



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**Caracterización de la infección de la línea celular de
coriocarcinoma (Bewo) con el virus sincitial respiratorio.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

Velázquez Cervantes Manuel Adrián

**DIRECTOR DE TESIS: Dr. Moisés León Juárez, Instituto
Nacional de Perinatología “Isidro Espinoza de los Reyes”**

**ASESOR INTERNO: M. en C. José Misael Vicente Hernández
Vázquez**

Ciudad de México, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE	PÁGINAS
AGRADECIMIENTOS.....	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ÍNDICE DE TABLAS	VI
ABREVIATURAS.....	VI
RESUMEN.....	VII
ABSTRAC.....	VIII
1.INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Epidemiología.....	3
1.2.1 Patología.....	6
1.2.2 Vacunas y tratamientos.....	8
1.2.3 Características del Virus Sincitial Respiratorio.....	9
1.2.4 Genoma.....	10
1.2.5 Ciclo viral.....	14
1.3 Infección vertical.....	17

1.4 Interfase placentaria.....	18
2. JUSTIFICACIÓN.....	23
3. HIPÓTESIS.....	23
4. OBJETIVO GENERAL.....	24
4.1 Objetivos Particulares.....	24
5. METODOLOGÍA.....	25
6. RESULTADOS.....	31
7. DISCUSIÓN.....	37
8. CONCLUSIÓN.....	41
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

AGRADECIMIENTOS

La meta se cumple... No tengo como agradecer a las personas que contribuyeron para culminar este sueño de titularme. Mis padres Lucia y Salvador sin ustedes seria nada, me han enseñado, aconsejado, regañado durante 26 años, jamás tendré como pagarles cada momento de mi vida que han estado para mi. Mi hermano Jesús que puedo decir siempre incondicional, siempre con las ganas de ayudarme en lo mínimo que le he pedido. Tía Esther no tengo como agradecer todo tu apoyo que me has brindado desde niño y hasta la fecha, siempre preocupada que no me falte nada y que este bien. A mi gran familia materna y paterna durante la vida me han ensañado valiosas lecciones y han aportado para formar lo que soy Tío Luis, Tío Daniel Tío Antonio y Tío Miguel enormes gracias por que aunque no se dieran cuenta o fuera su intensión aprendí de ustedes. A mis primos Panchito, Ale y Rosy gracias por ser un ejemplo y un apoyo. Por ultimo y no menos importante a mis dos grandes y tiernas abuelitas Lala y Tomasita gracias por siempre ver por mi, preocuparse, estar pendiente y echarme la bendición todos los días. Y muchas gracias a toda mi familia por su apoyo.

Mi gran amigo Aarón nunca hubiera imaginado llegar a este punto con tu amistad leal y sincera, vamos por el doctorado infeliz. Mi gran amiga Karen aunque estés en Monterrey siempre has estado a mi lado y nunca dejado, gracias.

Mis grandes amigos que conocí en la universidad y que se han vuelto amigos de la vida Martín, Giova, Ale, Eli, Sandy, Gram, Dianelly, Vicky, Anahí y Ceci gracias por tantas horas de escucharme y darme consejos durante toda la carrera y hasta el día de hoy.

No voy a olvidar a ese grupo de troncos con lo que me divierto jugando fut Jesús, Aquino, Gio, Ovando, César, Pablo, Diego, Alain, Gen y Ramiro, gracias por tanta diversión y consejos.

Doctor Moisés a usted le debo esta gran admiración por seguir la ciencia, gracias por aceptarme para realizar este gran trabajo, por su paciencia y enorme apoyo que me dio desde el día que llegue al INPER.

El equipo de trabajo de virología perinatal comando por Didier, Macario, José Luis, Tania, Katia, Aris, Charly, Luisito, Daniel y Adri ustedes son con quienes paso todo día en el labo gracias... Con ustedes encontré un grupo donde aprendí del apoyo, amistad y trabajo en equipo, sus chistes malos y risas nunca las cambiare chiquitines.

El apoyo del Departamento de Inmunobioquímica fue fundamental muchas gracias amigos Arturo, Sandy, Kari, Dany, David, Lalo y Mario.

Muchas gracias a mis sinodales Dra. Lourdes, M. en C. Misael , Dr. Hugo y Dra. Yolanda por todos sus consejos, sugerencias para culminar con esta etapa de tesista.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Porcentaje de infecciones de las vías respiratorias (9).

Figura 2. Distribución de las infecciones respiratorias agudas en el mundo (12).

Figura 3. Distribución de infecciones respiratorias en el Hospital Infantil de México(13).

Figura 4. Representación esquemática del VSR (36).

