., Ludert, J. E., & González-Mariscal, L. (2019). Syncytiotrophoblast of Placentae from Women with Zika Virus Infection Has Altered Tight Junction Protein Expression and Increased Paracellular Permeability. *Cells*, *8*(10), 1174. <https://doi.org/10.3390/cells8101174>
- Mori, M., Ishikawa, G., Luo, S. S., Mishima, T., Goto, T., Robinson, J. M., Matsubara, S., Takeshita, T., Kataoka, H., & Takizawa, T. (2007). The cytotrophoblast layer of human chorionic villi becomes thinner but maintains its structural integrity during gestation. *Biology of Reproduction*, *76*(1), 164-172. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.056127>
- Morici, N., Bottiroli, M., Fumagalli, R., Marini, C., & Cattaneo, M. (2020). Role of von Willebrand Factor and ADAMTS-13 in the Pathogenesis of Thrombi in SARS-CoV-2 Infection: Time to Rethink. *Thrombosis and Haemostasis*, *120*(9), 1339-1341. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1713400>
- Morita, K., Sasaki, H., Furuse, M., & Tsukita, S. (1999). Endothelial claudin: Claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *Journal of Cell Biology*, *147*(1), 185-194. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.1.185>
- Naqvi, A. A. T., Fatima, K., Mohammad, T., Fatima, U., Singh, I. K., Singh, A., Atif, S. M., Hariprasad, G., Hasan, G. M., & Hassan, M. I. (2020). Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1866*(10), 165878. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165878>
- Nie, Q., Li, X., Chen, W., Liu, D., Chen, Y., Li, H., Li, D., Tian, M., Tan, W., & Zai, J. (2020). Phylogenetic and phylodynamic analyses of SARS-CoV-2. *Virus Research*, *287*(January), 198098. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198098>
- Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., Furuse, M., & Tsukita, S. (2003). Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *Journal of Cell Biology*, *161*(3), 653-660. <https://doi.org/10.1083/jcb.200302070>
- Ragia, G., & Manolopoulos, V. G. (2020). Inhibition of SARS-CoV-2 entry through the ACE2/TMPRSS2 pathway: a promising approach for uncovering early COVID-19 drug

- therapies. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 76(12), 1623-1630.
<https://doi.org/10.1007/s00228-020-02963-4>
- Raleigh, D. R., Marchiando, A. M., Zhang, Y., Shen, L., Sasaki, H., Wang, Y., Long, M., & Turner, J. R. (2010). Tight Junction-associated MARVEL Proteins MarvelD3, Tricellulin, and Occludin Have Distinct but Overlapping Functions. *Molecular Biology of the Cell*, 21(7), 1200-1213. <https://doi.org/10.1091/mbc.e09-08-0734>
- Rodríguez-Cortés, Y. M., & Mendieta-Zerón, H. (2014). La placenta como órgano endocrino compartido y su acción en el embarazo normoevolutivo. *Medicina e Investigación*, 2(1), 28-34. [https://doi.org/10.1016/s2214-3106\(15\)30025-x](https://doi.org/10.1016/s2214-3106(15)30025-x)
- Rossa, J., Protze, J., Kern, C., Piontek, A., Günzel, D., Krause, G., & Piontek, J. (2014). Molecular and structural transmembrane determinants critical for embedding claudin-5 into tight junctions reveal a distinct four-helix bundle arrangement. *Biochemical Journal*, 464, 49-60. <https://doi.org/10.1042/BJ20140431>
- SACHAN, R. S. K., UPADHYAY, A. K., DOHROO, A., & KARNWAL, A. (2021). An Upsurge of the novel sub-acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) pandemic: A systematic review. *Romanian Biotechnological Letters*, 26(1), 2195-2206.
<https://doi.org/10.25083/rbl/26.1/2195.2206>
- Santonja, C., Heras, F., Núñez, L., & Requena, L. (2020). COVID-19 chilblain-like lesion: immunohistochemical demonstration of SARS-CoV-2 spike protein in blood vessel endothelium and sweat gland epithelium in a polymerase chain reaction-negative patient. *British Journal of Dermatology*, 183(4), 778-780. <https://doi.org/10.1111/bjd.19338>
- Secretaría de Salud. (2021). Semana Epidemiológica 26 de 2021, corte el 4 de julio. *INFORME EPIDEMIOLOGICO SEMANAL DE EMBARAZADAS Y PUÉRPERAS ESTUDIADAS, ANTE SOSPECHA DE COVID-19*.
- Serna, N. L. (2013). Biología del desarrollo: cuaderno de trabajo. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53, Issue 9).
- Shanes, E. D., Mithal, L. B., Otero, S., Azad, H. A., Miller, E. S., & Goldstein, J. A. (2020). Placental Pathology in COVID-19. *American Journal of Clinical Pathology*, 154(1), 23-32. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqaa089>
- Sharma, Akshata, Sinha, S., Kakde, K., & Bajaj, P. (2020). Causes of deaths in covid-19 patients. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 11(Special Issue 1), 416-419. <https://doi.org/10.26452/ijrps.v11iSPL1.2801>
- Sharma, Atul, Tiwari, S., Deb, M. K., & Marty, J. L. (2020). Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2): a global pandemic and treatment strategies. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 56(2), 106054. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106054>
- South, K., & Lane, D. A. (2018). ADAMTS-13 and von Willebrand factor: a dynamic duo. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 16(1), 6-18. <https://doi.org/10.1111/jth.13898>

