



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

“ESTUDIO DE LA PERMISIVIDAD DE CÉLULAS BEWO
DIFERENCIADAS A SINCITIOTROFOBlastOS A LA INFECCIÓN POR
VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO ”

T E S I S

Que presenta:

Q.B.P. ANGEL GUILLERMO LÓPEZ MONTESINOS

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOMEDICINA MOLECULAR

BAJO LA ASESORIA DE:

DRA. LETICIA CEDILLO BARRÓN

DR. MOISÉS LEÓN JUÁREZ



Ciudad de México

Febrero 2023

LUGAR DE REALIZACIÓN



El siguiente proyecto de investigación se llevó a cabo en colaboración con el laboratorio de Inmunobioquímica de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Perinatología (INPer), “Isidro Espinosa de los Reyes” bajo la dirección del Dr. Moisés León Juárez y la Dra. Leticia Cedillo Barrón.

Formó parte del proyecto:

“Estudio de la permisividad de células BeWo diferenciadas a sincitiotrofoblastos a la infección por virus sincicial respiratorio”.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)

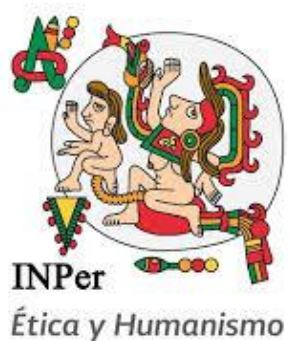
Clave: CB-2015-01/ 00000255007

Fondos federales INPer

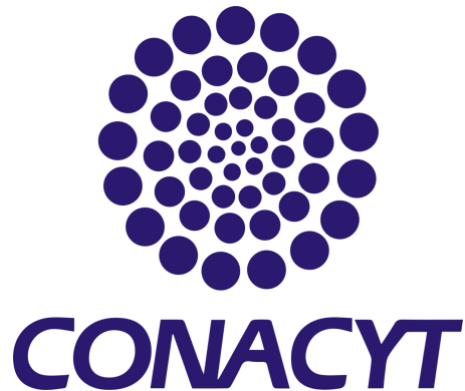
212250-3210-21007-03-15



Dr. En C. Moisés León Juárez



Agradecimientos institucionales:



**Beca de maestría del Consejo Nacional de
Ciencia y Tecnología (CONACyT).**

Durante el periodo: Septiembre 2022-Julio 2022

CVU-Becario: 1077201

**Departamento de Biomedicina Molecular del
Centro de Investigación y Estudios Avanzados
Del Instituto Politecnico Nacional (Cinvestav)**

por el apoyo en mi formación Académica.



Instituto Nacional de Perinatología (INPer)

por el apoyo con fondos federales:

212250-3210-21007-03-15

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Instituto Politécnico Nacional, al recibirme y facilitar mi preparación académica. Sé que gracias a todas las oportunidades proporcionadas, estoy cerca de convertirme en un maestro en ciencias preparado para ayudar a mi país y la sociedad mexicana.

Al CINVESTAV, por brindarme tantos aprendizajes durante mi formación académica y personal. Además, reconozco su compromiso hacia las demandas de aprendizaje de los estudiantes de posgrado, al proporcionar el desarrollo de los proyectos de investigación, la organización de los seminarios, conferencias, etc.

Al CONACyT por haberme apoyado económicamente con la beca de maestría durante todo el tiempo que realice mis estudios de posgrado.

Al Instituto Nacional de Perinatología por permitir integrarme al equipo de trabajo de investigación y proporcionar los equipos, materiales y reactivos necesarios para desarrollar este trabajo.

A todos los doctores que también fueron mis profesores, que de manera profesional y comprometida me ofrecieron sus conocimientos científicos y aún más importante, sembraron en mí una semilla de inspiración.

A la Dra. Leticia Cedillo Barron por contribuir al proyecto con su tiempo y amplio conocimiento así como sus consejos y observaciones.

Al Dr. Moisés León Juárez por darme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo y brindarme su apoyo, paciencia y conocimientos durante el desarrollo del trabajo.

Al Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete y el Dr. Michael Schnoor por su tiempo dedicado a la revisión de este proyecto así como todos los valiosos comentarios y observaciones que impactaron de forma positiva el resultado final del trabajo.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABLAS.....	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
INTRODUCCIÓN.....	13
IMPORTANCIA DE LAS INFECCIONES POR RSV EN MÉXICO Y EL MUNDO.....	13
CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS PARTÍCULAS VIRALES DE RSV	17
CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES Y ESTRUCTURALES DE LAS PROTEINAS DE RSV	18
CICLO DE REPLICACIÓN DE RSV	23
PATOGÉNESIS Y DAÑO CAUSADOS POR LA INFECCIÓN POR RSV	26
RSV EN EL EMBARAZO	30
ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA PLACENTA	34
LAS VELLOSIDADES CORIÓNICAS COMO PRINCIPAL ESTRUCTURA ANATÓMICA FUNCIONAL DE LA PLACENTA.....	34
LAS CELULAS BEWO DIFERENCIADAS A SINCITIOTROFOBLASTOS COMO MODELO DE ESTUDIO PARA LA INFECCIÓN POR RSV.....	37
JUSTIFICACIÓN.....	38
HIPÓTESIS.....	39
OBJETIVO GENERAL.....	39
OBJETIVOS PARTICULARES	39
METODOLOGÍA.....	40
RESULTADOS	48
DISCUSIÓN.....	58
CONCLUSIONES.....	62
PERSPECTIVAS	62
REFERENCIAS	62

ABREVIATURAS

RSV: Virus Sincicial Respiratorio Humano	cDNA: DNA complementario
PFA: Paraformaldehido	SFB: suero fetal bovino
MPVH: Metapneumovirus	IBAG: gránulos asociados a IB
IRA: Infecciones respiratorias agudas	AEC: célula epitelial respiratoria
TRS: Infecciones del tracto respiratorio superior	
SNC: Sistema nervioso central	
DVG: Genomas virales defectuosos	
GAG: Glicosaminoglicanos	
RNP: Complejo ribonucleoproteico	

CI: Cuerpos de inclusión

GPC: Guía de práctica clínica

GS: Inicio de gen

GE: Terminación de gen

IBs: Cuerpos de inclusión

Cof1: Cofilina 1

GAG: Glucosaminoglicanos

IGF1R: Factor de crecimiento similar a insulina 1

RNPs: ribonucleoproteínas

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

IgG: Immunoglobulina g

EIV: Espacio intervelloso

SIN: Sincitiotrofoblastos

CIT: Citotrofoblastos

TEE: Trofoblastos extravellosos endovasculares

cAMP: AMP ciclico

MOCK: Células falsamente infectadas

MOI: Multiplicidad de infección

BeWo SIN: línea celular BeWo diferenciada a sincitiotrofoblastos

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Distribución geográfica de los subtipos RSV A y RSV B del 2017–2018 en los 8 países que formaron parte del estudio INFORM-RSV.	15
Figura 2 Representación de una partícula filamentososa del RSV y su genoma Se muestra una representación de una partícula viral de RSV.	18
Figura 3 Ciclo de replicación del RSV. El ciclo de infección del RSV inicia cuando la partícula viral entra en contacto con células epiteliales del sistema respiratorio.	26
Figura 4 Estructura de la placenta humana.	37
Figura 5 Evaluación de la toxicidad de cAMP sobre las células BeWo.	49

Figura 6 Expresión de marcadores de diferenciación en las células BeWo a nivel transcripcional.....	50
Figura 7 Expresión del marcadores de diferenciación sincintina 2 en las células BeWo a nivel de proteína.	51
Figura 8 Cambio en la morfología de las células BeWo tratadas con cAMP evidenciado por tinción de inmunofluorescencia contra las uniones estrechas (ZO-1).	52
Figura 9 Porcentaje de células BeWo multinucleadas inducidas por el tratamiento con cAMP.	53
Figura 10 Cinética de infección por RSV en células BeWo diferenciadas y no diferenciadas.	54
Figura 11 Porcentaje de células infectadas en la cinética de infección.	55
Figura 12 Representación gráfica del porcentaje de células infectadas en la cinética de infección.....	56
Figura 13 Cinética de infección por RSV en células BeWo diferenciadas.....	57
Figura 14 Cambio en la cantidad relativa del receptor de RSV nucleolina en las células BeWo diferenciadas inducido por el tratamiento de cAMP o la infección por RSV.	58

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Lineas celulares utilizadas en el trabajo y su aplicación en el experimento correspondiente.....	40
Tabla 2 Condiciones de PCR para obtener cDNA de células inconfectadas con el virus Zika.	45
Tabla 3 Condiciones de PCR para amplificar los genes de las proteínas SIK1, Syn2 y GAPDH a partir de cDNA.	46

RESUMEN

El Virus Sincicial Respiratorio Humano (RSV) es uno de los principales agentes etiológicos causantes de infecciones respiratorias en infantes y suele ser un problema de salud pública que afecta a diversos grupos de edad causando infecciones recurrentes de forma estacional. Existen múltiples reportes de la transmisión vertical de este virus produciendo efectos adversos perinatales así como un mal desarrollo del aparato respiratorio en los neonatos infectados a lo largo de su niñez. Por ello, es importante generar información acerca de los mecanismos de transmisión viral en el contexto perinatal, para así poder ofrecer tratamientos farmacológicos que permitan que los pacientes cursen una infección moderada y sin complicaciones clínicas. Uno de los mecanismos de transmisión que se ha propuesto para la transmisión materno-fetal es mediante la infección de los sincitiotrofoblastos, células de la placenta que en condiciones normales son una barrera para la mayoría de los patógenos, sin embargo hay evidencia de infección por otros virus por lo que podrían también estar funcionando como vía de entrada para el RSV. En este sentido, se tiene conocimiento que RSV infecta la línea celular BeWo, una línea de citotrofoblastos es permisiva a la infección pero los citotrofoblastos no son la vía de entrada a la placenta. Afortunadamente, la línea celular BeWo posee la capacidad de diferenciarse a sincitiotrofoblastos in vitro, mediante un tratamiento con cAMP generando un modelo inducible de sincitiotrofoblastos que podría aportar nueva información a los mecanismos de transmisión vertical por RSV.

En este trabajo se demostró que el modelo de células BeWo diferenciadas a sincitiotrofoblastos son permisivas a la infección por RSV y la infección observada es ligeramente mayor que en las células BeWo sin diferenciar, siendo este el primer trabajo

del que tenemos conocimiento que emplea este modelo para el estudio de una infección viral. Adicionalmente se observó un incremento en la expresión del receptor viral nucleolina pero unicamente en las células BeWo diferenciadas, lo cual deja abierta posibilidad de realizar mas ensayos para enter que esta sucediendo en este modelo cuando esta siendo infectado por RSV.

ABSTRACT

The Human Respiratory Syncytial Virus (RSV) is one of the main etiological agents causing respiratory infections in infants and is usually a public health problem that affects various age groups due to the fact that it causes recurrent infections on a seasonal basis. There are multiple reports of vertical transmission of this virus producing adverse perinatal outcomes and it has also been reported that in children who had RSV infections in the first months of life, poor development of the respiratory system over their early life has been observed, therefore, it is important to generate information about the mechanisms of viral transmission in the perinatal context, in order to offer pharmacological treatments that allow patients to have a moderate infection and without clinical complications. One of the mechanisms that has been proposed for maternal-fetal transmission is through infection of syncytiotrophoblasts, placental cells that under normal conditions are a barrier to most pathogens. However, there is evidence of infection of syncytiotrophoblasts by other viruses, so they could also be functioning as a gateway for RSV. In this sense, it is known that RSV infects the BeWo cell line, a line of cytotrophoblasts, however cytotrophoblasts are not the entry path of RSV to the placenta. In addition, the BeWo cell line has the ability to differentiate into syncytiotrophoblasts in vitro, through treatment with cAMP, generating an inducible model of syncytiotrophoblasts that could provide new information on the mechanisms of vertical transmission by RSV. Here we prove that the model of BeWo cells differentiated into syncytiotrophoblasts are permissive to RSV infection and the observed

infection is slightly higher than in undifferentiated BeWo cells, this being the first work to our knowledge that uses this model for the study of a viral infection. In addition, an increase in the expression of the viral nucleolin receptor was demonstrated, but only in differentiated BeWo cells, which leaves open the possibility of carrying out more experiments to understand what is happening in this model when RSV infection occurs.

INTRODUCCIÓN

El virus sincicial respiratorio (RSV) es el agente infeccioso responsable de una de las infecciones más importantes de la infancia ya que se asocia con una morbilidad y mortalidad significativas. Las principales características histopatológicas de la infección por RSV son bronquiolitis aguda, edema de la mucosa y submucosa, así como la oclusión luminal por restos celulares de células epiteliales desprendidas mezcladas con macrófagos, depósitos de fibrina y mucina (Borchers et al., 2013).

Este virus se aisló por primera vez de chimpancés en 1956 (Blount et al., 1956) y no tardó mucho en comenzar a aislarse en muestras de neonatos con enfermedad grave del tracto respiratorio inferior (Chanok et al., 1957). El RSV es la principal causa de infección de las vías respiratorias inferiores en lactantes y niños pequeños, lo que provoca epidemias anuales en todo el mundo. Aún no se dispone de una vacuna que sea eficiente, segura y capaz de inducir inmunidad duradera contra la infección por RSV por lo que es importante continuar con la investigación de la biología básica del virus para conocer nuevos mecanismos que se podrían explotar en el desarrollo de nuevas estrategias, vacunas o fármacos para combatir la infección por este virus.

Los estudios de RSV se han llevado a cabo en cohortes de madres y niños con diagnósticos positivos, en modelos animales, en cultivos primarios y en líneas celulares, la mayoría en un contexto epidemiológico o de patogénesis incluyendo el daño respiratorio, sin embargo el estudio de la transmisión vertical de este virus ha sido controversial aun cuando se ha reportado contundente y ampliamente que ocurre. Sin embargo los mecanismos aun no están completamente dilucidados por lo que el estudio in vitro de este virus sigue siendo un tema crucial .

IMPORTANCIA DE LAS INFECCIONES POR RSV EN MÉXICO Y EL MUNDO

A nivel mundial se estima que el RSV es responsable de la hospitalización de aproximadamente 33 millones de personas y de 76,600 muertes por año, siendo los menores de 5 años los más afectados (Tabor et al., 2020). En México anualmente se presentan aproximadamente ochocientos mil casos de infecciones del tracto respiratorio, siendo el RSV uno de los virus más prevalentes (Fernandes-Matano et al., 2017). El grupo más afectado son los infantes, pero se ha reportado que en ancianos y adultos inmunocomprometidos el RSV suele producir hospitalizaciones y muertes (Staadegaard et al., 2021).

El RSV posee una cubierta lipídica que adquiere de la membrana plasmática de la célula hospedera. En el contexto epidemiológico se ha descrito que solo hay un serotipo, sin embargo, existen dos grupos antigénicos: A y B, los cuales se diferencian por tener una variación en la secuencia de aminoácidos de las proteínas F y G. Habiendo una homología del 35% entre ambas secuencias (L. Wang et al., 2022). En el estudio denominado INFORM-RSV entre los años 2017-2018, se obtuvieron 410 secuencias de genes RSV G-F de 476 muestras nasales positivas para RSV recolectadas en 8 países (Reino Unido, España, Países Bajos, Finlandia, Japón, Brasil, Sudáfrica y Australia). El RSV B predominó sobre el RSV A a nivel mundial (69,0 % frente a 31,0 %) y en todos los países excepto Sudáfrica. La mayoría de las cepas de RSV procedían de lactantes de <1 año de edad (81,2 %), varones (56,3 %) y pacientes hospitalizados durante las primeras 24 horas (70,5 %), sin diferencias en la distribución de subtipos (Tabor et al., 2020).

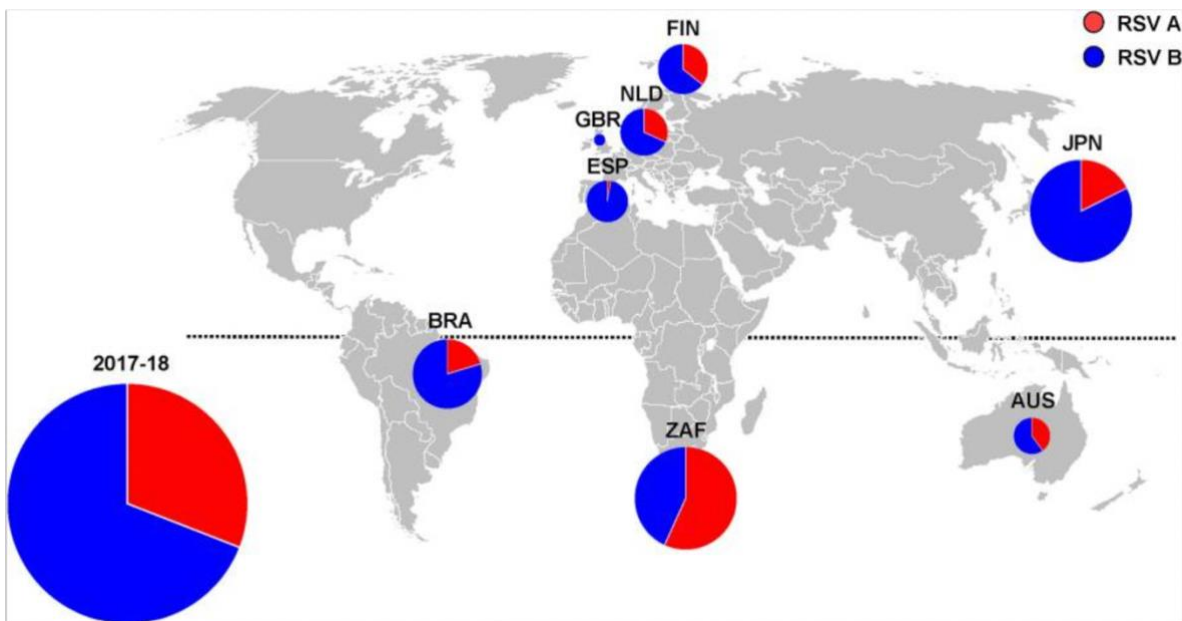


Figura 1 Distribución geográfica de los subtipos RSV A y RSV B del 2017–2018 en los 8 países que formaron parte del estudio INFORM-RSV.

Las gráficas de pastel muestran el número de aislados de RSV del subtipo A (rojo) y el subtipo B (azul). Hemisferio norte: GBR, Reino Unido; ESP, España; NLD, Holanda; FIN, Finlandia; JPN, Japón. Hemisferio Sur: BRA, Brasil; ZAF, Sudáfrica; AUS, Australia. Extraído de (Tabor et al., 2021).

La circulación del RSV tiene un patrón estacional bien definido durante los periodos de otoño e invierno. En México existen diferentes climas, por lo que puede haber cierta variabilidad en la circulación de RSV. Las dos ciudades donde mejor se ha estudiado la circulación del RSV son la Ciudad de México y San Luis Potosí. La temporada de circulación del RSV comienza en octubre o noviembre y termina hacia marzo o abril. En la Ciudad de México se estudiaron personas que acudieron al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, al Hospital Manuel Gea González, al Instituto Nacional de Pediatría y al Hospital Infantil de México Federico Gómez por una enfermedad similar a la influenza. Se detectó RSV en el 10.1 % del total de 5,629 ingresos (Gamino-Arroyo et al., 2017). La circulación estacional encontrada fue de septiembre-octubre a marzo, con el pico de mayor actividad en noviembre-diciembre, a excepción de 2014, cuando el pico de actividad fue en octubre. En el Hospital Central de San Luis Potosí se evaluó la estacionalidad de los ingresos por

infección respiratoria baja de 2003 a 2014 en menores de 5 años. En este caso se detectó el RSV en el 31.1% del total de 3,822 ingresos. La circulación del RSV durante estos 11 años fue similar a la observada en la Ciudad de México; en general, la circulación comienza en octubre-noviembre y termina hacia marzo-abril (Vizcarra-Ugalde et al., 2016). En México, aunque no existen reportes epidemiológicos de RSV, se han realizado varios estudios que permiten apreciar el comportamiento del RSV en la población mexicana. Por ejemplo en el año 2016 se realizó un estudio para identificar virus diferentes a influenza causales de infecciones respiratorias pacientes pediátricos, en donde a partir de muestras obtenidas por hisopado faríngeo se detectó molecularmente la presencia del RSV así como metapneumovirus humano (MPVh), se encontró que un 40% de pacientes pediátricos presentaron una infección respiratoria aguda de vías respiratorias inferiores y que había una incidencia de 45% para RSV, de 13% para MPVh y de 38% para una coinfección entre VSR y MPVh (Hernandez et al., 2016). Mientras que, en otro estudio en el que se analizaron 986 muestras de niños menores de 3 años con la técnica de IRA y que abarcaron de enero de 2004 a octubre de 2006, se determinó que el RSV fue el responsable de 80% de los casos (Wong-Chew et al., 2010). Sumado a lo anterior, la guía de práctica clínica (GPC) del año 2013, reportó que el RSV es el principal agente causal de bronquiolitis y que es potencialmente mortal en niños con factores de riesgo (Secretaría de Salud, 2015). Un niño de alto riesgo para infecciones respiratorias es aquel que nació antes de las 34 semanas de gestación (SDG) y/o se acompaña de morbilidades como: displasia broncopulmonar, cardiopatía congénita con afectación hemodinámica severa, traqueomalacia, laringomalacia y enfermedad neuromuscular (FDA, 2017). Un estudio prospectivo mas reciente realizado por Noyola y colaboradores abarcó una cohorte de 294 recién nacidos prematuros en la que se presentaron 71 episodios de hospitalización en 53 lactantes de los cuales 44 casos sospechosos de RSV fueron seleccionados, se tomaron muestras

respiratorias para detección de RSV y el resultado fue positivo en 16 (36,3%) similar al porcentaje reportado por Hernandez y colaboradores (Benítez-Guerra et al., 2020).