Figura 5. Genoma del VSR (57).

Figura 6. Ciclo viral del VSR, modificado (67).

Figura 7. Diagrama de una sección longitudinal (87).

Figura 8. Efecto citopático en células Hep-2 por infección de VSR.

Figura 9. Titulación del VSR.

Figura 10. Entrada del VSR a células Bewo.

Figura 11. Entrada viral por western blot.

Figura 12. Acumulación viral de células Bewo.

Figura 13. Permisividad viral.

Figura 14. Partículas virales infecciosas.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Identificación de virus respiratorios en el Hospital Infantil de México (3).

Tabla2. Casos reportados de enfermedades transmisión vertical (95).

ABREVIATURAS

VSR	virus sincitial respiratorio
IRS	infecciones del tracto respiratorio superior
IRI	infecciones del tracto respiratorio inferior
Th	linfocitos T cooperadores
CTL	linfocitos T citotóxicos
ORF	marco de lectura abierta
MOI	multiplicidad de infección
UFP	unidades formadoras de placa
MOCK	virus inactivado por calor
TRL4	receptor tipo Toll 4
ICAM I	molécula de adhesión celular I
IgA	inmunoglobulina A
Igb	inmunoglobulina B
kDa	kilodalton
kb	kilobase

RESUMEN

Las infecciones verticales por virus emplean diversos mecanismos para cruzar la interfase materno-fetal; uno de estos mecanismos es infectar componentes celulares de la placenta, como lo son los trofoblastos. Estudios recientes han demostrado que el virus sincitial respiratorio (VSR) puede ser transmitido verticalmente; al demostrarse este fenómeno en un modelo animal, observándose que la infección *in útero* afecta las vías respiratorias de los fetos promoviendo efectos pre y postnatales. Se ha establecido que la infección con VSR, no sólo se limita al tejido pulmonar se ha demostrado que el virus puede infectar el tejido cardíaco, el sistema nervioso y la médula ósea, por lo que es probable que en una mujer embarazada infectada con VSR, puede transmitir el virus hasta la interfase materno-fetal. Una de las estrategias utilizadas ampliamente para estudiar los virus que infectan esta interfase es el uso de líneas celulares que conservan las características funcionales, bioquímicas y morfológicas de la placenta. Por lo cual en este estudio se evaluó si la línea Bewo es permisiva al VSR. Se caracterizará el ciclo de infección del VRS en la línea celular de placenta (Bewo). Para ello las células Bewo se infectaron para determinar los eventos mediante ensayos de inmunofluorescencia identificando la proteína F y en el western blot se expresaron F y M2-1; el incremento viral se analizó a diferentes tiempos de infección utilizando ensayo de Western blot a diferentes tiempos de infección observando el incremento posinfección; la permisividad se evaluó por una cinética de infección con diferentes MOI, en las primeras etapas de infección se encontraron células positivas al VSR y en etapas finales pocas células adheridas e infectadas y finalmente la producción de partículas virales se evaluó por inmunofluorescencia con los sobrenadantes de células Bewo infectadas con el VSR los cuales se emplearon para infectar a la línea celular A549. Con lo que la línea celular Bewo es un buen modelo para la infección por VRS en placenta, ya que se produce el ciclo de replicación del VSR.

ABSTRACT

The vertical virus infections employ various mechanisms to cross the maternal-fetal interface; one mechanism is to infect the placenta cellular components, such as trophoblasts. Recent studies have shown that respiratory syncytial virus (RSV) can be transmitted vertically; it was evaluated in an animal model, showing that in utero infection, respiratory affection of fetuses promoting pre and postnatal effects. It has been established that infection with RSV, is not only limited to lung tissue has been demonstrated that the virus can infect heart tissue, nervous system and bone marrow, so it is likely that in a pregnant woman presenting infection VSR, can access the maternal-fetal interface. One of the strategies widely used to study viruses that infect this zone is the use of cell lines that retain the functional, biochemical and morphological characteristics of the placenta, which in this study we assessed whether the Bewo line permissive in RSV. Characterize the infection cycle of RSV in cell line placenta (Bewo).The Bewo cells were infected determining input events virus with immunofluorescence and Western blot assays, viral growth was analyzed by western blot at different times and permissiveness for infection kinetics at different MOI, finally viral particles production was evaluated in supernatants of Bewo cells infected with VSR. Viral entry was identified by observing F protein by immunofluorescence and western blot were expressed F and M2-1. The increase is analyzed by observing viral infection kinetics increase post-infection. Permissiveness became infected at different times and different MOI, early stages of infection we found positive cells and late stages few stuck and infected cells. With these supernatants was observed that A549 cells are positive to infection. Bewo cell line is a good model for RSV infection in the placenta by that the occurs replicative cycle of the virus.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Antecedentes.