- Staff, A. C., Fjeldstad, H. E., Fosheim, I. K., Moe, K., Turowski, G., Johnsen, G. M., Alnaes-Katjavivi, P., & Sugulle, M. (2020). Failure of physiological transformation and spiral artery atherosclerosis: their roles in preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2020.09.026>
- Steed, E., Rodrigues, N. T. L., Balda, M. S., & Matter, K. (2009). Identification of MarvelD3 as a tight junction-associated transmembrane protein of the occludin family. *BMC Cell Biology*, *10*, 1-14. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-10-95>
- Suzuki, H., Nishizawa, T., Tani, K., Yamazaki, Y., Tamura, A., Ishitani, R., Dohmae, N., Tsukita, S., Nureki, O., & Fujiyoshi, Y. (2014). Crystal structure of a claudin provides insight into the architecture of tight junctions. *Science*, *344*(6181), 304-307. <https://doi.org/10.1126/science.1248571>
- Suzuki, H., Tani, K., & Fujiyoshi, Y. (2017). Crystal structures of claudins: Insights into their intermolecular interactions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1397*(1), 25-34. <https://doi.org/10.1111/nyas.13371>
- Taddei, A., Giampietro, C., Conti, A., Orsenigo, F., Breviario, F., Pirazzoli, V., Potente, M., Daly, C., Dimmeler, S., & Dejana, E. (2008). Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5. *Nature Cell Biology*, *10*(8), 923-934. <https://doi.org/10.1038/ncb1752>
- Takeda, Y., Matoba, K., Sekiguchi, K., Nagai, Y., Yokota, T., Utsunomiya, K., & Nishimura, R. (2020). Endothelial dysfunction in diabetes. *Biomedicines*, *8*(8), 1-15. <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES8070182>
- Tay, M. Z., Poh, C. M., Rénia, L., MacAry, P. A., & Ng, L. F. P. (2020). The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nature Reviews Immunology*, *20*(6), 363-374. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0311-8>
- Teoh, K.-T., Siu, Y.-L., Chan, W.-L., Schlüter, M. A., Liu, C.-J., Peiris, J. S. M., Bruzzone, R., Margolis, B., & Nal, B. (2010). The SARS Coronavirus E Protein Interacts with PALS1 and Alters Tight Junction Formation and Epithelial Morphogenesis. *Molecular Biology of the Cell*, *21*(22), 3838-3852. <https://doi.org/10.1091/mbc.e10-04-0338>
- Tooke, J. E. (1995). Microvascular function in human diabetes: A physiological perspective. *Diabetes*, *44*(7), 721-726. <https://doi.org/10.2337/diab.44.7.721>
- Wang, C., Wu, C., Wang, C., Wang, C., & Long, C. (2021). *Impact of COVID-19 on Pregnancy*. *18*. <https://doi.org/10.7150/ijms.49923>
- Wastnedge, E. A. N., Reynolds, R. M., van Boeckel, S. R., Stock, S. J., Denison, F. C., Maybin, J. A., & Critchley, H. O. D. (2021). Pregnancy and COVID-19. *Physiological Reviews*, *101*(1), 303-318. <https://doi.org/10.1152/physrev.00024.2020>
- Weiss, S. R., & Leibowitz, J. L. (2011). Coronavirus pathogenesis. In *Advances in Virus Research* (1st ed., Vol. 81). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385885-6.00009-2>

- Wen, H., Watry, D. D., Marcondes, M. C. G., & Fox, H. S. (2004). Selective Decrease in Paracellular Conductance of Tight Junctions: Role of the First Extracellular Domain of Claudin-5. *Molecular and Cellular Biology*, 24(19), 8408-8417. <https://doi.org/10.1128/mcb.24.19.8408-8417.2004>
- Woodworth, K. R., Olsen, E. O., Neelam, V., Lewis, E. L., Galang, R. R., Oduyebo, T., Aveni, K., Yazdy, M. M., Harvey, E., Longcore, N. D., Barton, J., Fussman, C., Siebman, S., Lush, M., Patrick, P. H., Halai, U.-A., Valencia-Prado, M., Orkis, L., Sowunmi, S., ... Whitehill, F. (2020). Birth and Infant Outcomes Following Laboratory-Confirmed SARS-CoV-2 Infection in Pregnancy — SET-NET, 16 Jurisdictions, March 29–October 14, 2020. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 69(44), 1635-1640. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6944e2>
- Wu, D., Wu, T., Liu, Q., & Yang, Z. (2020). The SARS-CoV-2 outbreak: What we know. *International Journal of Infectious Diseases*, 94, 44-48. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.03.004>
- Zeissig, S., Bürgel, N., Günzel, D., Richter, J., Mankertz, J., Wahnschaffe, U., Kroesen, A. J., Zeitz, M., Fromm, M., & Schulzke, J. D. (2007). Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut*, 56(1), 61-72. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.094375>
- Zhao, Y., Zhao, Z., Wang, Y., Zhou, Y., Ma, Y., & Zuo, W. (2020). Single-Cell RNA Expression Profiling of ACE2, the Receptor of SARS-CoV-2. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 202(5), 756-759. <https://doi.org/10.1164/rccm.202001-0179LE>
- Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., Niu, P., Zhan, F., Ma, X., Wang, D., Xu, W., Wu, G., Gao, G. F., & Tan, W. (2020). A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*, 382(8), 727-733. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2001017>
- Zuo, Y., Estes, S. K., Ali, R. A., Gandhi, A. A., Yalavarthi, S., Shi, H., Sule, G., Gockman, K., Madison, J. A., Zuo, M., Yadav, V., Wang, J., Woodard, W., Lezak, S. P., Lugogo, N. L., Smith, S. A., Morrissey, J. H., Kanthi, Y., & Knight, J. S. (2020). Prothrombotic autoantibodies in serum from patients hospitalized with COVID-19. *Science Translational Medicine*, 12(570). <https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.ABD3876>