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS PARTÍCULAS VIRALES DE RSV

Estructuralmente el RSV es un virus pleomórfico, ya que la partícula viral puede existir en dos conformaciones: en una forma esférica o filamentosa. Las partículas virales esféricas tiene un tamaño aproximado de 150 o 250 nm de diámetro, mientras que la partícula filamentosa presenta un tamaño aproximado de 10 μm de largo (Shi et al., 2017), existe evidencia de que la forma de la partícula depende de los factores presentes en la célula hospedera así como la cantidad de las proteínas M, M2-1 y los RNPs asociándose con la membrana celular (Kiss et al., 2014). El RSV es un virus envuelto de RNA monocatenario de polaridad negativa no segmentado de aproximadamente 15,200 nucleótidos que pertenece al género *Orthopneumovirus* de la familia *Pneumoviridae* en el orden *Mononegavirales*. Posee 10 genes que codifican para 11 proteínas, ya que el mRNA de M2 produce dos proteínas de matriz distintas, M2-1 y M2-2 debido a que tiene 2 marcos de lectura abiertos sobrepuestos (Borchers et al., 2013). La transcripción de sus genes se da en el siguiente orden: NS1, NS2, N, P, M, SH, G, F, M2 (1-2) y L (Battles & McLellan, 2019), cada gen está delimitado en sus extremos por secuencias conocidas como inicio de gen (GS) y fin de gen (GE) que están constituidas por 9 y 12-14 nucleótidos respectivamente, los 4-7 nucleótidos finales del GE están constituidos por uracilos necesarios para la poliadenilación e inducen la modificación 5 metilguanosa del CAP en el extremo 5' (López & Ramírez et al., 2013, Collins et al., 2013). En los primeros 8 genes (de NS1 a F) entre cada gen existen regiones intergenicas que varían en tamaño entre cepas. La envoltura viral contiene tres proteínas, la glicoproteína G, la glicoproteína de fusión (F) y la proteína hidrofóbica pequeña (SH). La proteína G funciona en la unión de la célula hospedera y la proteína F es responsable de la fusión y la entrada en la célula, la proteína SH por otro lado

no se requiere en ninguno de estos procesos. La nucleocápside del RSV consta de otras 4 proteínas, las cuales son: nucleoproteína, la fosfoproteína, el factor de progresión M2-1 y la polimerasa viral, las cuales en conjunto forman el complejo de ribonucleoproteínas relacionadas con las síntesis de RNA.

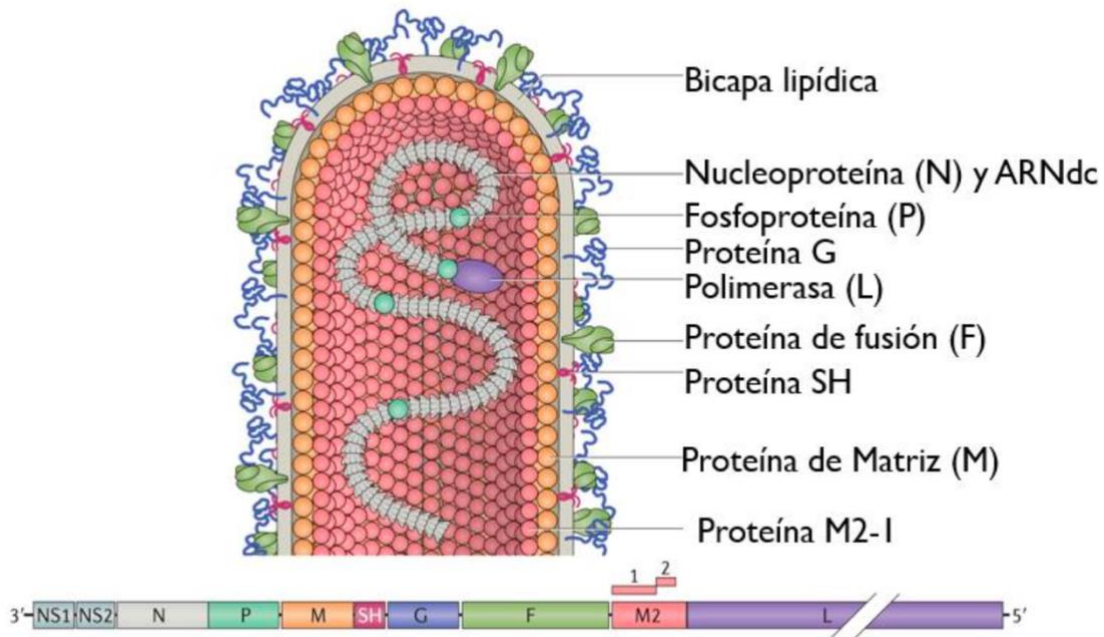


Figura 2 Representación de una partícula filamentosa del RSV y su genoma Se muestra una representación de una partícula viral de RSV.

En la capa exterior se encuentra una bicapa lipídica donde se encuentran embebidas las tres proteínas de envoltura: la proteína de unión (G), la proteína de fusión (F) y la proteína pequeña hidrofóbica (SH). Debajo de la bicapa lipídica se encuentra la proteína de matriz (M), que se asocia con la proteína M2-1. La proteína M2-1 a su vez interacciona directamente con la nucleoproteína (N), proteína encargada de recubrir al RNA viral. Finalmente, la polimerasa (L) y la fosfoproteína (P) se encuentran asociadas a la nucleoproteína (N). En la sección B) se esquematiza el genoma de RSV. Este conformado por 10 genes que codifican 11 proteínas. El orden de transcripción es de 3'-NS1, NS2, N, P, M, SH, G, F, M2-1, M2-2 y L-5'. Modificado de (Battles & McLellan, 2019).

CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES Y ESTRUCTURALES DE LAS PROTEINAS DE RSV

GLICOPROTEÍNA (G)

La glicoproteína G esta conformada por 298 aminoácidos y pesa alrededor de 32 kDa, es una proteína de membrana altamente glicosilada, lo que hace que su peso molecular sea variable. Existen dos formas de la proteína G: la proteína completa que presenta un dominio intracelular, un dominio transmembrana y un dominio extracelular, y otra forma que se conoce como G trunca, ya que el dominio transmembrana es escindido proteolíticamente y genera una proteína con el dominio extracelular, la cual es secretada por las células infectadas (Anderson et al., 2021). El tamaño de la proteína G madura y el número de glicosilaciones depende del linaje celular, por ejemplo: en la línea celular Hep-2 el tamaño suele ser de 95kDa, en la línea celular Vero suele ser de 55 kDa mientras que las células bronquiales humanas primarias suelen ser de 170kDa (King et al., 2021).

La función principal de la proteína G es la de interaccionar con los receptores celulares presentes en la célula huésped, así como con los glucosaminoglicanos de la superficie celular, para así permitir la entrada viral.

Por otro lado, se ha reportado que la proteína G secretada participa en la evasión del sistema inmune (Efstathiou et al., 2020). inhibiendo la producción de interferón, al interaccionar con el receptor TICAM-1, el cual está relacionado con la activación de los receptores Toll-Like Receptor (TLR) 3/4 encargados de modular la producción de interferón al detectar virus de RNA (Shingai et al., 2008).

PROTEÍNA DE FUSIÓN (F)

La proteína F está conformada por 541 aminoácidos y pesa alrededor de 63 kDa. Su función es facilitar la fusión de la membrana viral con la membrana de la célula hospedera, para la liberación del genoma viral al citoplasma celular para dar inicio a la replicación y transcripción de dicho genoma (Gilman, Furmanova-Hollenstein, et al., 2019). Inicialmente se sintetiza una proteína precursora (F0), la cual es escindida proteolíticamente por la proteasa furina, generando dos subunidades (F1 y F2). Una vez formadas dichas

subunidades pueden formar dímeros o trímeros, los cuales finalmente se organizan sobre la superficie de la membrana celular (Sibert et al., 2021). También es la proteína responsable de la fusión de células infectadas entre si dando como resultado la formación de células multinucleadas (sincitios), efecto citopático característico de la infección de RSV (Tian et al., 2013).

FOSFOPROTEÍNA (P)

La fosfoproteína P, está conformada por 241 aminoácidos y pesa alrededor de 27kDa. Su función es asociarse con la polimerasa viral y con el factor regulador de la transcripción M2-1 para poder llevar a cabo la transcripción y replicación del genoma viral (Blondot et al., 2012; Gilman, Liu, et al., 2019). Esta proteína adquiere actividad al fosforilarse en los residuos 116,117,119, 232 y 237 lo que le permite interaccionar con la nucleoproteína y formar los cuerpos de inclusión (IBs), sitios producidos por la infección viral donde ocurren la biogénesis del nuevo genoma viral y la síntesis de los mRNA virales (Beavis et al., 2021; Galloux et al., 2020; Lu et al., 2002). También actúa como chaperona que se une a la nucleoproteína viral para evitar la asociación de la nucleoproteína con RNA celular permitiendo que la polimerasa viral reconozca exclusivamente al RNA viral (Galloux et al., 2015). Adicionalmente se ha reportado que la tetramerización de la proteína P es necesaria para que se lleve a cabo la gemación de la partícula viral (Bajorek et al., 2021).

NUCLEOPROTEÍNA (N)

La nucleoproteína está constituida por 391 aminoácidos y pesa alrededor de 43.4 kDa. Conformar la cápside y presenta dominios de interacción con el RNA viral. Protege al RNA viral ya que puede oligomerizar, generando una estructura helicoidal que le da mayor estabilidad y evita la degradación del RNA viral por las nucleasas de la célula hospedera con ello evitando la activación del sistema de inmune innato a través de las moléculas sensoras (Gilman, Liu, et al., 2019). Adicionalmente, se ha descrito que el genoma y

antigenoma virales recién sintetizados son recubiertos por la nucleoproteína, formando estructuras conocidas como complejos ribonucleicos, que sirven como cadenas molde durante la replicación y transcripción viral en el ciclo de infección.

POLIMERASA VIRAL (L)

La polimerasa viral está constituida por 2165 aminoácidos y pesa alrededor de 280 kDa. Posee 3 dominios enzimáticos conservados: un dominio de RNA polimerasa dependiente de RNA, un dominio de polirribonucleotidil transferasa y un dominio de metiltransferasa. Es responsable de llevar a cabo la replicación y transcripción del RNA viral, así como de llevar a cabo la adición y metilación del CAP de los mRNA virales recién sintetizados (Balakrishnan et al., 2020).

PROTEÍNA M2 (M2-1/M2-2)

Tanto la proteína M2.1 como M2-2 están constituidas por 90 aminoácidos y poseen un peso similar de alrededor de 10 kDa. El gen M2 posee dos marcos de lectura abiertos, lo que produce 2 mRNA distintos que al traducirse generan dos proteínas: M2-1 y M2-2. M2-1 forma un complejo con la polimerasa viral y con la proteína P para regular y promover el inicio de la transcripción de los genes de RSV ya que funciona como un cofactor esencial del complejo de la polimerasa viral y como un factor de procesividad transcripcional y anti terminación (Tran et al., 2009).

La proteína M2-2 por otro lado participa en la regulación de la replicación y transcripción viral funcionando como un mediador del cambio de la transcripción a la replicación del RNA, que inicialmente proporciona un alto nivel de síntesis de mRNA seguido por una disminución en la síntesis de mRNA y un aumento en la síntesis del RNA genómico para el ensamblaje del virión (Bouillier et al., 2019).

PROTEÍNA PEQUEÑA HIDROFÓLICA (SH)

La proteína pequeña hidrofóbica está constituida por 64 aminoácidos y pesa alrededor de 7 kDa. Presenta una conformación transmembranal y se ha descrito que su ausencia conduce a la atenuación viral en el contexto de organismos completos también previene la apoptosis en las células infectadas (Gan et al., 2012).

PROTEÍNA DE MATRIZ (M)

La proteína de matriz está constituida por 256 aminoácidos y pesa alrededor de 28 kDa, participa en la unión entre la envoltura lipídica y la nucleocápside. Adicionalmente se ha descrito que participa en los eventos de ensamblaje y gemación de la partícula viral al final del ciclo de replicación, interactuando con las demás proteínas virales y formando prepartículas virales, las cuales se trasladan a la membrana plasmática de la célula hospedera para su ensamble final y su posterior gemación (Ward et al., 2017). También existe evidencia de que la proteína de matriz puede regular la replicación y transcripción viral al asociarse con el complejo ribonucleoprotéico viral (Ghildyal et al., 2002). También, se ha descrito que durante la infección tardía de RSV, la proteína de matriz interacciona con elementos celulares como la proteína de unión a actina, cofilina 1 (Cof1). Cuando se da la interacción entre ambas proteínas se promueve al aumento de los filamentos de actina incrementando el tráfico de proteínas sintetizadas hacia las balsas lipídicas. El aumento de actina, también es necesario para que se lleve a cabo de manera óptima el transporte del genoma viral sintetizado a los sitios de ensamblaje viral (Feng et al., 2022). Adicionalmente se ha observado que la proteína M se puede localizar en el núcleo, lo que sugiere que durante la infección por RSV puede estar inhibiendo la transcripción de la célula huésped durante las primeras horas infección (Sibert et al., 2021).

PROTEÍNA NO ESTRUCTURAL 1 (NS1)

La proteína no estructural 1 está constituida por 121 aminoácidos y pesa alrededor de 15.5 kDa. Se expresa de manera temprana para inhibir la respuesta inmune translocándose al núcleo (Thornhill & Verhoeven, 2020) donde se asocia a la cromatina celular para regular la transcripción de genes de la célula hospedera, particularmente los genes encargados de modular una respuesta antiviral (Pei et al., 2021).

PROTEÍNA NO ESTRUCTURAL 2 (NS2)

La proteína no estructural 2 está constituida por 124 aminoácidos y pesa alrededor de 14.5 kDa. Se expresa de manera temprana para inhibir la respuesta inmune translocándose a la mitocondria en su forma homodimérica o heterodimérica (NS1-NS2) (Thornhill & Verhoeven, 2020) con la finalidad de interactuar con los receptores similares a RIG-1 bloqueando la capacidad de interactuar con la proteína antiviral mitocondrial MAVS inhibiendo el mecanismo de la respuesta antiviral celular (Pei et al., 2021).

CICLO DE REPLICACIÓN DE RSV

Una vez que una persona sana inhala aerosoles producidos por una persona infectada que contienen partículas virales de RSV comienza el proceso de entrada del virus, que inicia con la unión de los viriones a las moléculas de la superficie de las células hospederas y la fusión de las membranas del virus y de la célula hospedera. Este proceso está mediado por las proteínas F y G (Hallak et al., 2007; Meng et al., 2015). La proteína G interactúa con elementos de la superficie celular, los glicosaminoglicanos (GAG); como el heparán sulfato, el sulfato de condroitina y el ácido hialurónico. Después, la proteína F interactúa con los receptores celulares presentes en la membrana celular, específicamente con: nucleolina, el factor de crecimiento epidérmico y el factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF1R) (Currier et al., 2016; Griffiths et al., 2020, 2020; Johnson et al., 2015; Tayyari et al., 2011). Una vez que se establece la interacción del dominio de unión al receptor de la proteína F con nucleolina o algún otro receptor de los mencionados, se lleva a cabo la fusión de las

membranas mediada por las proteínas F-G permitiendo que el genoma viral sea liberado en el citoplasma, estudios recientes indicaron que los pasos iniciales de la fusión del RSV ocurren en microdominios ricos en colesterol en la membrana plasmática, y que las etapas finales de la fusión de la membrana posiblemente requiera un evento endocítico independiente de dinamina (Vergara et al., 2012). En otro estudio se demostró que RSV utiliza la macropinocitosis como mecanismo de entrada inicial seguido de fusión en endosomas (Krzyzaniak et al., 2013). La evidencia ahora sugiere un evento de fusión en dos pasos o una fusión en los endosomas después de la macropinocitosis. Sin embargo, puede darse el caso de que el RSV pueda fusionarse tanto en la membrana plasmática como en las vesículas endocíticas, con diferentes eficiencias según las condiciones ambientales y las células blanco. Una vez que se encuentra el genoma viral en el citoplasma, ocurre una primera ronda de transcripción, para sintetizar las proteínas N, P y M, permitiendo que se formen los cuerpos de inclusión (IB). El mRNA viral recién sintetizado y la proteína M2-1 antiterminadora de la transcripción viral se concentran en los subcompartimentos de los IB denominados gránulos asociados a IB (IBAG). Por el contrario, el RNA genómico viral, la nucleoproteína, la polimerasa L y su cofactor P están excluidos de los IBAG. Los IB son el sitio principal de síntesis de RNA viral. Dentro de estos se inicia con la replicación y transcripción viral de forma masiva, procesos mediados por la polimerasa viral L, la fosfoproteína y la proteína M2- 1. L reconoce una secuencia única en el extremo 3' del RNA genómico (región líder); esta región contiene la secuencia promotora para el inicio de la transcripción y replicación viral (Fearn et al., 2002; Marriott et al., 2001). El inicio y el final de la transcripción de cada uno de los genes de RSV están regulados por secuencias GS y GE. Se ha identificado que los proceso de transcripción del genoma viral pueden ocurrir durante las primeras 8 horas de la infección (Barik, 1992; Kuo et al., 1996).

La transcripción da origen a proteínas de novo y la replicación a nuevas copias de genoma viral, el cual es empaquetado en una estructura conocida como complejo ribonucleico (RNP), estos complejos empaquetan el RNA y lo protegen mientras se encuentra en el citoplasma. Las proteínas principales que se han descrito como reguladoras de la transcripción son las proteínas M2-1/2, que se asocian al genoma viral para servir como un factor de antiterminación transcripcional, así generan mRNA eficientes y completos. (Russell et al., 2001; Tawar et al., 2009; Zimmer et al., 2001).

Las proteínas sintetizadas, se dirigen al complejo de Golgi para ser glicosiladas y finalmente, son transportadas por la vía secretora a la superficie apical de las células. Las proteínas virales restantes deben concentrarse en algunas áreas de la membrana celular para el ensamblaje (Husby & Stahelin, 2021). Particularmente, los sitios en donde se lleva a cabo el ensamblaje del virión, así como los sitios para la liberación de partículas virales son dominios ricos en colesterol conocidos como balsas lipídicas (Chang et al., 2012). Para un correcto ensamblaje y liberación de las partículas virales es necesario la participación del citoesqueleto celular que transporta los complejos de ribonucleoproteínas (RNPs) a los sitios de ensamblaje final en la membrana plasmática. La correcta localización subcelular de los RNPs depende de la proteína de matriz. La dimerización de la proteína de matriz es necesaria para la interacción con el RNP y facilitando el transporte del complejo a las membranas plasmáticas de la célula hospedera (Förster et al., 2015; Shahriari et al., 2018). Finalmente, cuando se ensamblan las glicoproteínas y el complejo RNP, el virión se libera al entorno extracelular. Esta liberación se produce porque las concentraciones de glicoproteínas y complejos RNPs generan una curvatura en la membrana celular que hace que se cierre parte de la membrana, adicionalmente se ha descrito que la proteína SH forma oligómeros que se comportan como canales iónicos que se activan a pH bajo y parecen

estar involucrados en la liberación de las partículas virales al medio extracelular (Gan et al., 2012).