El virus sincitial respiratorio (VSR) es la causa más común de infecciones de las vías respiratorias en neonatos, niños, adultos mayores e individuos inmunodeprimidos; una fuerte evidencia epidemiológica sugiere que en la vida temprana las infecciones con este virus predisponen a problemas crónicos respiratorios, como lo es dificultad para respirar, sibilancias, y en casos más agudos desarrollar asma. Se ha especulado que estos fenómenos están relacionados con la persistencia del propio virus y los efectos sobre el desarrollo del sistema respiratorio (1). En México las infecciones respiratorias agudas inferiores, constituyen la segunda causa de mortalidad infantil en niños menores de 1 año con un 3.1% de defunciones; en niños de 1 a 4 años 0.66% defunciones, lo cual representa unas de las causas más recurrentes de hospitalización en el país con un total de 266 casos, de éstos se reportaron 14 muertes en un periodo del 2004-2008 (2,3). Las infecciones verticales por virus, en un 80 a 90% de los casos, no presentan signos clínicos al nacer o aparecen días después, mientras que del 10 a 20% restante pueden presentarse varios síntomas como: problemas hepáticos, alteraciones cardiacas y encefálicas, sólo por mencionar las más comunes, y dependerá del tipo de infección que estén presentes unos u otros signos (4).

Recientemente se ha establecido la hipótesis sobre una posible infección vertical por VSR. A este respecto se evaluó en un modelo animal si el VSR es capaz de propagarse a través de la placenta, desde las vías respiratorias de la madre al feto, posteriormente se detectó niveles de VSR durante el desarrollo en embriones, en los pulmones de las ratas, en su periodo neonatal y en la edad adulta; lo cual sugiere que el VSR se transmite de la madre a la descendencia. La infección vertical por VRS se asoció con la desregulación de las vías neurotróficas durante el desarrollo fetal, lo que lleva al aumento de la reactividad de las vías respiratorias después de la reinfección posnatal con VRS (5). Este estudio desafía la actual visión de que la infección por VRS se adquiere sólo después de nacer y se enfoca en los efectos prenatales del virus, que pueden resultar en consecuencias más graves y duraderos al interferir con los procesos críticos del desarrollo.

Se ha demostrado que una serie de agentes infecciosos incluyendo *flavivirus*, *herpevirus*, *retrovirus* e incluso *ortomixovirus* atraviesan la placenta por medio de infecciones del citotroblasto, estableciendo una infección persistente a la descendencia entre los más importantes tenemos VIH, Hepatitis C, Citomegalovirus y Herpes simplex. En estos estudios se ha usado un modelo *in vitro* con la línea celular de coriocarcinoma (Bewo), la cual es una línea citotrofoblástica que crece formando una monocapa y posee propiedades morfológicas y bioquímicas comunes con los trofoblastos de placenta humana (6,7,8). Con la hipótesis propuesta anteriormente se establecerá evidenciar que el VSR juega un papel importante dentro de las infecciones verticales, con ello se propone que el ciclo viral se pueda llevar a cabo en la línea celular Bewo y dando una evidencia más del posible proceso de infección vertical .

1.2 Epidemiología

Una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad en niños a nivel global son las infecciones respiratorias agudas, las cuales se dividen en infecciones en el tracto respiratorio superior (IRS) que afectan la nasofaringe, laringe, tráquea y senos paranasales y las infecciones de tracto respiratorio inferior (IRI) que afecta los bronquios; en ambos casos el VSR afecta dichas estructuras, aunque el VSR tiene un mayor impacto en las vías respiratorias inferiores (figura 1).