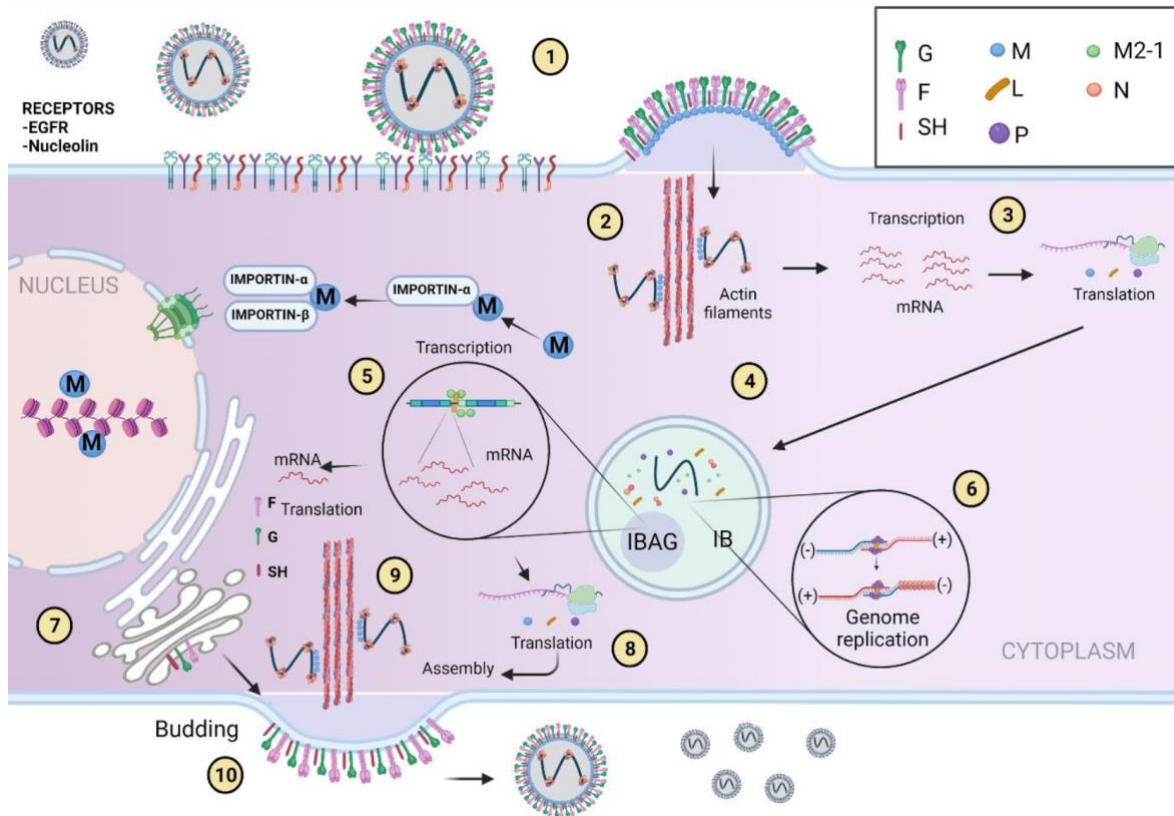


Figura 3 Ciclo de replicación del RSV. El ciclo de infección del RSV inicia cuando la partícula viral entra en contacto con células epiteliales del sistema respiratorio.

El primer paso es el reconocimiento de los elementos de la superficie y los receptores celulares por parte del virus. Posteriormente hay una fusión de membranas y liberación del genoma viral al citoplasma. Ya liberado el genoma comienza una primera ronda de transcripción para poder formar los cuerpos de inclusión. En estos se llevan a cabo los procesos de replicación y transcripción viral. Simultáneamente, las proteínas SH, G y F son procesadas en el complejo de Golgi. Una vez concluidos los eventos de replicación, transcripción y traducción el genoma viral y las proteínas virales son translocadas a la superficie celular para que se ensamblen y se de origen a las partículas virales maduras, las cuales finalmente serán liberadas al espacio extracelular. Extraído de (Shang et al., 2021).

PATOGÉNESIS Y DAÑO CAUSADOS POR LA INFECCIÓN POR RSV

La infección por RSV puede inducir que las mitocondrias se acumulen alrededor del núcleo y que se transporten al centro de la red de microtúbulos (Hu et añ., 2019). Estos cambios conducen al deterioro de la función mitocondrial, la pérdida del potencial de la membrana

mitocondrial y un aumento en la concentración de las especies reactivas de oxígeno (ROS), que a su vez aumentan la replicación y el título de RSV. Además, la infección por RSV puede estabilizar la expresión del factor 1 α inducible por hipoxia (HIF-1 α) en las células infectadas, lo que cambia el metabolismo celular para facilitar la glucólisis y la activación de la ruta de las pentosas fosfato mejorando aún más la capacidad de replicación del RSV (Morris et al., 2020). El principal daño por RSV afecta el sistema respiratorio, con la mayor parte del daño a las vías respiratorias mediado por la respuesta inmune y no por el virus per se. La principal célula que se infecta por RSV es la célula epitelial respiratoria (AEC). En las AEC, la proteína F inhibe la producción de interferón- λ (IFN- λ) inducida por el factor regulador de interferón (IRF) 1 al inducir la activación del receptor del factor de crecimiento epitelial, lo que también conduce a un aumento continuo de la infección viral (Kalinowski et al., 2018). En las células infectadas las proteínas NS1 y NS2, inhiben la respuesta de interferón tipo I (IFN- I) y otros componentes del sistema inmunológico. NS1 puede unirse e inhibir varias moléculas en la cascada de señalización de la respuesta de IFN- I en RIG-I o en la vía de los TLR (Thornhill et al., 2020). Los complejos NS1 y NS2 se transportan a las mitocondrias para formar degradosomas que pueden degradar una variedad de proteínas en la vía IFN- I (Goswami et al., 2013, Swedan et al., 2009, Elliott et al., 2007), como STAT2, TRAF3 (factor 3 asociado al receptor TNF), TBK1 (quinasa 1 de unión a TANK) y RIG-I. La proteína NS1 también juega un papel en los cambios de las células CD4+/CD8+. Por un lado, NS1 inhibe la activación y proliferación de células T CD103+ CD8+, en las que CD103 es una molécula que guía a las células T CD8+ hacia las células epiteliales de la mucosa respiratoria y desencadena la actividad citolítica (Munir et al., 2011). Al mismo tiempo, NS1 también inhibe la activación y proliferación de células Th17 con efecto antiviral. NS1 también aumenta la expresión de IL-4 en células T CD4+ y

promueve la respuesta de Th2 (células T cooperadoras es mas apropiado que auxiliares) al antagonizar IFN-I.

El cuadro clínico clásico provocado por el RSV es la bronquiolitis principalmente en bebés, niños, así como en adultos inmunosuprimidos y ancianos. Los signos distintivos de la bronquiolitis por RSV son sibilancias, tos y aumento del esfuerzo respiratorio causado por la infección de las vías respiratorias bronquiales. También se presenta una fase nasal de la infección, que puede causar estornudos, congestión y apnea (Sabogal et al., 2005).

Los bebés prematuros tienen un riesgo 10 veces mayor de infección por RSV y representan del 25 % al 30 % de las hospitalizaciones anuales por este virus (Simoës et al., 1999). La prematuridad como factor de riesgo para RSV está principalmente ligada a la fisiología de la transferencia de inmunoglobulina G (IgG) placentaria. La placenta humana no es permeable a la IgG durante la primera mitad del embarazo debido a la baja expresión del receptor Fc necesario para que las inmunoglobulinas se unan y sean transferidas a la circulación fetal. Además, la IgG materna es reconocida como una proteína extraña por el recién nacido y es progresivamente eliminada de la circulación por el hígado (Ballou et al., 1986).

Por lo tanto, la disminución de IgG continúa después del nacimiento, alcanzando la concentración más baja a los 2 o 3 meses de edad porque los recién nacidos son incapaces de sintetizar sus propios anticuerpos. Durante este tiempo, los bebés nacidos a término corren el mayor riesgo de desarrollar una infección por RSV. El riesgo es lógicamente mayor para los neonatos prematuros que carecen del beneficio total de la transferencia de IgG que ocurre durante el último trimestre, lo que hace que los niveles de anticuerpos sean aún más bajos para estos neonatos prematuros (Ballou et al., 1986).

Los niños infectados por RSV durante su primer año de vida desarrollan un mayor riesgo de episodios posteriores de obstrucción bronquial. Un estudio realizado en Suecia con una cohorte de 47 bebés hospitalizados con bronquiolitis por RSV comprobada por cultivo, mostró un aumento significativo del asma diagnosticada (38 %) en comparación con los 93 controles (2 %) a los 7,5 años ($P < 0,0001$).

Los antecedentes de infección por RSV son importantes tanto como desencadenantes de ataques de asma como en el mismo inicio de la enfermedad. Un análisis multivariado de la misma cohorte sueca mostró que los niños sin infección previa por RSV ni antecedentes familiares de asma tenían aproximadamente un 5% de riesgo de desarrollar asma a la edad de 7,5 años. Ninguno de los niños con antecedentes familiares de asma, pero sin antecedentes de infección por RSV desarrolló asma durante el seguimiento. Los niños que tenían una infección por RSV sin una predisposición familiar al asma tenían aproximadamente un 20% de riesgo de desarrollar asma. Los niños con infección previa por RSV y antecedentes familiares de asma tenían el riesgo más alto (~40 %) de desarrollar asma (Sigurs et al., 2000).

Este estudio parece demostrar que incluso si un niño tiene una predisposición genética al desarrollo de asma, las manifestaciones clínicas no se desarrollarán sin la exposición a agentes ambientales que permitan la expresión real de los genes predisponentes, como la infección por RSV en los primeros meses de vida.

MECANISMOS DE TRANSMISIÓN DEL RSV

El RSV se transmite horizontalmente a través del contacto directo de la mucosa nasofaríngea o conjuntival con secreciones respiratorias de pacientes infectados. Después de la replicación en la mucosa nasal, el RSV se propaga por todo el tracto respiratorio y causa síntomas en las vías respiratorias superiores, como rinorrea clara y estornudos, así como síntomas en las vías respiratorias inferiores, como tos, obstrucción del flujo de aire,

sibilancias y aumento del uso de los músculos respiratorios accesorios como resultado de la inflamación, el edema y necrosis de la mucosa respiratoria (Piedimonte et al., 2015). Las reinfecciones anuales son frecuentes porque este virus induce una memoria inmune de corta duración ya que la respuesta de células T específicas para RSV no proporciona protección contra la reinfección debido a que la reinfección genera más células T efectoras que de memoria, pero generalmente estas reinfecciones se limitan a causar enfermedades similares al resfriado común más leves que la primera infección.

RSV EN EL EMBARAZO

Se ha reportado en múltiples estudios que en mujeres embarazadas el RSV puede transmitirse verticalmente a la descendencia y provocar resultados perinatales adversos. Estudios epidemiológicos sugieren que la infección por RSV generalmente es poco común en mujeres embarazadas y ocurre en 2-9% de los embarazos (Chu et al., 2016, Chaw et al., 2016). Las manifestaciones clínicas frecuentes incluyen fiebre, con una duración de 2-3 días, y síntomas de las vías respiratorias superiores como rinorrea y dolor de garganta con una duración de 4 días. Con menos frecuencia, se observan sibilancias, dificultad para respirar, hipoxemia y otros síntomas de afectación de las vías respiratorias inferiores, que en ocasiones requieren hospitalización (Chaw et al., 2016, Hause et al., 2019). Un estudio prospectivo informó que el 50% de las mujeres embarazadas positivas a RSV desarrollaron una infección grave que requirió más de 3 días de hospitalización, y al 40 % de ellas se les diagnosticó neumonía. Curiosamente, el parto prematuro ocurrió con mayor frecuencia en mujeres embarazadas con RSV positivo en comparación con los controles negativos. Adicionalmente, se reportó que las complicaciones fueron más frecuentes con las infecciones del tercer trimestre (Hause et al., 2019). En un estudio más reciente, los autores demostraron que 10 de 20 mujeres embarazadas con infección por RSV fueron hospitalizadas por neumonía, atelectasia, insuficiencia respiratoria o sepsis (Regan et al.,

2018), y 9 de ellas tenían al menos una condición comórbida como asma, obesidad, o coinfección. Nuevamente, 9 de cada 10 mujeres embarazadas fueron hospitalizadas durante el tercer trimestre del embarazo, un período en el que se producen importantes cambios fisiológicos en los sistemas respiratorio e inmunitario de la madre. Cabe señalar que la verdadera incidencia de infección por RSV en el embarazo podría estar subdiagnosticada debido a la poca frecuencia de las pruebas.

Múltiples informes de antígenos y secuencias genómicas del RSV en tejidos extrapulmonares (por ejemplo, células del estroma de la médula ósea humana) de sujetos humanos infectados respaldan la hipótesis de que este virus tiene acceso a la circulación sistémica, lo que implica la posible transmisión de esta infección desde el tracto respiratorio de la madre al feto durante el embarazo (Rezaee et al., 2011, Campbell et al., 2010). En un modelo experimental de infección materna en roedores en una temporalidad intermedia de la gestación, se encontró el genoma del RSV en el 30 % de los fetos, así como en los pulmones del 40 % de los recién nacidos y el 25 % de los adultos expuestos en el útero (Piedimonte et al., 2013). Tanto los ratones recién nacidos expuestos no infectados (nacidos de una madre infectada) como infectados (es decir, con RNA de RSV detectado en los pulmones) mostraron evidencia de inmunidad Th1 alterada, inervación colinérgica aberrante e hiperreactividad de las vías respiratorias tanto a metacolina como la estimulación nerviosa después de la reinfección posnatal por RSV (Piedimonte et al., 2013, Brown et al., 2017, Manti et al., 2017). Estos datos experimentales fueron respaldados sucesivamente por un estudio independiente en humanos que mostró presencia del genoma de RSV en células mononucleares de sangre del cordón umbilical de 26 de 45 recién nacidos (57,7 %) cuya gestación fue a término y con madres sanas reclutadas antes del parto, mediante PCR digital en gotas (ddPCR) (Fonceca et al., 2017) Como la sangre del cordón es de origen exclusivamente fetal, cualquier virus aislado de la sangre del cordón

solo puede ser transmitido por la madre durante el embarazo, y esta prueba es universalmente aceptada como el “estándar de oro” de la transmisión vertical (Manti et al., 2022). De hecho, de acuerdo con el perfil epidemiológico de los brotes de RSV, se identificaron muestras positivas para RSV en los nacimientos durante todo el año, pero se observó una mayor cantidad de muestras positivas de RSV en invierno en comparación con los meses de nacimiento no invernales (Manti et al., 2022).

Casos clínicos han apoyado este fenómeno ya que se detectó el genoma de RSV en células mononucleares de sangre del cordón umbilical y en la sangre periférica de un recién nacido que presentaba dificultad respiratoria grave, inmediatamente después del parto de una madre con evidencia serológica y clínica de infección por el RSV durante el tercer trimestre del embarazo (Manti et al., 2017). Además, otro estudio publicado por Bokun y colaboradores (Bokun et al., 2019) demostró con muestras de placentas humanas infectadas con RSV que las células de Hofbauer (macrófagos fetales migratorios de tipo M2 ubicados en el estroma de las vellosidades coriónicas) soportan la infección por RSV hasta por 30 días y también pueden transmitir la infección a células epiteliales vírgenes a través de un mecanismo dependiente de contacto. Debido a que las células de Hofbauer pueden migrar y están localizadas en la proximidad de la vasculatura fetal, pueden cruzar a la circulación fetal y propagarse por vía hematogena al pulmón fetal, como se muestra con otros virus de transmisión vertical como el Zika (Bokun et al., 2019).

La infección transplacentaria da como resultado complicaciones del embarazo y resultados adversos durante parto. El primer caso de transmisión vertical del RSV se describió en un bebé de 35 semanas que nació por cesárea debido a la reducción del movimiento fetal. Después del parto, el bebé experimentó síndrome de dificultad respiratoria y dio positivo para RSV, según lo diagnosticado por IgM e IgA anti-RSV en suero de alto título, así como por amplificación por PCR de RNA de RSV. Paralelamente, también se detectó infección

por RSV en la madre y se confirmó por IgM, IgA e IgG anti-RSV positivas. El lactante requirió soporte ventilatorio y, a los 17 días de vida, dio negativo para RSV (Manti et al., 2017).

En un estudio similar, Chu y colaboradores informaron que la infección por RSV en mujeres embarazadas se asoció con prematuridad y bajo peso al nacer para la edad gestacional (Chu et al., 2017). Una vez más, el 57 % (4 de 7) de estos bebés dieron positivo para la infección por RSV durante los 6 meses de vida. Posteriormente, los mismos autores estudiaron la evidencia serológica de inmunidad anti-RSV en la sangre del cordón umbilical fetal de descendientes nacidos de mujeres con enfermedad respiratoria mediada por RSV durante el tercer trimestre del embarazo, y correlacionaron los datos serológicos con los resultados clínicos posnatales (Manti et al., 2020). Se detectaron IgG, IgA o IgM anti-RSV en todas las muestras de suero de sangre de cordón umbilical extraídas de bebés nacidos de madres infectadas con RSV y que experimentaron resultados clínicos posnatales adversos. El cincuenta por ciento de los recién nacidos seropositivos desarrollaron al menos un signo/síntoma del tracto respiratorio, incluido el síndrome de dificultad respiratoria (n=8), insuficiencia respiratoria (n=3) y neumonía (n=1). También requirieron más días con oxígeno en comparación con el grupo control (Manti et al., 2020).

Interesantemente, en el trabajo de (Bokun et al., 2019) se encontró que los citotrofoblastos de cultivo primario obtenidos a término son capaces de permitir la entrada viral y la síntesis de altas cantidades de proteína G en comparación con las células de Hofbauer que en ese trabajo fueron las células de interés como una propuesta de mecanismo de transmisión de la infección de la madre al feto, sin embargo, no se pudo demostrar en ese trabajo que los citotrofoblastos produjeran partículas virales infectivas. En otro estudio conducido por nuestro equipo de trabajo (Velazquez-Cervantes et al., 2019) se demostró que al menos la línea celular BeWo, un modelo de citotrofoblastos es capaz de infectarse y generar partículas virales infectivas. Esto permite postular que quizá trofoblastos de primer trimestre

de gestación puedan ser mas permisivos a la infección, particularmente los sincitiotrofoblastos, que de ser susceptibles podrían ser la puerta de entrada del virus a la placenta principalmente en este periodo de tiempo en la gestación donde tanto la madre y el feto son más susceptibles a cuadros graves por infecciones tanto virales como bacterianas.

ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA PLACENTA

La placenta es un órgano que forma parte de la interfase materno-fetal es fundamental en el desarrollo embrionario, se origina por una serie de adaptaciones del endometrio durante la implantación del cigoto cuando se establece un sistema circulatorio que alimentara directamente con sangre materna al espacio intervelloso (EIV). El EIV es una cavidad que contiene líquido que está en contacto directo con los arboles vellosos de la placenta, estructuras formadas por células especializadas denominadas sincitiotrofoblastos (SIN). La organización anatómica de la placenta humana permite que las vellosidades de origen fetal estén en contacto directo con la sangre materna (Coyne and Lazear, 2016).

LAS VELLOSIDADES CORIÓNICAS COMO PRINCIPAL ESTRUCTURA ANATÓMICA FUNCIONAL DE LA PLACENTA

Las vellosidades coriónicas son estructuras compuestas por células denominadas trofoblastos, una vellosidad coriónica esta compuesta por un epitelio polarizado de citotrofoblastos (CIT) progenitores anclados a una membrana basal. Estos CIT son altamente proliferativos y tienen la capacidad de migrar, de esta forma se diferencian en vellosidades de flotación y de anclaje (León-Juárez et al., 2017).

Los 2 diferentes tipos de vellosidades se pueden clasificar dependiendo de las células que los forman, su disposición en el EIV y su funcionamiento, teniendo en cuenta esta idea se clasifican en:

Vellosidades de flotación: Los CIT se pueden diferenciar para fusionarse y formar células gigantes multinucleadas SIN; estos son altamente polarizados, lo que permite que una cara se adhiera a los árboles vellosos fetales en la placenta y la otra este en contacto con la circulación materna (Apaza Valencia, 2014; León-Juárez et al., 2017). Los SIN están cubiertos por microvellosidades ramificadas densas en sus superficies apicales que sirven para el intercambio de gases, nutrientes y desechos entre la madre y el feto durante el embarazo. En las últimas etapas del embarazo la capa del CIT se vuelve discontinua por la alta diferenciación a SIN (Apaza Valencia, 2014; Coyne and Lazear, 2016).

Vellosidades de anclaje: Los CIT también se pueden diferenciar en otras células mononucleares no polarizadas que tienden a agregarse llamadas trofoblastos extra vellosos. Los trofoblastos extravellosos endovasculares (TEE) tienen la capacidad de unirse y penetrar en la pared uterina para formar un puente entre la madre y el feto. Los CIT también pueden diferenciarse en otras células con la capacidad de invadir la decidua materna y reemplazar las células endoteliales de las venas y arterias uterinas. Esta invasión termina con la formación de células híbridas que permiten la fusión de la circulación materna y fetal (León-Juárez et al., 2017).

La relación entre estas dos vellosidades (Vellosidad de flotación/vellosidad de anclaje) aumenta al progresar la gestación (Apaza Valencia, 2014). El hecho de que los SIN estén en contacto directo con la sangre materna habla de la importancia de estos como barrera protectora contra cualquier agente que pueda dañar al feto. Esta barrera protectora es funcional desde las primeras etapas del embarazo presentándose una capa completa rodeando al embrión a partir de aproximadamente los 7 días de la implantación.

Cuando el sistema circulatorio uteroplacentario está completamente establecido (aproximadamente a las 12 semanas), la placenta es la única barrera que evita que los microorganismos en la sangre materna accedan al compartimento fetal. (Coyne and Lazear,

2016). Los SIN son las células que funcionan como barrera protectora contra los patógenos que pueden estar en la circulación materna, y se cree que todas las sustancias pasan de la circulación materna a la fetal bajo el control de los SIN. Estas células son resistentes a la infección por la gran mayoría de patógenos, los mecanismos moleculares por los cuales el sincitiotrofoblasto resiste la infección aún no están completamente dilucidados pero la explicación más simple es que el sincitiotrofoblasto no expresa los receptores necesarios para la entrada de la mayoría de los patógenos, como el virus del herpes simple (HSV)-1 (Koi et al. ., 2002), pero también existe evidencia de una resistencia física conferida por su capacidad para formar redes complejas de actina que limita la invasión de algunos patógenos (Robbins et al., 2010), además, se ha descrito que la superficie sincitial presenta una superficie densa, microvellosidades ramificadas en la superficie apical (Zeldovich et al., 2013) que pueden ser responsables de una resistencia física a la infección. Otra posibilidad es que, dado que la placenta humana expresa altos niveles de péptidos antimicrobianos, defensinas (King et al., 2007; Svinarich et al., 1997), receptores tipo toll (TLR) (Ma et al., 2007; Patni et al. Al., 2009; Pudney et al., 2016; Tangeras et al., 2014) y proteínas del dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD) (Costello et al., 2007), todas estas moléculas limitan la capacidad de los patógenos para infectar no solo el sincitiotrofoblasto, sino también otras células placentarias, aunque el papel real de estas moléculas no se comprende por completo.

En este sentido, existe evidencia de que algunos virus como el virus Coxsackie (Esucher et al., 2001), el citomegalovirus humano (HCMV) (Schleiss et al., 2007) y más recientemente el SARS-CoV-2 (Argueta et al., 2021) pueden infectar sincitiotrofoblastos y usarlos como una vía de entrada al ambiente placentario, por lo que no sería descabellado postular que RSV podría infectar estas células y de esta forma acceder a la placenta y empezar a causar daño en el desarrollo del feto.

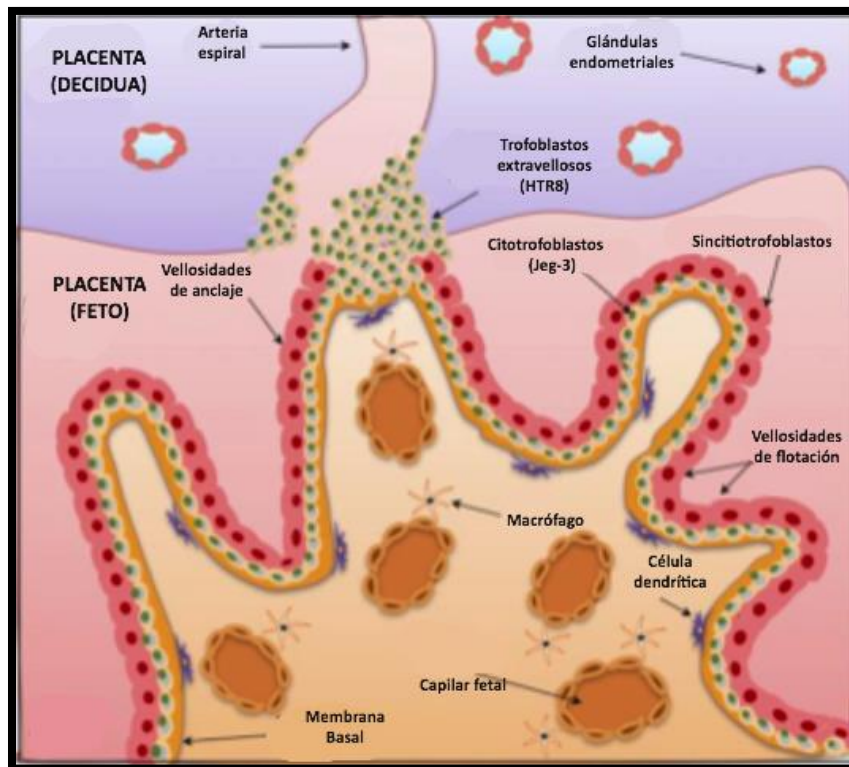


Figura 4 Estructura de la placenta humana.

La imagen muestra una sección transversal a través una vellosidad coriónica; se ilustra el número y tipo de capas de células entre la sangre materna y fetal. El modelo celular usado en este trabajo se encuentra especificado a partir del tipo de trofoblasto del cual fue aislada cada línea celular. Modificado de (Moisés-León et al., 2017).

LAS CELULAS BEWO DIFERENCIADAS A SINCITIOTROFOBLASTOS COMO MODELO DE ESTUDIO PARA LA INFECCIÓN POR RSV

En el contexto de tejido placentario, existe evidencia de la infección en fibroblastos, trofoblastos y células de Hofbauer por RSV, pero no se ha demostrado de forma definitiva el mecanismo exacto de transmisión vertical del RSV al feto (Bokun et al., 2019).

Adicionalmente como antecedente directo, nuestro grupo de trabajo demostró que la línea celular BeWo, derivada de un coriocarcinoma que mantiene muchas características del tejido del cual se deriva comportándose como un citotrofoblasto, es susceptible a la infección por RSV y produce partículas virales infectivas (Velázquez-Cervantez et al., 2019).

Esta línea celular puede resultar muy útil para estudiar la infección de RSV en los sincitiotrofbastos, ya que estas células son capaces de diferenciarse a sincitiotrofbastos mediante un tratamiento con AMP cíclico (cAMP) (Chen et al., 2013). Los sincitiotrofbastos obtenidos a partir de células BeWo in vitro, presentan un perfil de expresión de distintos marcadores que son necesarios en su proceso de diferenciación, entre ellos uno de los más utilizados como marcador es Syncintina 2 que es una proteína de superficie necesaria para que se lleve a cabo la fusión de estas células durante el proceso de diferenciación. Recientemente, se han estudiado nuevas proteínas que presentan expresión en sincitiotrofbastos obtenidos in vitro. Una muy prometedora es la proteína cinasa inducida por sal 1 (SIK1) que es un miembro de las SIK, un grupo de cinasas activadas por AMP (AMPK) relacionadas con la familia de las serina-treonina cinasas (Wang et al., 1999). Las SIK son reguladoras negativas de la señalización de cAMP. Se ha demostrado que SIK1 juega un papel crítico en la diferenciación celular al aumentar la estabilidad celular, lo que permite que se produzca la fusión. (Stewart et al., 2013).

La línea BeWo diferenciada, de ser susceptible a la infección podría ser un modelo ideal para estudiar la infección por RSV en sincitiotrofbastos y crucial para el estudio de la transmisión materno-fetal de la RSV.

JUSTIFICACIÓN

La infección por RSV en mujeres embarazadas aumenta el riesgo de resultados adversos perinatales. Se ha descrito que la placenta puede ser un puente para la infección por este virus y transmitir la infección al feto. Aunque no existen líneas celulares de sincitiotrofbastos, la línea celular BeWo es un modelo de trofbastos muy utilizado en el ámbito perinatal y su diferenciación a sincitiotrofbastos puede inducirse in-vitro. Este modelo, de ser susceptible a la infección, podría ser un modelo ideal para estudiar la

infección por RSV en sincitiotrofoblastos y crucial para el estudio de la transmisión materno-fetal del RSV facilitando su estudio in vitro en un contexto perinatal.

HIPÓTESIS

La línea celular BeWo diferenciada a sincitiotrofoblastos (BeWo SIN), es más permisiva a la infección por RSV que las células BeWo no diferenciadas, representando un modelo de estudio experimental.

OBJETIVO GENERAL

Establecer el modelo de sincitiotrofoblastos a partir de la línea celular BeWo y evaluar su permisividad a la infección por RSV.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Analizar los marcadores de diferenciación en las células BeWo diferenciadas a sincitiotrofoblastos:
 - Evaluar la expresión de los genes *syn 2* y *sik1*.
 - Evaluar la presencia de la proteína Syncintina 2.
 - Evaluar la formación de sincitios.

2. Evaluar la permisividad del modelo BeWo SIN a la infección por RSV:
 - Observando la presencia de los marcadores virales, nucleoproteína y M2-1 a nivel de proteína en el modelo BeWo SIN infectado por RSV.

METODOLOGÍA

PROPAGACIÓN Y MANTENIMIENTO DE LINEAS CÉLULARES

Tabla 1 Líneas celulares utilizadas en el trabajo y su aplicación en el experimento correspondiente.

Línea Celular	Origen	Aplicación en el trabajo
BeWo	Células de coriocarcinoma humano.	Modelo de trofoblastos presente en vellosidades de flotación humanas utilizado en ensayos de infección e inmunofluorescencia.

Las células BeWo se mantuvieron en botellas 25 con medio F12K suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, y antibiótico-antimicótico Gibco (10000 unidades/mL de penicilina, 10000 µg/mL de estreptomina y 25 µg/mL de antimicótico Anfotericina B /Fungizone) al 1%, cuando la confluencia se acercó al 100% se realizaron pases celulares en los que las células se lavaron 3 veces, se despegaron con tripsina y se centrifugaron a 112 x g por 5 min para obtener un botón celular, se re suspendieron los paquetes celulares en 1 mL de medio y se cuantificaron las células en una cámara de Neubauer utilizando azul de tripano, posteriormente se cultivaron en botellas t25, 1.5 millones de células, se les adicionó medio de crecimiento: F12K suplementado con suero fetal bovino al 10%, y antibiótico-antimicótico Gibco (10000 unidades/mL de penicilina, 10000 µg/mL de estreptomina y 25 µg/mL de antimicótico Anfotericina B Fungizone) al 1%; y se incubaron por 24 h a 37 °C en una atmosfera de CO₂ al 5 %. Finalizado el tiempo de incubación se hizo un lavado con medio base con el fin de eliminar las células que no se habían adherido a las botellas de cultivo.

GENERACIÓN DE UN STOCK VIRAL DE RSV

En una botella t25 (25 cm²) se crecieron células Hep-2 en medio DMEM suplementado con 5 % de SFB y 1 % de antibiótico-antimicótico hasta obtener una confluencia del 90%; se lavaron con medio base y se infectaron con RSV dejando adsorber durante 2 hrs agitando suavemente mediante una ligera inclinación de las botellas cada 15 minutos, se quitó el inoculo y se agregó medio DMEM suplementado con 5% de SFB y 1 % de antibiótico-antimicótico y se incubó a 37 °C en atmósfera de CO₂ hasta observar un efecto citopático y acidificación del medio, se recuperó el sobrenadante, se centrifugó a 112 x g durante 5 min a 4 °C para eliminar los restos celulares, el sobrenadante se transfirió a 5 botellas t75 (75 cm²) células Hep-2 a aproximadamente 90% de confluencia, se dejó 2 hrs de adsorción y posteriormente se completó el medio con medio DMEM suplementado con 5% de SFB y 1 % de antibiótico-antimicótico, posteriormente se dejó la infección hasta observar franco efecto citopático, finalmente se despegaron las células con un scraper y se recolectó el contenido de las botellas t75, se centrifugó a 112 x g durante 5 min a 4 °C para eliminar los restos celulares y todo el contenido se concentró utilizando un centrífugo, se centrifugó a 1372 x g durante 30 min a 4 °C, se repitió las veces necesarias hasta que se centrifugó el total del sobrenadante, por último se le adicionó 10% del volumen total de SPG y se hicieron alícuotas de 100 µL, que se congelaron a -70 °C para su posterior titulación.

TITULACIÓN DEL STOCK DE RSV

Se sembraron células Hep-2 en placas de 24 pozos (120,000 células por pozo) y se crecieron hasta 90 % de confluencia. Los pozos se infectaron con diluciones seriadas desde 10⁻¹ hasta 10⁻⁵ del stock viral obtenido, uno de los pozos se utilizó como control sin virus. Se dejó adsorber el virus por 2 h a 37 °C y 5 % de CO₂, agitando suavemente cada 15 min. Una vez finalizado el tiempo de infección se retiró el inoculo, empezando por el control y de la mayor dilución a la menor, se adicionó medio semisólido con carboximetilcelulosa (1%) y se incubó la placa durante 5 días hasta la aparición de placas de líticas. Una vez

observadas las placas de líticas se fijaron las células con una solución de formaldehído (PFA) al 3.65 % y se tiñeron las placas con cristal violeta (0.1 P/v).

El título viral se calcula aplicando la siguiente formula:

$$\frac{UFP}{mL} : \frac{\#placas * factor\ de\ dilución}{volumen\ del\ inóculo}$$

ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR ANTE EL TRATAMIENTO CON cAMP

Se sembraron 20,000 células BeWo por pozo en una placa de 96 pozos, se dejaron adherir toda la noche, posteriormente se retiró el medio de crecimiento y se adicionó medio de mantenimiento y diferentes concentraciones de cAMP (50 μ M, 100 μ M y 150 μ M) por triplicado, así como al vehículo en el cual se disuelve el cAMP (Agua) en el mismo volumen que la máxima concentración de cAMP, se dejó el tratamiento durante 48 horas y posteriormente se retiró el medio, se lavaron los pozos con 100 μ L de PBS y se adicionaron 100 μ L de solución de MTT en medio F12K (0.55mg/mL) por pozo y se incubaron por 1:30 horas a 37 °C en agitación y oscuridad, posteriormente se retiró el MTT y se adicionó solución para detener la reacción (Tritón/Isopropanol/HCl) y se incubó 1:30 horas a 37 °C en agitación y oscuridad, posteriormente se resuspendió el contenido de todos los pozos y se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm.

DIFERENCIACIÓN DE CELULAS BEWO CON cAMP

Se sembraron 120,000 células BeWo por pozo en una placa de 24 pozos, se dejaron adherir toda la noche, posteriormente se retiró el medio de crecimiento y se adicionó medio de mantenimiento cAMP a una concentración 100 μ M, se dejó el tratamiento durante 48 horas y posteriormente se retiró el medio, se lavaron los pozos con 100 μ L de PBS, estas células ya diferenciadas se utilizaron para ensayos de infección, así como extracción de mRNA, proteínas y ensayos de inmunofluorescencia para demostrar la diferenciación celular.

EXTRACCIÓN DE RNA

La extracción se realizó a partir de cultivos celulares de las células BeWo tratadas y sin tratar con cAMP. Se retiró el medio de cultivo a cajas t25 de cada línea celular a un 90% de confluencia y se les adicionó 500 μL de Trizol, se homogenizó pipeteando repetidamente, se transfirió la suspensión a un tubo eppendorf de 1.5 mL que se incubó 5 min a temperatura ambiente, después se agregaron 200 μL de cloroformo para extraer los ácidos nucleicos en la fase acuosa y separar el resto de los componentes celulares en la fase orgánica, se homogenizaron en vórtex, posteriormente se incubaron 3 min a temperatura ambiente, y se centrifugaron a 16,128 x g durante 5 min a 4 °C. Se recuperó la fase acuosa, y se transfirió a otro tubo eppendorf, posteriormente se adicionó 500 μL de isopropanol y se incubó 10 min a temperatura ambiente para favorecer la precipitación del RNA, una vez transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugó a 16,128 x g durante 10 min, terminada la centrifugación se decantó el sobrenadante y el pellet se lavó con 1000 μL de etanol al 75%, se centrifugó a 6300 x g durante 5 min a 4 °C. Por último, el sobrenadante se decantó y el pellet se dejó secar a temperatura ambiente durante 30 min. Una vez seco se resuspendió en 15 μL de agua con Dietilpirocarbonato (DEPC).

Se trató con DNAsa adicionando 2 μL de Buffer de DNAsa 10x y 2-3 μL de DNAsa (10U /mL), el tubo de reacción se colocó en termoblock a 37 °C por 30 min, posteriormente a 65 °C por 10 min y finalmente se mantuvo en hielo. La integridad del RNA se determinó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1 %, aplicando una corriente de 100 volts en TBE 1X durante 30 min y se visualizó en un fotodocumentador, el tamaño molecular se analizó gracias a la presencia del marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).

Una vez tratado el RNA, se determinó su concentración y pureza mediante espectrofotometría en un NanoDrop 2000.

EXTRACCIÓN DE PROTEINAS

Se crecieron las células BeWo en cajas t25 (cm²) y se obtuvieron los extractos proteicos para esto se despegaron las células con tripsina y se centrifugaron a 1,000 rpm por 5 min, después el paquete celular se resuspendió con PBS 1X y se centrifugo a 2,000 rpm 5 min; se utilizó el reactivo comercial EM-PER (Thermo Scientific, EUA) para lisar las células y extraer las proteínas totales, y se adicionó un inhibidor de proteasas Halt® Protease & Phosphatase inhibitor (Thermo Scientific, EUA) a una concentración de 1X. Los extractos celulares se trabajaron a una temperatura de 4°C por 1 h y los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 13,000 x g por 5 min a una temperatura de 4°C. La concentración de proteínas se determinó por el método Bradford, a una absorbancia a 630 nm, se cuantificó con una curva estándar de albúmina. Los extractos se conservaron a -70°C hasta su procesamiento.

ENSAYO DE WESTERN BLOT

Se tomaron 50 µg de cada extracto proteico y se resuspendieron en buffer Laemli, se desnaturalizaron las proteínas a temperatura de 96°C durante 10 minutos. Se realizaron geles desnaturalizantes de poliacrilamida 10-15%, y se corrieron los extractos proteicos en buffer de corrida (192 mM de glicina, 25 mM Tris-base) por 90 minutos a 100 volts en una cámara de electroforesis (Bio-Rad). Terminando la electroforesis se transfirieron las proteínas en una membrana de nitrocelulosa por el sistema de electrotransferencia y buffer de transferencia (192 mM de glicina, 25 mM Tris-base, metanol 1:5) a 120 volts durante 1 hora y 30 minutos a 4°C. Posteriormente la membrana se bloqueó por 1 hora con PBS-Tween-leche descremada 5%, se hicieron 4 lavados de 10 minutos con PBS-Tween 0.5%. Posteriormente se incubaron las membranas con el anticuerpo primario contra GAPDH, Syncintina 2, PBS-Tween-leche descremada 5% por 1 hora a temperatura ambiente, pasado el tiempo de incubación se lavaron las membranas 4 veces como se mencionó anteriormente. Finalmente se incubó el anticuerpo secundario anti-rabbit o anti-mouse

acoplados a HRP (1:3000) con PBS-Tween-leche 5% durante 1 hora a temperatura ambiente, posteriormente se lavaron con las condiciones antes mencionadas. Finalmente se reveló la membrana mediante el uso de un Kit de revelado de placas radiográficas.

SÍNTESIS DE cDNA A PARTIR DE RNA TOTAL

Posteriormente con el RNA extraído se sintetizó DNA complementario (cDNA), permitiendo realizar la amplificación de los todos los genes que se están expresando/transcribiendo. Se utilizó un *Kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis*. Para la transcripción reversa del RNA total obtenido, se hizo una mezcla de reacción final de 20 μ L, que consiste en buffer de reacción (1 x), oligo dT (5 μ M), random primer (5 μ M), inhibidor RiboLock RNAses (1 U/ μ L), dNTPs (1 mM), retrotranscriptasa (10 U/ μ L), RNA (5 μ g), y el volumen de agua faltante para completar un volumen final de 20 μ L.

Tabla 2 Condiciones de PCR para obtener cDNA de células inconfectadas con el virus Zika.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	No. Ciclos
Incubación	25	30	1
Retrotranscripción	42	60	5
Extensión final	70	5	1
Temperatura de conservación	4	Indefinido	1

AMPLIFICACIÓN DE SYNCINTINA2 Y SIK1 POR qPCR

Primero se estandarizó la reacción de PCR punto final, para esto se llevó a cabo una reacción con una unidad de la enzima Taq polimerasa, buffer de reacción y dNTP's 10 mM. Las condiciones establecidas para amplificar los genes SIK1 y Syn2 se enlistan a

continuación. Una vez amplificado, el producto se corrió en un gel de agarosa al 1.5% y se identificó la banda correspondiente al tamaño esperado.

Las mismas condiciones se utilizaron para realizar una qPCR para determinar los niveles de expresión de Syn2, SIK1.

La reacción de qPCR se llevó a cabo utilizando un kit de SYBR Green. Las condiciones establecidas para amplificar los genes SIK1 y Syn2 se enlistan a continuación. Una vez terminado el ensayo de qPCR se analizaron las curvas y el valor de Δ CT obtenido para los diferentes genes, y normalizándolo con el gen housekeeping GAPDH.

Tabla 3 Condiciones de PCR para amplificar los genes de las proteínas SIK1, Syn2 y GAPDH a partir de cDNA.

Primer	Secuencia
Forward GAPDH primer	5'- GGACCTGACCTGCCGTCTAG -3'
Reverse GAPDH primer	5'- GACCCGATGTGACTCGTGGT-3'
Forward SIK1 primer	5'- TTCTCCGCACACAGCTACAC-3'
Reverse SIK1 primer	5'- GGCATTCCGATACTCCTTGA-3'
Forward Syn2 primer	5'-AGCAGCCGTAGTCCTTCAAA-3'

Reverse primer	Syn25' - AGGGGAAGAACCCAAGAGAA-3'
-----------------------	-----------------------------------------

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	No. Ciclos
Desnaturalización inicial	95	10:00	1
Desnaturalización	95	0:10	40
Alineamiento	58	0:30	
Extensión	72	0:30	
Extensión final	72	7	1
Temperatura de conservación	4	indefinido	1

ENSAYO DE INMUNOFLUORESCENCIA

Para evidenciar los componentes celulares y virales se llevo a cabo ensayos de inmunofluorescencia, se sembraron 120,000 células BeWo por pozo en cubreobjetos, dentro de pozos en una placa de 24 pozos, se dejaron toda la noche para adherencia, y se realizaron ensayos de infección con RSV, posteriormente se fijaron las células con 300 µL de PFA al 4% durante 20 min, se retiró el PFA y se volvió a hacer un lavado con PBS, después las células se lavaron con solución de lavados (tritón al 0.5% disuelto en PBS 1x) 2 veces entre cada paso, posteriormente se permeabilizaron con 400 µL solución permeabilizadora (tritón al 0.5% y gelatina al 0.025 % disueltos en PBS 1x) durante 40 min,

pasado el tiempo se bloquearon con solución de bloqueo (tritón al 0.5% suero de chivo al 10% disueltos en PBS 1x) durante 1 h. Se retiró la solución de bloqueo y se incubó cada cubreobjetos con el anticuerpo anti-Zonula Ocludens (1:100) anticuerpo policlonal que reconoce las uniones estrechas o anticuerpo anti-Nucleoproteína de RSV (1:100), como anticuerpos secundarios se utilizaron CY3 (1:200) anti-conejo y FitC (1:200) anti-ratón. Se montó cada cubreobjetos en un portaobjetos con 4 μ L de DAPI. Las preparaciones fueron observadas por microscopía confocal.

ENSAYO DE CINÉTICA DE INFECCIÓN EN CÉLULAS BEWO DIFERENCIADAS POR RSV

Se realizaron ensayos de cinética de infección de las células BeWo previamente diferenciadas los cuales consistieron en crecer células BeWo diferenciadas a sincitiotrofoblastos en placas de 6 pozos para extraer proteína (aproximadamente 800,000 células por pozo) y en placas de 24 pozos para inmunofluorescencia (aproximadamente 120,000 células por pozo). Los pozos se infectaron con RSV a 0.1 y 1 MOI, uno de los pozos se utilizó como control sin virus y otro como células falsamente infectadas con virus inactivado por luz U.V., el resto servirán para la cinética. Se dejó adsorber el virus por 2 h a 37 °C y 5 % de CO₂, agitando suavemente cada 15 min. Una vez finalizado el tiempo de infección se retiró el inóculo, empezando por el control y se adicionó medio de mantenimiento, se incubó la placa durante 12, 24 y 36 horas y se fijaron los diferentes pozos.

RESULTADOS

EVALUACION DE LA TOXICIDAD DE cAMP SOBRE LAS CÉLULAS BEWO

Para evaluar la toxicidad del cAMP, los cultivos celulares se trataron con diferentes concentraciones de cAMP y se analizó la viabilidad de las células BeWo.

El ensayo demostró que la viabilidad celular disminuye de manera dosis dependiente, sin embargo, los tratamientos de cAMP con concentraciones de 100 μM y 150 μM tienen un efecto similar sobre la viabilidad de las células BeWo, por lo que al observar una viabilidad similar a la obtenida en la concentración menor de 100 μM (Fig. 5) y tener un mejor efecto diferenciador, se decidió trabajar con la concentración de 150 μM en el resto de los ensayos.

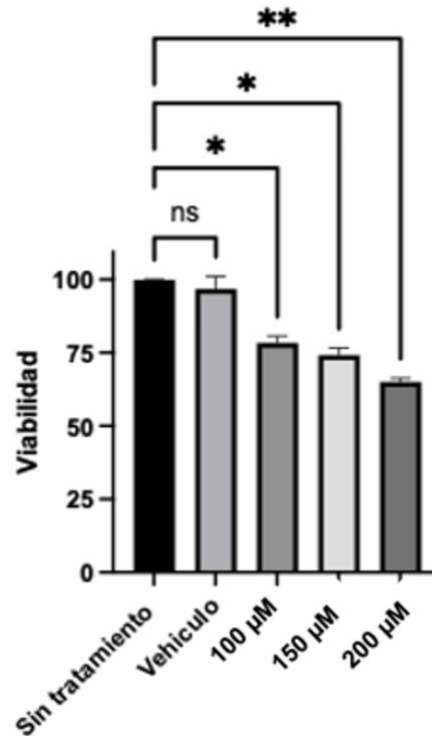


Figura 5 Evaluación de la toxicidad de cAMP sobre las células BeWo.

En esta figura, se muestran los porcentajes de viabilidad obtenidos para las células BeWo sin tratamiento, solo con el vehículo o con diferentes cocentraciones de cAMP (50 μM , 100 μM , 150 μM y 200 μM) donde no se encontró diferencia significativa entre las concentraciones de 100 μM y 150 μM no así en la concentración de 200 μM donde la diferencia aumenta en comparación con las concentraciones previas Cada valor representa la media \pm S.D. ($n = 3$). *, ** Significativamente diferente del control según la prueba t de Student (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$). n.s., no significativo.

CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS BEWO DIFERENCIADAS A SINCITIOTROFBLASTOS MEDIANTE ADMINISTRACIÓN DE cAMP

Para demostrar que las células BeWo empleadas en este trabajo están siendo diferenciadas a sincitiotrofbastos se utilizaron diferentes ensayos.

Los ensayos de transcriptómica que se llevaron a cabo en células BeWo y células BeWo diferenciadas a sincitiotrofoblastos, muestran el cambio en la expresión de SIK1 y Syn2 genes que codifican para las proteínas cinasa inducida por sal 1 y sincintina 2 respectivamente, marcadores específicos de diferenciación reportados previamente (Msheik et al., 2019).

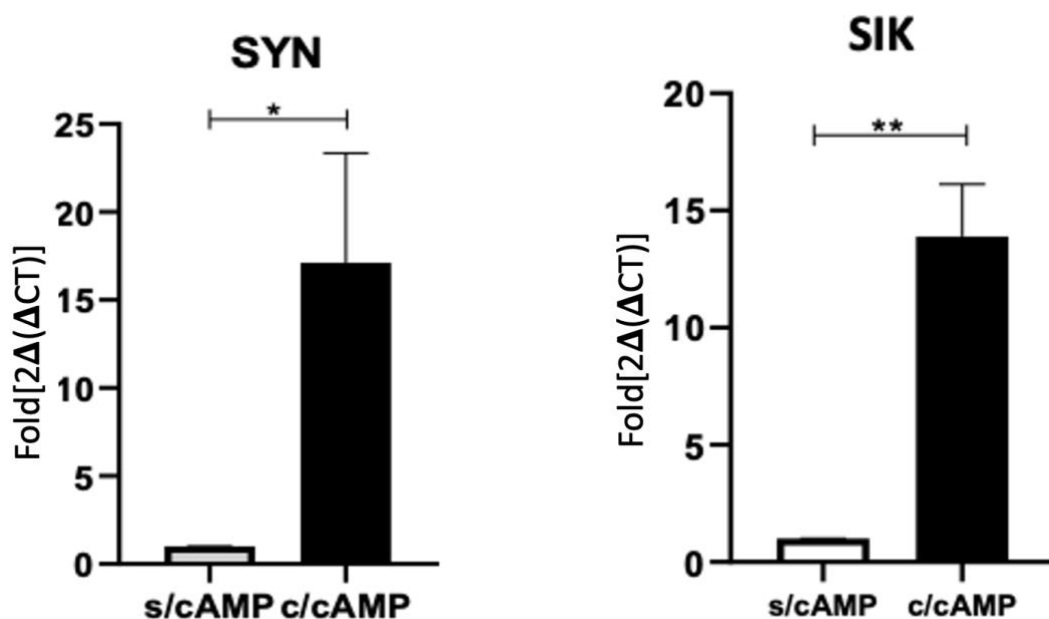


Figura 6 Expresión de marcadores de diferenciación en las células BeWo a nivel transcripcional.

Se muestra el cambio en la expresión de los marcadores de diferenciación sincintina 2 (izquierda) y la cinasa inducida por sal 1 (Derecha) donde se observa que en las células tratadas hay un aumento en la expresión de estos marcadores, no así en las células sin tratamiento donde no hay expresión. Cada valor representa la media \pm S.D. ($n = 3$). *, ** Significativamente diferente del control según la prueba t de Student (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$). n.s., no significativo.

Los resultados obtenidos en los ensayos realizados muestran que se induce un cambio en la expresión de los marcadores de diferenciación Syn2 y SIK1. Se observa que en las células tratadas hay un aumento significativo en la expresión de estos marcadores, no así en las células sin tratamiento donde no hay expresión (Fig. 6) lo que evidencia que el

tratamiento induce la expresión de genes involucrados en la diferenciación de esta línea celular a sincitiotrofoblastos.

Adicionalmente, para demostrarlo a nivel de expresión de la Dproteína, se realizó un Western Blot para determinar la cantidad de proteína sincintina 2 donde se encontró que las células BeWo tratadas con cAMP están sintetizando a la proteína sincintina 2 en contraste con las células no tratadas las cuales no expresan a la proteína sincintina 2 (Fig. 7).

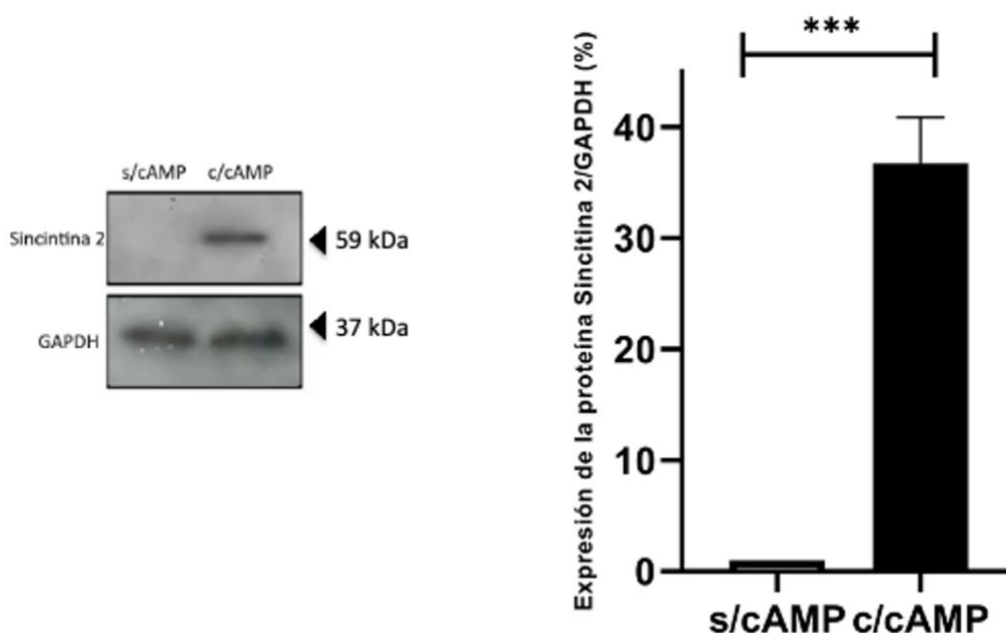


Figura 7 Expresión del marcadores de diferenciación sincintina 2 en las células BeWo a nivel de proteína.

Se muestra el cambio en la expresión del marcador de diferenciación sincintina 2 en el Western Blot (izquierda) y su respectiva densitometría (Derecha) donde se observa que en las células tratadas hay un aumento significativo en la presencia de esta proteína, no así en las células sin tratamiento donde no hay presencia de esta proteína. Cada valor representa la media \pm S.D. (n = 3). *, **, *** Significativamente diferente del control según la prueba t de Student (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ ***, $p < 0.001$). n.s., no significativo.

También se realizó un ensayo de inmunofluorescencia donde se tiñeron las células con DAPI para ver núcleos y anticuerpo anti-zónula ocludens (ZO-1) que tiñe las claudinas en las uniones entre células. Las células BeWo son células individuales bien delimitadas y los

sincitiotrofoblastos son células gigantes multinucleadas (Chen et al., 2013), En la tinción se aprecia un cambio morfológico en las células, se puede distinguir en las células BeWo sin tratamiento la llamada conformación de “reja de gallinero” y la aparición de células gigantes multinucleadas en las células tratadas con cAMP marcadas con flechas blancas (Fig. 8).

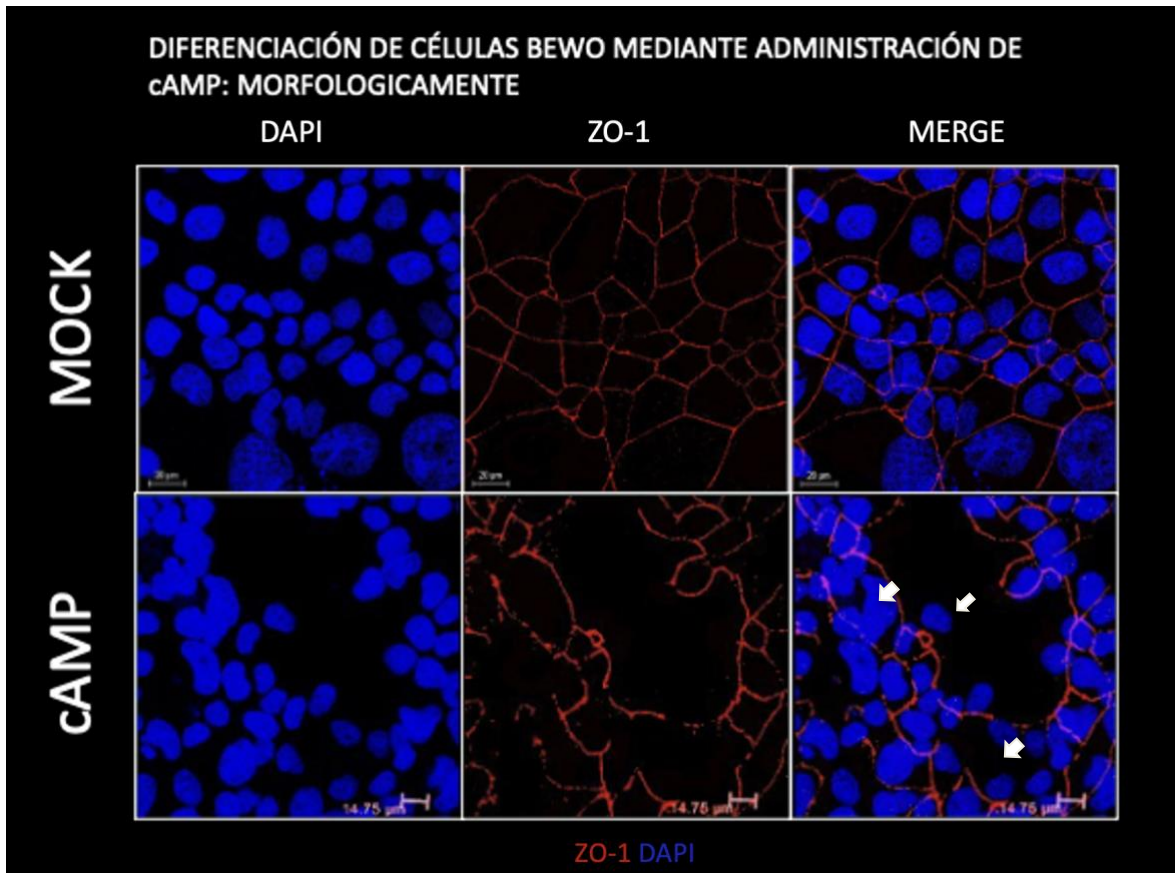


Figura 8 Cambio en la morfología de las células BeWo tratadas con cAMP evidenciado por tinción de inmunofluorescencia contra las uniones estrechas (ZO-1).

Se muestra el cambio en la morfología de las células BeWo, donde las células sin tratamiento (paneles superiores) mantienen una conformación de “reja de gallinero” con sus límites celulares bien definidos, no así las células tratadas con cAMP (paneles inferiores) donde se observa la aparición de células grandes con varios núcleos dentro del mismo límite celular (flechas blancas), lo que habla de una diferenciación morfológica de este modelo gracias al tratamiento de cAMP.

Para determinar la eficiencia de la diferenciación, se compararon 10 campos al microscopio, donde se contó el porcentaje de células conformadas por 1 solo o varios núcleos y se construyó una gráfica para presentar el resultado obtenido (Fig. 9) que demuestra que la

eficiencia de diferenciación, al menos a nivel morfológico es de alrededor del 40%, consistente con reportes previos (Msheik et al., 2019).

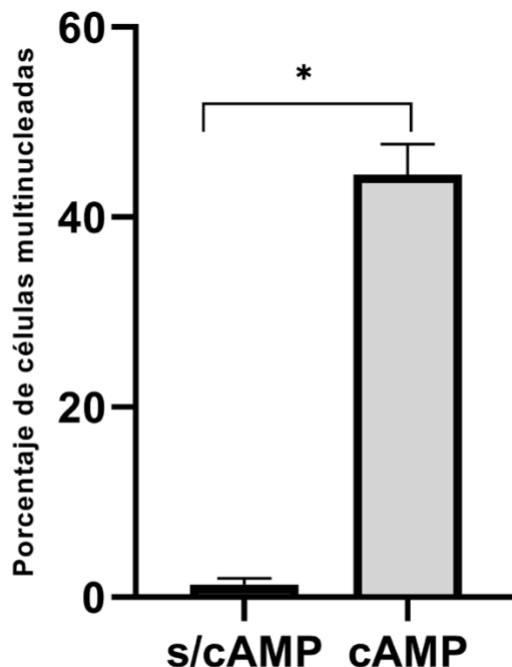


Figura 9 Porcentaje de células BeWo multinucleadas inducidas por el tratamiento con cAMP.

Se muestra el cambio en la morfología de las células BeWo, donde las células sin tratamiento (izquierda) no presentan células multinucleadas mientras que las células tratadas con cAMP (derecha) presentan un alto porcentaje de células multinucleadas, lo que habla de una diferenciación morfológica de este modelo gracias al tratamiento de cAMP.

CINÉTICA DE INFECCIÓN DE RSV EN CÉLULAS BEWO DIFERENCIADAS

Para demostrar que la línea celular BeWo diferenciada puede infectarse con RSV se realizó una cinética de infección en células diferenciadas y no diferenciadas infectando a 0.1 y 1 MOI, con la intención se analizar por inmunofluorescencia y Western Blot la susceptibilidad a la infección por RSV de nuestro modelo. Para esto se infectaron células BeWo sin diferenciar y diferenciadas, se dejaron incubar por 12, 24 y 36 horas, posteriormente se tiñeron con un anticuerpo contra la proteína N y otro anticuerpo contra las uniones estrechas

y se extrajeron proteínas totales para comparar la infección entre las condiciones diferenciadas y sin diferenciar.

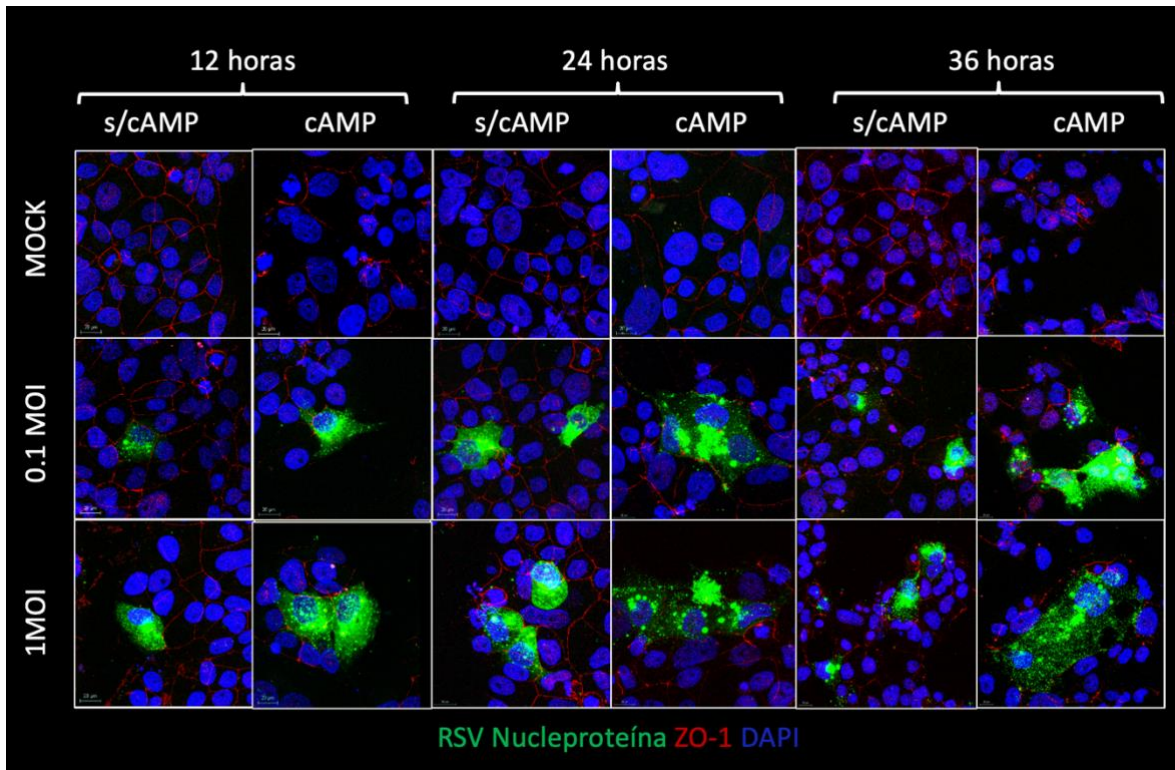


Figura 10 Cinética de infección por RSV en células BeWo diferenciadas y no diferenciadas.

Se observa la infección de las células BeWo diferenciadas y no diferenciadas a 12, 24 y 36 horas, donde la infección muestra un patrón distinto en la infección en las células diferenciadas además de que parece haber una mayor infección en las células BeWo diferenciadas.

En este ensayo se aprecia que las células BeWo diferenciadas se están infectando y presentan una distribución en la infección diferente en las células sin tratamiento (Fig. 10).

La infección en las células BeWo no diferenciadas está contenida dentro de las proteínas que delimitan los límites celulares y esto es consistente en los diferentes tiempos y multiplicidades de infección, no así en las células BeWo diferenciadas, donde en primer lugar se pierde la integridad de las uniones entre células y además la infección está presente en un área más extendida que abarca varios núcleos que no están separados por claudinas, lo que sugiere que la infección está presente en un sincitio.

Adicionalmente se hizo una cuenta de 10 campos a menor aumento (Fig. 11) en busca de núcleos asociados al marcador viral, donde se contaron aproximadamente 200 núcleos por campo y esta vez se observaron los núcleos que están rodeados de la proteína matriz de RSV.

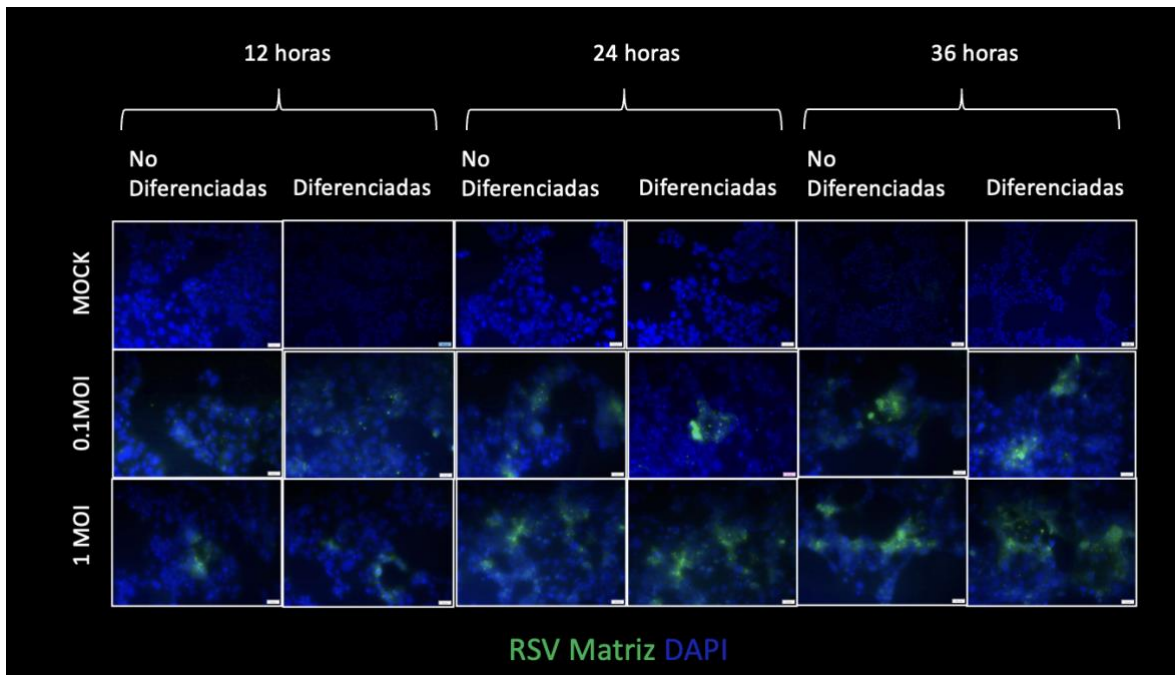


Figura 11 Porcentaje de células infectadas en la cinética de infección.

Se observan ejemplos de campos los cuales se usaron para determinar % de células infectadas por RSV, se contaron 10 campos y se obtuvo un promedio. Se muestra un aumento discreto en el porcentaje de células infectadas en las células diferenciadas en todos los casos.

De esta cuenta de campos se construyeron graficas (Fig. 12) para representar de manera semicuantitativa la diferencia en la susceptibilidad a la infección de las células BeWo diferenciadas y sin diferenciar. Los resultados se basaron en el conteo de núcleos asociados señal positiva de infección en comparación con el número total de núcleos por campo y muestran que hay un mayor número de células infectadas por campo en la condición de células diferenciadas en comparación con las células no diferenciadas para todos los tiempos y las diferentes multiplicidades de infección. Aun cuando no hay diferencia

significativa, existe una tendencia sugiriendo que las células diferenciadas podrían estar presentando una mayor susceptibilidad a la infección por RSV.

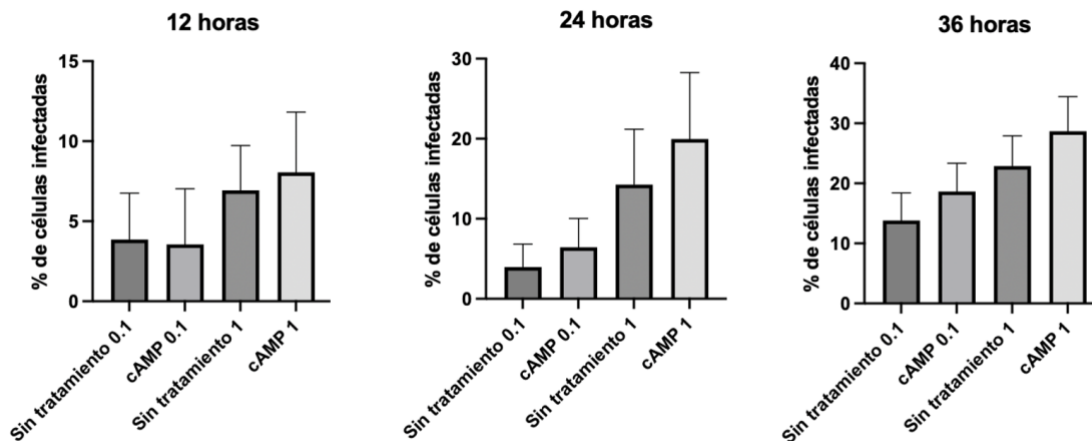


Figura 12 Representación gráfica del porcentaje de células infectadas en la cinética de infección.

Representación gráfica de los resultados obtenidos del porcentaje de células BeWo diferenciadas y no diferenciadas infectadas por RSV a dos diferentes multiplicidades de infección 0.1 y 1. Se observa la infección de las células BeWo diferenciadas y no diferenciadas a 12, 24 y 36 horas, de forma semicuantitativa donde se muestra un aumento discreto en el porcentaje de células infectadas en las células diferenciadas en todos los casos.

Para corroborar este dato, también se realizó el extracto de proteínas de la cinética de infección, a partir del cual se llevó a cabo un ensayo de Western Blot en busca de un cambio en la expresión de una proteína viral M2-1 entre células BeWo diferenciadas y no diferenciadas.

Los resultados de la figura 13 muestran un aumento discreto en la cantidad del marcador M2-1 en las células BeWo diferenciadas al compararlas con las células BeWo no diferenciadas (Fig. 13), esto es consistente con lo observado en las tinciones de inmunofluorescencia (Fig. 12) en donde la diferencia en la infección entre las células BeWo diferenciadas en comparación con las células BeWo no diferenciadas existe, aun que es un aumento discreto por lo que no se puede decir que el modelo presenta una mayor infección por RSV.

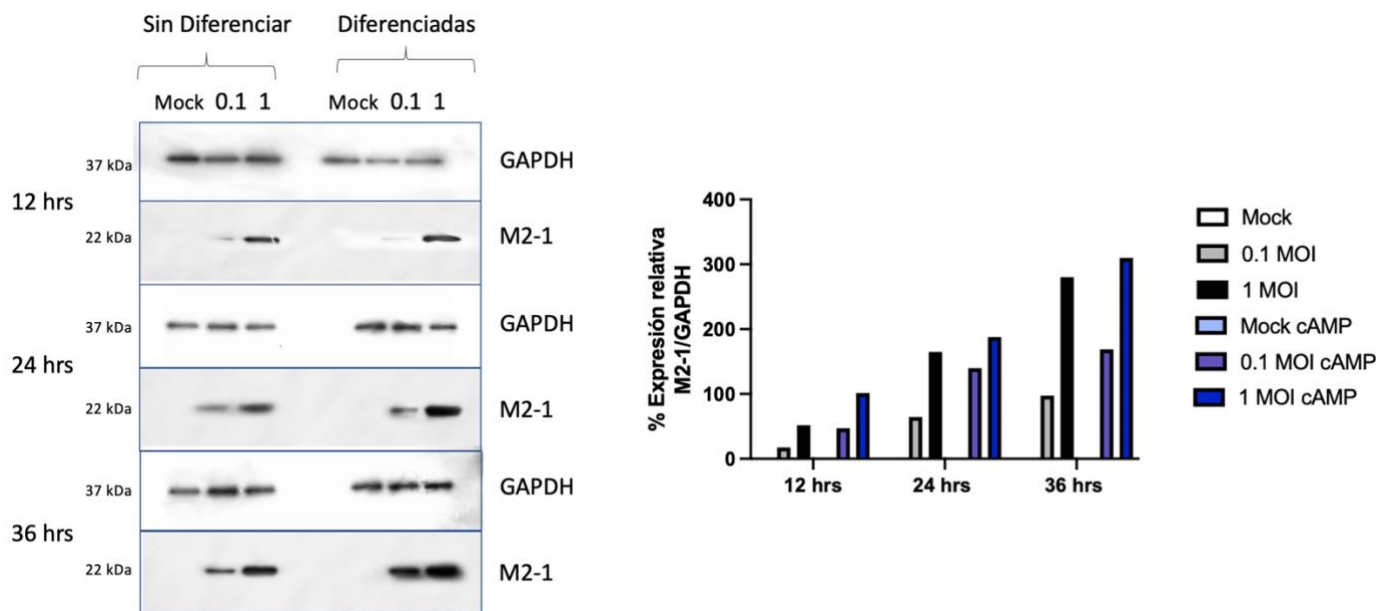


Figura 13 Cinética de infección por RSV en células BeWo diferenciadas.

En el panel izquierdo se muestra la expresión de la proteína M2-1 de RSV en células BeWo diferenciadas y no diferenciadas. Del lado derecho se presenta la gráfica de la expresión relativa del marcador viral M2-1 obtenida mediante densitometría de las bandas. Se observa la infección de las células BeWo diferenciadas y no diferenciadas a 12, 24 y 36 horas, se muestra un aumento discreto en el porcentaje de células infectadas en las células diferenciadas en todos los casos.

CAMBIO EN LA CANTIDAD DEL RECEPTOR NUCLEOLINA INDUCIDO POR EL TRATAMIENTO CON cAMP O LA INFECCIÓN POR RSV

Finalmente, en busca de una explicación al porqué de este leve aumento en la susceptibilidad del modelo diferenciado decidimos evaluar si existe algún cambio en la expresión de la nucleolina que funciona como receptor para RSV, y si su presencia podría estar aumentando inducida por el tratamiento con cAMP o la infección por RSV ya que este cambio podría explicar el ligero aumento en la infección de las células tratadas. Para determinar esto, se infectaron células BeWo sin diferenciar y diferenciadas con una MOI de 1 y se dejó la infección 24 horas. Posteriormente se hizo un extracto total de proteínas y se realizó un ensayo de Western Blot, en donde se observó que el aumento del receptor no depende de la diferenciación o de la infección de manera independiente, ya que las células tratadas con cAMP pero no infectadas y las infectadas pero no tratadas con cAMP no muestran un aumento del receptor nucleolina, no así las células tratadas e infectadas donde

si existe un aumento del receptor nucleolina. El resultado indica que ambos eventos, diferenciación e infección deben ocurrir simultáneamente para que se observe el aumento del receptor.

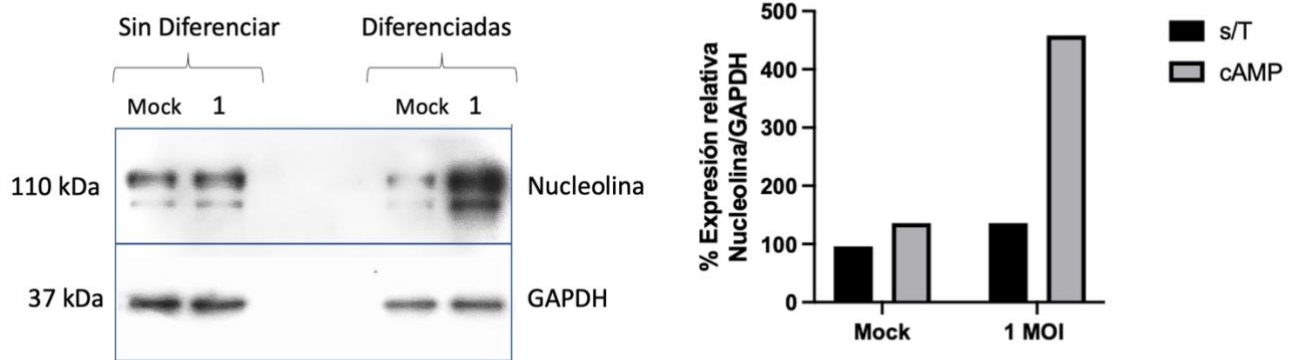


Figura 14 Cambio en la cantidad relativa del receptor de RSV nucleolina en las células BeWo diferenciadas inducido por el tratamiento de cAMP o la infección por RSV.

Se muestra el cambio en la cantidad del receptor nucleolina, donde se aprecia que ni el tratamiento de cAMP ni la infección de RSV (1 MOI, 24 horas) por si solas inducen un cambio en la cantidad de este receptor, no así en las células tratadas e infectadas, lo que puede sugerir un efecto sinérgico entre la infección y la diferenciación de las células BeWo, que favorece la síntesis de la proteína nucleolina.

DISCUSIÓN

Este trabajo es el primero del que tenemos conocimiento en el cual se utiliza el mecanismo de diferenciación de las células BeWo in vitro para estudiar una infección viral en el contexto perinatal. Los resultados obtenidos son evidencia de que las células BeWo diferenciadas a sincitiotrofoblastos pueden funcionar como un modelo de estudio del RSV ya que sugieren que las células BeWo diferenciadas infectadas por RSV están permitiendo eventos de replicación y traducción del genoma viral, se observó que las células BeWo diferenciadas presentan características similares a las de un sincitiotrofoblasto y pueden ser infectadas por RSV. En este trabajo se observó que se comportan distinto a las células BeWo sin diferenciar al ser infectadas con RSV, siendo la diferencia más notoria el cambio en la

distribución del marcador viral en el espacio subcelular durante la infección y en menor medida la susceptibilidad a la infección. La proteína N de RSV que conforma la nucleocápside viral tiene un cambio en su distribución durante la infección de este modelo, ya que en las células no diferenciadas se observa concentrada alrededor de núcleos en células bien delimitadas, no así en las células diferenciadas donde se observa un patrón más difuso que además suele abarcar más de un núcleo en células cuyos límites celulares abarcan más de un núcleo, lo que implica que los cambios en la morfología pueden estar teniendo un efecto en el ciclo de infección, aunque más estudios se requieren para corroborar esta aseveración.

Con base en lo observado en la cinética de infección, se observa un aumento en la presencia del marcador viral conforme aumenta el tiempo, las células BeWo diferenciadas a sincitiotrofbastos parecen tener una mayor susceptibilidad a la infección por RSV, pues se observa un leve aumento en la cantidad de marcador viral tanto por ensayos de inmunofluorescencia como por Western Blot, sin embargo, es un aumento discreto.

En un trabajo previo de nuestro mismo equipo denominado: *“La línea celular BeWo derivada de un coriocarcinoma de placenta humana es permisiva para la infección por el virus sincicial respiratorio”* se demostró que la línea BeWo es susceptible a la infección por RSV y produce partículas virales infectivas (Velázquez-Cervantez et al., 2019), esta es evidencia de que un modelo celular de trofbastos puede estar replicando de forma productiva el virus, pero para llegar a estas células in vivo el virus primero tiene que atravesar la barrera placentaria constituida de sincitiotrofbastos. En general suele pensarse que estas células son resistentes a las infecciones (Koi et al. ., 2002) y por eso son excelentes como una barrera protectora, sin embargo, existe evidencia de que algunos virus si pueden atravesar, por diversos mecanismos, esta barrera que es la mejor línea de defensa del feto a los

patógenos que pueden circular en la sangre materna (Esucher et al., 2001, Schleiss et al., 2007, Argueta et al., 2021).

Uno de los mecanismos menos comunes para sobreponerse a esta barrera consiste en que los virus infecten a los mismos sincitiotrofoblastos en los cuales se puede llevar a cabo la replicación viral, provocando un daño a la estructura placentaria, y la detonación de un ambiente pro-inflamatorio que genera daño tisular y la diseminación del virus a otras estructuras de la interfase materno-fetal hasta llegar al mismo feto donde puede infectarlo y empezar a causar efectos adversos durante el embarazo y en la vida temprana del neonato donde se ha relacionado fuertemente a la infección del RSV con la aparición de enfermedades crónicas como el asma ya que al infectarse en sus primeros meses de vida, los bebés sufren desarrollo anómalo de su aparato respiratorio y se ha asociado a las infecciones por RSV como el agente externo más importante para el desarrollo de asma en niños (Sigurs et al., 2000).

Interesantemente también se encontró que las células BeWo diferenciadas a sincitiotrofoblastos al ser infectadas con RSV aumentan la expresión de nucleolina (Fig. 13). Nucleolina es una proteína involucrada en el correcto funcionamiento de los cinetocoros (Ma et al., 2007) y se asocia a los ribosomas, en donde se ha descrito que tiene un papel de represor transcripcional, y se asocia a mRNA para regular la transcripción de algunos genes, particularmente involucrados con apoptosis celular (Jiang et al., 2009). En el contexto de la infección por RSV, nucleolina es importante pues es el principal receptor para la entrada viral (Currier et al., 2016). Hasta ahora no tenemos conocimiento de que se hubieran evaluado los niveles de nucleolina durante la infección con RSV en el contexto perinatal, pero nuestros resultados indican que aumenta su expresión en las células BeWo diferenciadas a sincitiotrofoblastos no así en las células BeWo. Esto puede estar siendo provocado porque los sincitiotrofoblastos empiezan la cascada de señalización apoptótica

en el momento en el que comienza su fusión durante el proceso de diferenciación (Ishihara et al., 2002), no así las células BeWo sin diferenciar. Como antecedente de esto Hu y colaboradores trabajaron con infección de neuroblastos de ratón infectados por RSV en donde se encontró que durante la infección por RSV la proteína nucleolina tiene una expresión modulada por la infección en comparación con las células sin infectar, y donde se asocia con daño celular, procesos de apoptosis y expresión de proteínas de la respuesta inmune. Jiang y colaboradores proporcionaron evidencia de que nucleolina es un efector abaja esencial de Hsp70, una proteína de choque térmico implicada en el plegamiento de proteínas. Nucleolina y Hsp70 en conjunto confieren protección a los cardiomiocitos contra la apoptosis inducida por el estrés oxidativo, siguiendo esta idea, se ha reportado que RSV produce estrés oxidativo en las células que infecta por lo que podría estar por este mecanismo induciéndose la expresión de nucleolina durante la infección de las células diferenciadas a sincitiotrofbastos desempeñando un papel regulador de genes apoptóticos (Mi et al., 2003), esto puede estar siendo aprovechado por RSV para mantener a la célula replicando al virus por más tiempo lo que se traduciría en una mayor replicación viral. Con estos resultados este trabajo brinda un primer acercamiento a la posibilidad de que el RSV este infectando a los sincitiotrofbastos, y proporciona un modelo potencial para el estudio de la biología del RSV en este tejido, ya que es difícil obtener muestras de tejido sano para trabajar con explantes o cultivos primarios de sincitiotrofbastos de placenta humana, en especial cuando se busca trabajar con sincitiotrofbastos de primer o segundo trimestre, tiempos en los cuales el tejido solo se puede obtener de abortos que suelen estar relacionados con enfermedades que pueden descalificar las muestras para su trabajo en el laboratorio.

En conjunto estos resultados demuestran que es posible que este modelo de células BeWo diferenciadas a sincitiotrofbastos pueda utilizarse como modelo de estudio en infecciones

virales no solo para RSV sino también para otros virus de interés perinatal para llevar a cabo un primer acercamiento y comenzar a dilucidar mecanismos importantes en la biología de estos virus y eventualmente con las evidencias proporcionadas por este modelo escalarlo a modelo animal o aislados primarios pero con una mejor base y una idea mas clara de si los proyectos serán factibles o no.

CONCLUSIONES

1. Los resultados de este trabajo muestran que la línea celular BeWo diferenciada a sincitiotrofbastos es permisiva a la infección con RSV.
2. El modelo de células BeWo diferenciadas a sincitiotrofbastos presenta una susceptibilidad ligeramente mayor a la infección por RSV.
3. La infección del modelo de células BeWo diferenciadas a sincitiotrofbastos por RSV induce la expresión de la proteína nucleolina.

PERSPECTIVAS

- Realizar un ensayo de unidades formadoras de placas líticas de sobrenadantes del modelo BeWo SIN infectado con RSV.
- Realizar una cinética de infección de RSV en el modelo BeWo SIN y medir el cambio de expresión de nucleolina en distintos tiempos.

REFERENCIAS

1. Anderson LJ, Jadhao SJ, Paden CR, Tong S. Functional Features of the Respiratory Syncytial Virus G Protein. *Viruses*. 2021 Jul 1;13(7):1214. doi: 10.3390/v13071214. PMID: 34372490; PMCID: PMC8310105.
2. Apaza Valencia, J. (2014). Desarrollo placentario temprano: aspectos fisiopatológicos. *Rev. Peru. Ginecol. Obstet.* 60, 131–140.
3. Argueta LB, Lacko LA, Bram Y, Tada T, Carrau L, Zhang T, Uhl S, Lubor BC, Chandar V, Gil C, Zhang W, Dodson B, Bastiaans J, Prabhu M, Salvatore CM, Yang YJ, Baergen RN, tenOever BR, Landau NR, Chen S, Schwartz RE, Stuhlmann H. SARS-CoV-2 Infects Syncytiotrophoblast and Activates Inflammatory Responses in the Placenta. *bioRxiv* [Preprint]. 2021 Jun 17:2021.06.01.446676. doi:

- 10.1101/2021.06.01.446676. Update in: *iScience*. 2022 May 20;25(5):104223. PMID: 34100019; PMCID: PMC8183016.
4. Bajorek, M., Galloux, M., Richard, C.-A., Szekely, O., Rosenzweig, R., Sizun, C., & Eleouët, J.-F. (2021). Tetramerization of Phosphoprotein Is Essential for Respiratory Syncytial Virus Budding while Its N-Terminal Region Mediates Direct Interactions with the Matrix Protein. *Journal of Virology*, 95(7), e02217-20. <https://doi.org/10.1128/JVI.02217-20>
 5. Balakrishnan, A., Price, E., Luu, C., Shaul, J., Wartchow, C., Cantwell, J., Vo, T., DiDonato, M., Spraggon, G., & Hekmat-Nejad, M. (2020). Biochemical Characterization of Respiratory Syncytial Virus RNA-Dependent RNA Polymerase Complex. *ACS Infectious Diseases*, 6(10), 2800-2811. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00554>
 6. Ballou M, Cates KL, Rowe JC, Goetz C, Desbonnet C. Development of the immune system in very low birth weight (less than 1500 g) premature infants: concentrations of plasma immunoglobulins and patterns of infections. *Pediatr Res*. 1986 Sep;20(9):899-904. doi: 10.1203/00006450-198609000-00019. PMID: 3748663.
 7. Barik, S. (1992). Transcription of human respiratory syncytial virus genome RNA in vitro: Requirement of cellular factor(s). *Journal of Virology*, 66(11), 6813-6818.
 8. Battles, M. B., & McLellan, J. S. (2019). Respiratory syncytial virus entry and how to block it. *Nature Reviews Microbiology*, 17(4), 233-245. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0149-x>
 9. Beavis, A. C., Tran, K. C., Barrozo, E. R., Phan, S. I., Teng, M. N., & He, B. (2021). Respiratory Syncytial Virus Phosphoprotein Residue S156 Plays a Role in Regulating Genome Transcription and Replication. *Journal of Virology*, 95(24), e0120621. <https://doi.org/10.1128/JVI.01206-21>
 10. Benítez-Guerra D, Piña-Flores C, Zamora-López M, Escalante-Padrón F, Lima-Rogel V, González-Ortiz AM, Guevara-Tovar M, Bernal-Silva S, Benito-Cruz B, Castillo-Martínez F, Martínez-Rodríguez LE, Ramírez-Ojeda V, Tello-Martínez N, Lomelí-Valdez R, Salto-Quintana J, Cadena-Mota S, Noyola DE. Respiratory syncytial virus acute respiratory infection-associated hospitalizations in preterm Mexican infants: A cohort study. *Influenza Other Respir Viruses*. 2020 Mar;14(2):182-188. doi: 10.1111/irv.12708. Epub 2020 Jan 9. PMID: 31917902; PMCID: PMC7040972.
 11. Blondot, M.-L., Dubosclard, V., Fix, J., Lassoued, S., Aumont-Nicaise, M., Bontems, F., Eléouët, J.-F., & Sizun, C. (2012). Structure and functional analysis of the RNA- and viral phosphoprotein-binding domain of respiratory syncytial virus M2-1 protein. *PLoS Pathogens*, 8(5), e1002734. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002734>
 12. BLOUNT RE Jr, MORRIS JA, SAVAGE RE. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1956 Jul;92(3):544-9. doi: 10.3181/00379727-92-22538. PMID: 13359460.
 13. Bokun V, Moore JJ, Moore R, Smallcombe CC, Harford TJ, Rezaee F, Esper F, Piedimonte G. Respiratory syncytial virus exhibits differential tropism for distinct human placental cell types with Hofbauer cells acting as a permissive reservoir for infection. *PLoS One*. 2019 Dec 2;14(12):e0225767. doi: 10.1371/journal.pone.0225767. PMID: 31790466; PMCID: PMC6886783.
 14. Borchers AT, Chang C, Gershwin ME, Gershwin LJ. Respiratory syncytial virus--a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2013 Dec;45(3):331-79. doi: 10.1007/s12016-013-8368-9. PMID: 23575961; PMCID: PMC7090643.
 15. Bouillier, C., Cosentino, G., Léger, T., Rincheval, V., Richard, C.-A., Desquesnes, A., Sitterlin, D., Blouquit-Laye, S., Eléouët, J.-F., Gault, E., & Rameix-Welti, M.-A. (2019). The Interactome analysis of the Respiratory Syncytial Virus protein M2-1

- suggests a new role in viral mRNA metabolism post-transcription. *Scientific Reports*, 9(1), 15258. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51746-0>
16. Brown PM, Harford TJ, Agrawal V, Yen-Lieberman B, Rezaee F, Piedimonte G. Prenatal Exposure to Respiratory Syncytial Virus Alters Postnatal Immunity and Airway Smooth Muscle Contractility during Early-Life Reinfections. *PLoS One*. 2017 Feb 8;12(2):e0168786. doi: 10.1371/journal.pone.0168786. PMID: 28178290; PMCID: PMC5298216.
 17. Campbell AP, Chien JW, Kuypers J, Englund JA, Wald A, Guthrie KA, Corey L, Boeckh M. Respiratory virus pneumonia after hematopoietic cell transplantation (HCT): associations between viral load in bronchoalveolar lavage samples, viral RNA detection in serum samples, and clinical outcomes of HCT. *J Infect Dis*. 2010 May 1;201(9):1404-13. doi: 10.1086/651662. PMID: 20350162; PMCID: PMC2853730.
 18. Chang, T.-H., Segovia, J., Sabbah, A., Mgbemena, V., & Bose, S. (2012). Cholesterol- rich lipid rafts are required for release of infectious human respiratory syncytial virus particles. *Virology*, 422(2), 205-213. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.10.029>
 19. Chaw L, Kamigaki T, Burmaa A, Urtnasan C, Od I, Nyamaa G, Nymadawa P, Oshitani H. Burden of Influenza and Respiratory Syncytial Virus Infection in Pregnant Women and Infants Under 6 Months in Mongolia: A Prospective Cohort Study. *PLoS One*. 2016 Feb 5;11(2):e0148421. doi: 10.1371/journal.pone.0148421. PMID: 26849042; PMCID: PMC4746066.
 20. Chen Y, Allars M, Pan X, Maiti K, Angeli G, Smith R, Nicholson RC. Effects of corticotrophin releasing hormone (CRH) on cell viability and differentiation in the human BeWo choriocarcinoma cell line: a potential syncytialisation inducer distinct from cyclic adenosine monophosphate (cAMP). *Reprod Biol Endocrinol*. 2013 Apr 15;11:30. doi: 10.1186/1477-7827-11-30. PMID: 23587111; PMCID: PMC3639788.
 21. Chu HY, Katz J, Tielsch J, Khatri SK, Shrestha L, LeClerq SC, Magaret A, Kuypers J, Steinhoff M, Englund JA. Respiratory syncytial virus infection in infants in rural Nepal. *J Infect*. 2016 Aug;73(2):145-54. doi: 10.1016/j.jinf.2016.05.007. Epub 2016 May 27. PMID: 27241525; PMCID: PMC4942356.
 22. Chu HY, Tielsch J, Katz J, Magaret AS, Khatri S, LeClerq SC, Shrestha L, Kuypers J, Steinhoff MC, Englund JA. Transplacental transfer of maternal respiratory syncytial virus (RSV) antibody and protection against RSV disease in infants in rural Nepal. *J Clin Virol*. 2017 Oct;95:90-95. doi: 10.1016/j.jcv.2017.08.017. Epub 2017 Sep 2. PMID: 28903080; PMCID: PMC5625849.
 23. Collins PL, Fearn R, Graham BS. Respiratory syncytial virus: virology, reverse genetics, and pathogenesis of disease. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013;372:3-38. doi: 10.1007/978-3-642-38919-1_1. PMID: 24362682; PMCID: PMC4794264.
 24. Corzo-López, Mylene; Valdés-Ramírez, Odalys (2013). El virus sincitial respiratorio humano: una panorámica. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, vol. 44, núm. 2, mayo-agosto, 2013 Centro Nacional de Investigaciones Científicas Ciudad de La Habana, Cuba
 25. Costello MJ, Joyce SK, Abrahams VM. NOD protein expression and function in first trimester trophoblast cells. *Am J Reprod Immunol*. 2007 Jan;57(1):67-80. doi: 10.1111/j.1600-0897.2006.00447.x. PMID: 17156193.
 26. Coyne CB, Lazear HM. Zika virus - reigniting the TORCH. *Nat Rev Microbiol*. 2016 Nov;14(11):707-715. doi: 10.1038/nrmicro.2016.125. Epub 2016 Aug 30. PMID: 27573577.
 27. Currier, M. G., Lee, S., Stobart, C. C., Hotard, A. L., Villenave, R., Meng, J., Pretto, C. D., Shields, M. D., Nguyen, M. T., Todd, S. O., Chi, M. H., Hammonds, J., Krumm, S. A., Spearman, P., Plemper, R. K., Sakamoto, K., Jr, R. S. P., Power, U. F., &

- Moore, M. L. (2016). EGFR Interacts with the Fusion Protein of Respiratory Syncytial Virus Strain 2-20 and Mediates Infection and Mucin Expression. *PLOS Pathogens*, 12(5), e1005622. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005622>
28. Efstathiou C, Abidi SH, Harker J, Stevenson NJ. Revisiting respiratory syncytial virus's interaction with host immunity, towards novel therapeutics. *Cell Mol Life Sci*. 2020 Dec;77(24):5045-5058. doi: 10.1007/s00018-020-03557-0. Epub 2020 Jun 16. PMID: 32556372; PMCID: PMC7298439.
 29. Elliott J, Lynch OT, Suessmuth Y, Qian P, Boyd CR, Burrows JF, Buick R, Stevenson NJ, Touzelet O, Gadina M, Power UF, Johnston JA. Respiratory syncytial virus NS1 protein degrades STAT2 by using the Elongin-Cullin E3 ligase. *J Virol*. 2007 Apr;81(7):3428-36. doi: 10.1128/JVI.02303-06. Epub 2007 Jan 24. PMID: 17251292; PMCID: PMC1866062.
 30. Euscher E, Davis J, Holzman I, Nuovo GJ. Coxsackie virus infection of the placenta associated with neurodevelopmental delays in the newborn. *Obstet Gynecol*. 2001 Dec;98(6):1019-26. doi: 10.1016/s0029-7844(01)01625-8. PMID: 11755547.
 31. Fearn, R., Peeples, M. E., & Collins, P. L. (2002). Mapping the Transcription and Replication Promoters of Respiratory Syncytial Virus. *Journal of Virology*, 76(4), 1663- 1672. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.4.1663-1672.2002>
 32. Feng Z, Xu L, Xie Z. Receptors for Respiratory Syncytial Virus Infection and Host Factors Regulating the Life Cycle of Respiratory Syncytial Virus. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022 Feb 25;12:858629. doi: 10.3389/fcimb.2022.858629. PMID: 35281439; PMCID: PMC8913501.
 33. Fernandes-Matano L, Monroy-Muñoz IE, Angeles-Martínez J, Sarquiz-Martinez B, Palomec-Nava ID, Pardavé-Alejandro HD, Santos Coy-Arechavaleta A, Santacruz-Tinoco CE, González-Ibarra J, González-Bonilla CR, Muñoz-Medina JE. Prevalence of non-influenza respiratory viruses in acute respiratory infection cases in Mexico. *PLoS One*. 2017 May 3;12(5):e0176298. doi: 10.1371/journal.pone.0176298. PMID: 28467515; PMCID: PMC5415110.
 34. Fonceca AM, Flanagan BF, Trinick R, Smyth RL, McNamara PS. Primary airway epithelial cultures from children are highly permissive to respiratory syncytial virus infection. *Thorax*. 2012 Jan;67(1):42-8. doi: 10.1136/thoraxjnl-2011-200131. Epub 2011 Aug 23. PMID: 21865207.
 35. Förster, A., Maertens, G. N., Farrell, P. J., & Bajorek, M. (2015). Dimerization of matrix protein is required for budding of respiratory syncytial virus. *Journal of Virology*, 89(8), 4624-4635. <https://doi.org/10.1128/JVI.03500-14>
 36. Galloux, M., Gabiane, G., Sourimant, J., Richard, C.-A., England, P., Moudjou, M., Aumont-Nicaise, M., Fix, J., Rameix-Welti, M.-A., & Eléouët, J.-F. (2015). Identification and Characterization of the Binding Site of the Respiratory Syncytial Virus Phosphoprotein to RNA-Free Nucleoprotein. *Journal of Virology*, 89(7), 3484-3496. <https://doi.org/10.1128/JVI.03666-14>
 37. Galloux, M., Risso-Ballester, J., Richard, C.-A., Fix, J., Rameix-Welti, M.-A., & Eléouët, J.-F. (2020). Minimal Elements Required for the Formation of Respiratory Syncytial Virus Cytoplasmic Inclusion Bodies In Vivo and In Vitro. *mBio*, 11(5), e01202-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.01202-20>
 38. Gamiño-Arroyo AE, Moreno-Espinosa S, Llamosas-Gallardo B, Ortiz-Hernández AA, Guerrero ML, Galindo-Fraga A, Galán-Herrera JF, Prado-Galbarro FJ, Beigel JH, Ruiz-Palacios GM, Noyola DE; Mexico Emerging Infectious Diseases Clinical Research Network (La Red). Epidemiology and clinical characteristics of respiratory syncytial virus infections among children and adults in Mexico. *Influenza Other Respir Viruses*. 2017 Jan;11(1):48-56. doi: 10.1111/irv.12414. Epub 2016 Aug 18. PMID: 27439650; PMCID: PMC5155644.

39. Gan SW, Tan E, Lin X, Yu D, Wang J, Tan GM, Vararattanavech A, Yeo CY, Soon CH, Soong TW, Pervushin K, Torres J. The small hydrophobic protein of the human respiratory syncytial virus forms pentameric ion channels. *J Biol Chem.* 2012 Jul 13;287(29):24671-89. doi: 10.1074/jbc.M111.332791. Epub 2012 May 23. PMID: 22621926; PMCID: PMC3397895.
40. Ghildyal R, Mills J, Murray M, Vardaxis N, Meanger J. Respiratory syncytial virus matrix protein associates with nucleocapsids in infected cells. *J Gen Virol.* 2002 Apr;83(Pt 4):753-757. doi: 10.1099/0022-1317-83-4-753. PMID: 11907323.
41. Gilman MSA, Furmanova-Hollenstein P, Pascual G, B van 't Wout A, Langedijk JPM, McLellan JS. Transient opening of trimeric prefusion RSV F proteins. *Nat Commun.* 2019 May 8;10(1):2105. doi: 10.1038/s41467-019-09807-5. PMID: 31068578; PMCID: PMC6506550.
42. Gilman, M. S. A., Liu, C., Fung, A., Behera, I., Jordan, P., Rigaux, P., Ysebaert, N., Tcherniuk, S., Sourimant, J., Eléouët, J.-F., Sutto-Ortiz, P., Decroly, E., Roymans, D., Jin, Z., & McLellan, J. S. (2019). Structure of the Respiratory Syncytial Virus Polymerase Complex. *Cell*, 179(1), 193-204.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.08.014>
43. Goswami R, Majumdar T, Dhar J, Chattopadhyay S, Bandyopadhyay SK, Verbovetskaya V, Sen GC, Barik S. Viral degradasome hijacks mitochondria to suppress innate immunity. *Cell Res.* 2013 Aug;23(8):1025-42. doi: 10.1038/cr.2013.98. Epub 2013 Jul 23. PMID: 23877405; PMCID: PMC3731571.
44. Griffiths, C. D., Bilawchuk, L. M., McDonough, J. E., Jamieson, K. C., Elawar, F., Cen, Y., Duan, W., Lin, C., Song, H., Casanova, J.-L., Ogg, S., Jensen, L. D., Thienpont, B., Kumar, A., Hobman, T. C., Proud, D., Moraes, T. J., & Marchant, D. J. (2020). IGF1R is an entry receptor for respiratory syncytial virus. *Nature*, 583(7817), 615-619. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2369-7>
45. Hall CB. The burgeoning burden of respiratory syncytial virus among children. *Infect Disord Drug Targets.* 2012 Apr;12(2):92-7. doi: 10.2174/187152612800100099. PMID: 22335498.
46. Hallak, L. K., Kwilas, S. A., & Peeples, M. E. (2007). Interaction between respiratory syncytial virus and glycosaminoglycans, including heparan sulfate. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 379, 15-34. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-393-6_2
47. Hause AM, Avadhanula V, Maccato ML, Pinell PM, Bond N, Santarcangelo P, Ferlic-Stark L, Ye X, Iwuchukwu O, Maurer L, Aideyan L, Dao K, McBride T, Piedra PA, Munoz FM. Clinical characteristics and outcomes of respiratory syncytial virus infection in pregnant women. *Vaccine.* 2019 Jun 6;37(26):3464-3471. doi: 10.1016/j.vaccine.2019.04.098. Epub 2019 May 10. PMID: 31085002; PMCID: PMC7126758.
48. Hernández D, Zárate K, Tirado R, et al. Estudio piloto de infecciones respiratorias agudas en coinfecciones virales (VSRh, MPVh) y su impacto en las manifestaciones clínicas, diagnósticas y epidemiológicas. *Contacto Químico.* 2016;16(14):7-13.
49. Ishihara N, Matsuo H, Murakoshi H, Laoag-Fernandez JB, Samoto T, Maruo T. Increased apoptosis in the syncytiotrophoblast in human term placentas complicated by either preeclampsia or intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol.* 2002 Jan;186(1):158-66. doi: 10.1067/mob.2002.119176. PMID: 11810103.
50. Jiang B, Zhang B, Liang P, Song J, Deng H, Tu Z, Deng G, Xiao X. Nucleolin/C23 mediates the antiapoptotic effect of heat shock protein 70 during oxidative stress. *FEBS J.* 2010 Feb;277(3):642-52. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07510.x. Epub 2009 Dec 29. PMID: 20050922.

51. Kalinowski A, Galen BT, Ueki IF, Sun Y, Mulenos A, Osafo-Addo A, Clark B, Joerns J, Liu W, Nadel JA, Dela Cruz CS, Koff JL. Respiratory syncytial virus activates epidermal growth factor receptor to suppress interferon regulatory factor 1-dependent interferon-lambda and antiviral defense in airway epithelium. *Mucosal Immunol.* 2018 May;11(3):958-967. doi: 10.1038/mi.2017.120. Epub 2018 Feb 7. PMID: 29411775; PMCID: PMC6431552.
52. King AE, Paltoo A, Kelly RW, Sallenave JM, Bocking AD, Challis JR. Expression of natural antimicrobials by human placenta and fetal membranes. *Placenta.* 2007 Feb-Mar;28(2-3):161-9. doi: 10.1016/j.placenta.2006.01.006. Epub 2006 Feb 28. PMID: 16513165.
53. King T, Mejias A, Ramilo O, Peeples ME. The larger attachment glycoprotein of respiratory syncytial virus produced in primary human bronchial epithelial cultures reduces infectivity for cell lines. *PLoS Pathog.* 2021 Apr 8;17(4):e1009469. doi: 10.1371/journal.ppat.1009469. PMID: 33831114; PMCID: PMC8057581.
54. Kiss G, Holl JM, Williams GM, Alonas E, Vanover D, Lifland AW, Gudheti M, Guerrero-Ferreira RC, Nair V, Yi H, Graham BS, Santangelo PJ, Wright ER. Structural analysis of respiratory syncytial virus reveals the position of M2-1 between the matrix protein and the ribonucleoprotein complex. *J Virol.* 2014 Jul;88(13):7602-17. doi: 10.1128/JVI.00256-14. Epub 2014 Apr 23. PMID: 24760890; PMCID: PMC4054448.
55. Koi H, Zhang J, Makrigiannakis A, Getsios S, MacCalman CD, Strauss JF 3rd, Parry S. Syncytiotrophoblast is a barrier to maternal-fetal transmission of herpes simplex virus. *Biol Reprod.* 2002 Nov;67(5):1572-9. doi: 10.1095/biolreprod.102.004325. PMID: 12390890.
56. Krzyzaniak MA, Zumstein MT, Gerez JA, Picotti P, Helenius A. Host cell entry of respiratory syncytial virus involves macropinocytosis followed by proteolytic activation of the F protein. *PLoS Pathog.* 2013;9(4):e1003309. doi: 10.1371/journal.ppat.1003309. Epub 2013 Apr 11. PMID: 23593008; PMCID: PMC3623752.
57. Kuo, L., Grosfeld, H., Cristina, J., Hill, M. G., & Collins, P. L. (1996). Effects of mutations in the gene-start and gene-end sequence motifs on transcription of monocistronic and dicistronic minigenomes of respiratory syncytial virus. *Journal of Virology*, 70(10), 6892- 6901. <https://doi.org/10.1128/jvi.70.10.6892-6901.1996>
58. León-Juárez M, Martínez-Castillo M, González-García LD, Helguera-Repetto AC, Zaga-Clavellina V, García-Cordero J, Flores-Pliego A, Herrera-Salazar A, Vázquez-Martínez ER, Reyes-Muñoz E. Cellular and molecular mechanisms of viral infection in the human placenta. *Pathog Dis.* 2017 Sep 29;75(7):ftx093. doi: 10.1093/femspd/ftx093. PMID: 28903546; PMCID: PMC7108519.
59. Lu, B., Ma, C.-H., Brazas, R., & Jin, H. (2002). The Major Phosphorylation Sites of the Respiratory Syncytial Virus Phosphoprotein Are Dispensable for Virus Replication In Vitro. *Journal of Virology*, 76(21), 10776-10784. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.21.10776-10784.2002>
60. Ma Y, Krikun G, Abrahams VM, Mor G, Guller S. Cell type-specific expression and function of toll-like receptors 2 and 4 in human placenta: implications in fetal infection. *Placenta.* 2007 Oct;28(10):1024-31. doi: 10.1016/j.placenta.2007.05.003. Epub 2007 Jun 22. PMID: 17588655; PMCID: PMC2064901.
61. Manti S, Cuppari C, Lanzafame A, Salpietro C, Betta P, Leonardi S, Perez MK, Piedimonte G. Detection of respiratory syncytial virus (RSV) at birth in a newborn with respiratory distress. *Pediatr Pulmonol.* 2017 Oct;52(10):E81-E84. doi: 10.1002/ppul.23775. Epub 2017 Aug 18. PMID: 28834426; PMCID: PMC5657560.

62. Manti S, Piedimonte G. An overview on the RSV-mediated mechanisms in the onset of non-allergic asthma. *Front Pediatr.* 2022 Sep 20;10:998296. doi: 10.3389/fped.2022.998296. PMID: 36204661; PMCID: PMC9530042.
63. Marriott, A. C., Smith, J. M., & Easton, A. J. (2001). Fidelity of Leader and Trailer Sequence Usage by the Respiratory Syncytial Virus and Avian Pneumovirus Replication Complexes. *Journal of Virology*, 75(14), 6265-6272. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.14.6265-6272.2001>
64. Meng J, Hotard AL, Currier MG, Lee S, Stobart CC, Moore ML. Respiratory Syncytial Virus Attachment Glycoprotein Contribution to Infection Depends on the Specific Fusion Protein. *J Virol.* 2015 Oct 14;90(1):245-53. doi: 10.1128/JVI.02140-15. PMID: 26468535; PMCID: PMC4702574.
65. Meng, J., Hotard, A. L., Currier, M. G., Lee, S., Stobart, C. C., & Moore, M. L. (2015). Respiratory Syncytial Virus Attachment Glycoprotein Contribution to Infection Depends on the Specific Fusion Protein. *Journal of Virology*, 90(1), 245-253. <https://doi.org/10.1128/JVI.02140-15>
66. Mi Y, Thomas SD, Xu X, Casson LK, Miller DM, Bates PJ. Apoptosis in leukemia cells is accompanied by alterations in the levels and localization of nucleolin. *J Biol Chem.* 2003 Mar 7;278(10):8572-9. doi: 10.1074/jbc.M207637200. Epub 2002 Dec 27. PMID: 12506112.
67. Morris DR, Qu Y, Agrawal A, Garofalo RP, Casola A. HIF-1 α Modulates Core Metabolism and Virus Replication in Primary Airway Epithelial Cells Infected with Respiratory Syncytial Virus. *Viruses.* 2020 Sep 26;12(10):1088. doi: 10.3390/v12101088. PMID: 32993138; PMCID: PMC7601280.
68. Msheik H, El Hayek S, Bari MF, Azar J, Abou-Kheir W, Kobeissy F, Vatish M, Daoud G. Transcriptomic profiling of trophoblast fusion using BeWo and JEG-3 cell lines. *Mol Hum Reprod.* 2019 Dec 1;25(12):811-824. doi: 10.1093/molehr/gaz061. PMID: 31778538.
69. Munir S, Hillyer P, Le Nouën C, Buchholz UJ, Rabin RL, Collins PL, Bukreyev A. Respiratory syncytial virus interferon antagonist NS1 protein suppresses and skews the human T lymphocyte response. *PLoS Pathog.* 2011 Apr;7(4):e1001336. doi: 10.1371/journal.ppat.1001336. Epub 2011 Apr 21. PMID: 21533073; PMCID: PMC3080852.
70. Patni S, Wynen LP, Seager AL, Morgan G, White JO, Thornton CA. Expression and activity of Toll-like receptors 1-9 in the human term placenta and changes associated with labor at term. *Biol Reprod.* 2009 Feb;80(2):243-8. doi: 10.1095/biolreprod.108.069252. Epub 2008 Sep 24. PMID: 18815357.
71. Pei J, Beri NR, Zou AJ, Hubel P, Dorando HK, Bergant V, Andrews RD, Pan J, Andrews JM, Sheehan KCF, Pichlmair A, Amarasinghe GK, Brody SL, Payton JE, Leung DW. Nuclear-localized human respiratory syncytial virus NS1 protein modulates host gene transcription. *Cell Rep.* 2021 Oct 12;37(2):109803. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109803. PMID: 34644581; PMCID: PMC8609347.
72. Piedimonte G, Walton C, Samsell L. Vertical transmission of respiratory syncytial virus modulates pre- and postnatal innervation and reactivity of rat airways. *PLoS One.* 2013 Apr 18;8(4):e61309. doi: 10.1371/journal.pone.0061309. PMID: 23637810; PMCID: PMC3630224.
73. Piedimonte G. Respiratory syncytial virus and asthma: speed-dating or long-term relationship? *Curr Opin Pediatr.* 2013 Jun;25(3):344-9. doi: 10.1097/MOP.0b013e328360bd2e. PMID: 23657245; PMCID: PMC3889210.
74. Piedimonte G. RSV infections: State of the art. *Cleve Clin J Med.* 2015 Nov;82(11 Suppl 1):S13-8. doi: 10.3949/ccjm.82.s1.03. PMID: 26555808.

75. Pudney J, He X, Masheeb Z, Kindelberger DW, Kuohung W, Ingalls RR. Differential expression of toll-like receptors in the human placenta across early gestation. *Placenta*. 2016 Oct;46:1-10. doi: 10.1016/j.placenta.2016.07.005. Epub 2016 Jul 26. PMID: 27697215; PMCID: PMC5119647.
76. Regan AK, Klein NP, Langley G, Drews SJ, Buchan S, Ball S, Kwong JC, Naleway A, Thompson M, Wyant BE, Levy A, Chung H, Feldman B, Katz MA; PREVENT Group. Respiratory Syncytial Virus Hospitalization During Pregnancy in 4 High-income Countries, 2010-2016. *Clin Infect Dis*. 2018 Nov 28;67(12):1915-1918. doi: 10.1093/cid/ciy439. PMID: 29800089.
77. Rezaee F, Gibson LF, Pikel D, Othumpangat S, Piedimonte G. Respiratory syncytial virus infection in human bone marrow stromal cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011 Aug;45(2):277-86. doi: 10.1165/rcmb.2010-0121OC. Epub 2010 Oct 22. PMID: 20971883; PMCID: PMC3175557.
78. Robbins JR, Skrzypczynska KM, Zeldovich VB, Kapidzic M, Bakardjiev AI. Placental syncytiotrophoblast constitutes a major barrier to vertical transmission of *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathog*. 2010 Jan 22;6(1):e1000732. doi: 10.1371/journal.ppat.1000732. PMID: 20107601; PMCID: PMC2809766.
79. Russell, C. J., Jardetzky, T. S., & Lamb, R. A. (2001). Membrane fusion machines of paramyxoviruses: Capture of intermediates of fusion. *The EMBO Journal*, 20(15), 4024-4034. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.15.4024>
80. Sabogal C, Auais A, Napchan G, Mager E, Zhou BG, Suguihara C, Bancalari E, Piedimonte G. Effect of respiratory syncytial virus on apnea in weanling rats. *Pediatr Res*. 2005 Jun;57(6):819-25. doi: 10.1203/01.PDR.0000157679.67227.11. Epub 2005 Mar 17. PMID: 15774838.
81. Schleiss MR, Aronow BJ, Handwerker S. Cytomegalovirus infection of human syncytiotrophoblast cells strongly interferes with expression of genes involved in placental differentiation and tissue integrity. *Pediatr Res*. 2007 May;61(5 Pt 1):565-71. doi: 10.1203/pdr.0b013e318045be6d. PMID: 17413859.
82. Shahriari, S., Wei, K., & Ghildyal, R. (2018). Respiratory Syncytial Virus Matrix (M) Protein Interacts with Actin In Vitro and in Cell Culture. *Viruses*, 10(10), 535. <https://doi.org/10.3390/v10100535>
83. Shang, Z., Tan, S., & Ma, D. (2021). Respiratory syncytial virus: From pathogenesis to potential therapeutic strategies. *International Journal of Biological Sciences*, 17(14), 4073-4091. <https://doi.org/10.7150/ijbs.64762>
84. Shi, T., McAllister, D. A., O'Brien, K. L., Simoes, E. A. F., Madhi, S. A., Gessner, B. D., Polack, F. P., Balsells, E., Acacio, S., Aguayo, C., Alassani, I., Ali, A., Antonio, M., Awasthi, S., Awori, J. O., Azziz-Baumgartner, E., Baggett, H. C., Baillie, V. L., Balmaseda, A., ... Nair, H. (2017). Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: A systematic review and modelling study. *The Lancet*, 390(10098), 946-958. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30938-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30938-8)
85. Shingai M, Azuma M, Ebihara T, Sasai M, Funami K, Ayata M, Ogura H, Tsutsumi H, Matsumoto M, Seya T. Soluble G protein of respiratory syncytial virus inhibits Toll-like receptor 3/4-mediated IFN-beta induction. *Int Immunol*. 2008 Sep;20(9):1169-80. doi: 10.1093/intimm/dxn074. Epub 2008 Jul 8. PMID: 18611945.
86. Sibert, B. S., Kim, J. Y., Yang, J. E., Ke, Z., Stobart, C. C., Moore, M. M., & Wright, E. R. (2021). Respiratory syncytial virus matrix protein assembles as a lattice with local and extended order that coordinates the position of the fusion glycoprotein (p. 2021.10.13.464285). *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2021.10.13.464285>
87. Sibert, B. S., Kim, J. Y., Yang, J. E., Ke, Z., Stobart, C. C., Moore, M. M., & Wright, E. R. (2021). Respiratory syncytial virus matrix protein assembles as a lattice with

- local and extended order that coordinates the position of the fusion glycoprotein (p. 2021.10.13.464285). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2021.10.13.464285>
88. Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F, Kjellman B. Respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000 May;161(5):1501-7. doi: 10.1164/ajrccm.161.5.9906076. PMID: 10806145.
 89. Simoes EA. Respiratory syncytial virus infection. *Lancet.* 1999 Sep 4;354(9181):847-52. doi: 10.1016/S0140-6736(99)80040-3. PMID: 10485741.
 90. Staadegaard, L., Caini, S., Wangchuk, S., Thapa, B., de Almeida, W. A. F., de Carvalho, F. C., Njouom, R., Fasce, R. A., Bustos, P., Kyncl, J., Novakova, L., Caicedo, A. B., de Mora Coloma, D. J., Meijer, A., Hooiveld, M., Huang, S., Wood, T., Guimar, R., Rodrigues, A. P., ... Paget, J. (2021). The Global Epidemiology of RSV in Community and Hospitalized Care: Findings From 15 Countries. *Open Forum Infectious Diseases*, 8(7), ofab159. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofab159>
 91. Stewart R, Akhmedov D, Robb C, Leiter C, Berdeaux R. Regulation of SIK1 abundance and stability is critical for myogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Jan 2;110(1):117-22. doi: 10.1073/pnas.1212676110. Epub 2012 Dec 19. PMID: 23256157; PMCID: PMC3538258.
 92. Svinarich DM, Gomez R, Romero R. Detection of human defensins in the placenta. *Am J Reprod Immunol.* 1997 Oct;38(4):252-5. doi: 10.1111/j.1600-0897.1997.tb00511.x. PMID: 9352011.
 93. Swedan S, Musiyenko A, Barik S. Respiratory syncytial virus nonstructural proteins decrease levels of multiple members of the cellular interferon pathways. *J Virol.* 2009 Oct;83(19):9682-93. doi: 10.1128/JVI.00715-09. Epub 2009 Jul 22. PMID: 19625398; PMCID: PMC2748017.
 94. Tabor DE, Fernandes F, Langedijk AC, Wilkins D, Lebbink RJ, Tovchigrechko A, Ruzin A, Kragten-Tabatabaie L, Jin H, Esser MT, Bont LJ, Abram ME; INFORM-RSV Study Group. Global Molecular Epidemiology of Respiratory Syncytial Virus from the 2017-2018 INFORM-RSV Study. *J Clin Microbiol.* 2020 Dec 17;59(1):e01828-20. doi: 10.1128/JCM.01828-20. PMID: 33087438; PMCID: PMC7771447.
 95. Tangerås LH, Stødle GS, Olsen GD, Leknes AH, Gundersen AS, Skei B, Vikdal AJ, Ryan L, Steinkjer B, Myklebost MF, Langaas M, Austgulen R, Iversen AC. Functional Toll-like receptors in primary first-trimester trophoblasts. *J Reprod Immunol.* 2014 Dec;106:89-99. doi: 10.1016/j.jri.2014.04.004. Epub 2014 May 14. PMID: 24933117.
 96. Tawar, R. G., Duquerroy, S., Vonrhein, C., Varela, P. F., Damier-Piolle, L., Castagné, N., MacLellan, K., Bedouelle, H., Bricogne, G., Bhella, D., Eléouët, J.-F., & Rey, F. A. (2009). Crystal structure of a nucleocapsid-like nucleoprotein-RNA complex of respiratory syncytial virus. *Science (New York, N.Y.)*, 326(5957), 1279-1283. <https://doi.org/10.1126/science.1177634>
 97. Tayyari, F., Marchant, D., Moraes, T. J., Duan, W., Mastrangelo, P., & Hegele, R. G. (2011). Identification of nucleolin as a cellular receptor for human respiratory syncytial virus. *Nature Medicine*, 17(9), 1132-1135. <https://doi.org/10.1038/nm.2444>
 98. Thornhill, E. M., & Verhoeven, D. (2020). Respiratory Syncytial Virus's Non-structural Proteins: Masters of Interference. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00225>
 99. Tian, J., Huang, K., Krishnan, S., Svabek, C., Rowe, D. C., Brewah, Y., Sanjuan, M., Patera, A. C., Kolbeck, R., Herbst, R., & Sims, G. P. (2013). RAGE inhibits human respiratory syncytial virus syncytium formation by interfering with F-protein function. *The Journal of General Virology*, 94(Pt 8), 1691-1700. <https://doi.org/10.1099/vir.0.049254-0>

100. Tran TL, Castagné N, Dubosclard V, Noinville S, Koch E, Moudjou M, Henry C, Bernard J, Yeo RP, Eléouët JF. The respiratory syncytial virus M2-1 protein forms tetramers and interacts with RNA and P in a competitive manner. *J Virol*. 2009 Jul;83(13):6363-74. doi: 10.1128/JVI.00335-09. Epub 2009 Apr 22. PMID: 19386701; PMCID: PMC2698528.
101. Velázquez-Cervantes MA, Martínez-Castillo M, González-García LD, Vargas-Pavía TA, Martínez-Salazar MG, Mancilla-Herrera I, León-Reyes G, García-Cordero J, Helguera-Repetto AC, León-Juárez M. The BeWo cell line derived from a human placental choriocarcinoma is permissive for respiratory syncytial virus infection. *Virus Genes*. 2019 Jun;55(3):406-410. doi: 10.1007/s11262-019-01646-2. Epub 2019 Feb 13. PMID: 30758769.
102. Vizcarra-Ugalde S, Rico-Hernández M, Monjarás-Ávila C, Bernal-Silva S, Garrocho-Rangel ME, Ochoa-Pérez UR, Noyola DE. Intensive Care Unit Admission and Death Rates of Infants Admitted With Respiratory Syncytial Virus Lower Respiratory Tract Infection in Mexico. *Pediatr Infect Dis J*. 2016 Nov;35(11):1199-1203. doi: 10.1097/INF.0000000000001262. PMID: 27276178.
103. Wang Z, Takemori H, Halder SK, Nonaka Y, Okamoto M. Cloning of a novel kinase (SIK) of the SNF1/AMPK family from high salt diet-treated rat adrenal. *FEBS Lett*. 1999 Jun 18;453(1-2):135-9. doi: 10.1016/s0014-5793(99)00708-5. PMID: 10403390.
104. Wang, L., Ng, T. F. F., Castro, C. J., Marine, R. L., Magaña, L. C., Esona, M., Peret, T. C. T., & Thornburg, N. J. (2022). Next-generation sequencing of human respiratory syncytial virus subgroups A and B genomes. *Journal of Virological Methods*, 299, 114335. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114335>
105. Ward C, Maselko M, Lupfer C, Prescott M, Pastey MK. Interaction of the Human Respiratory Syncytial Virus matrix protein with cellular adaptor protein complex 3 plays a critical role in trafficking. *PLoS One*. 2017 Oct 13;12(10):e0184629. doi: 10.1371/journal.pone.0184629. PMID: 29028839; PMCID: PMC5640227.
106. Wong-Chew RM, Farfán-Quiroz R, Sánchez-Huerta JL, Nava-Frías M, Casasola-Flores J, Santos-Preciado JI. Frecuencia de virus respiratorios y características clínicas de niños que acuden a un hospital en México [Frequency of respiratory viruses and clinical characteristics in children attending a care center in Mexico City]. *Salud Publica Mex*. 2010 Nov-Dec;52(6):528-32. Spanish. PMID: 21271012.
107. Zeldovich VB, Clausen CH, Bradford E, Fletcher DA, Maltepe E, Robbins JR, Bakardjiev AI. Placental syncytium forms a biophysical barrier against pathogen invasion. *PLoS Pathog*. 2013;9(12):e1003821. doi: 10.1371/journal.ppat.1003821. Epub 2013 Dec 12. PMID: 24348256; PMCID: PMC3861541.
108. Zimmer, G., Budz, L., & Herrler, G. (2001). Proteolytic activation of respiratory syncytial virus fusion protein. Cleavage at two furin consensus sequences. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(34), 31642-31650. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102633200>