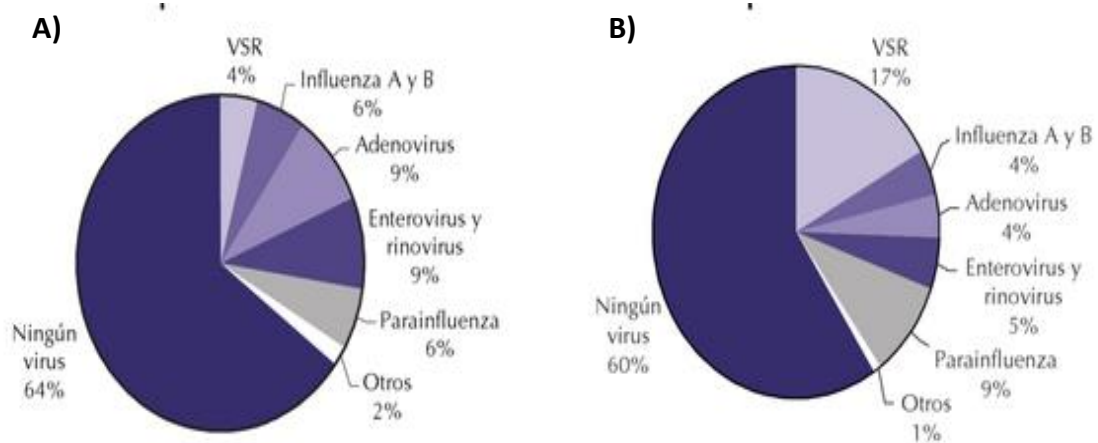


Figura 1. Porcentaje de infecciones de las vías respiratorias. Virus aislados de niños con infecciones de las vías respiratorias: A) infecciones del tracto respiratorio superior y B) infecciones del tracto respiratorio inferior (9).

Las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) indican que el VSR representa en todo el mundo más del 6% de las infecciones respiratorias agudas en niños y más del 80% en niños menores de 1 año (figura 2); por lo que el VSR es uno de los agentes etiológicos más frecuentes de bronquitis y neumonía pediátrica (9-11).

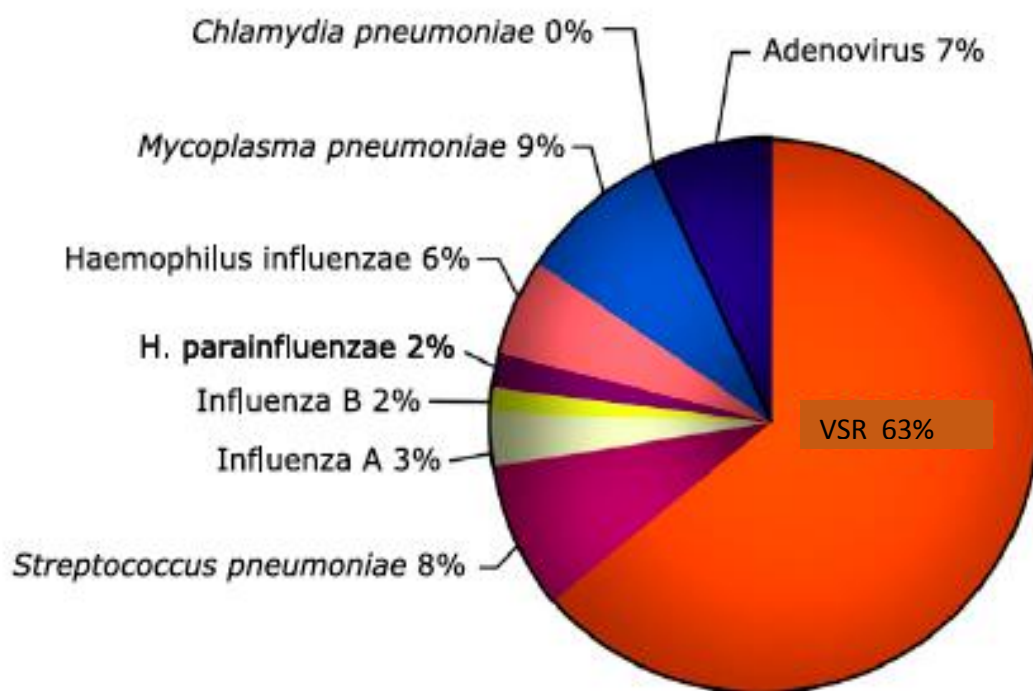


Figura 2. Distribución de las infecciones respiratorias agudas en el mundo. El VSR tiene un gran impacto mundial en los primeros etapas de vida, concretamente en neonatos, modificado (12).

En 2005 la OMS estimó a nivel mundial la mortalidad de niños menores de 5 años, 10.6 millones, de éstos el 10% fue por neumonía (12). En México en el 2006 la mortalidad anual por IRI fue de 7.2 muertes por 100,000 en niños de 1 a 4 años y de 109 muertes por 100,000 en niños menores de 1 año. La incidencia anual de IRI en 2006 fue de 36,627 por 100,000 niños menores de 4 años, durante un periodo de 3 años 2004-2006 se monitoreo la cantidad de ingresos al Hospital Infantil de México por infecciones respiratorias, el VSR fue una constante en todos los meses y es la causa primordial de ingreso hospitalario (figura 3) (13).

De la misma forma se reportó en un periodo del 2004-2008 que el virus sincitial respiratorio (VSR), es la infección respiratoria aguda con un alto ingreso al Hospital Infantil de México con un total de 266 casos, de éstos se reportaron 14 muertes (tabla 1)(3).

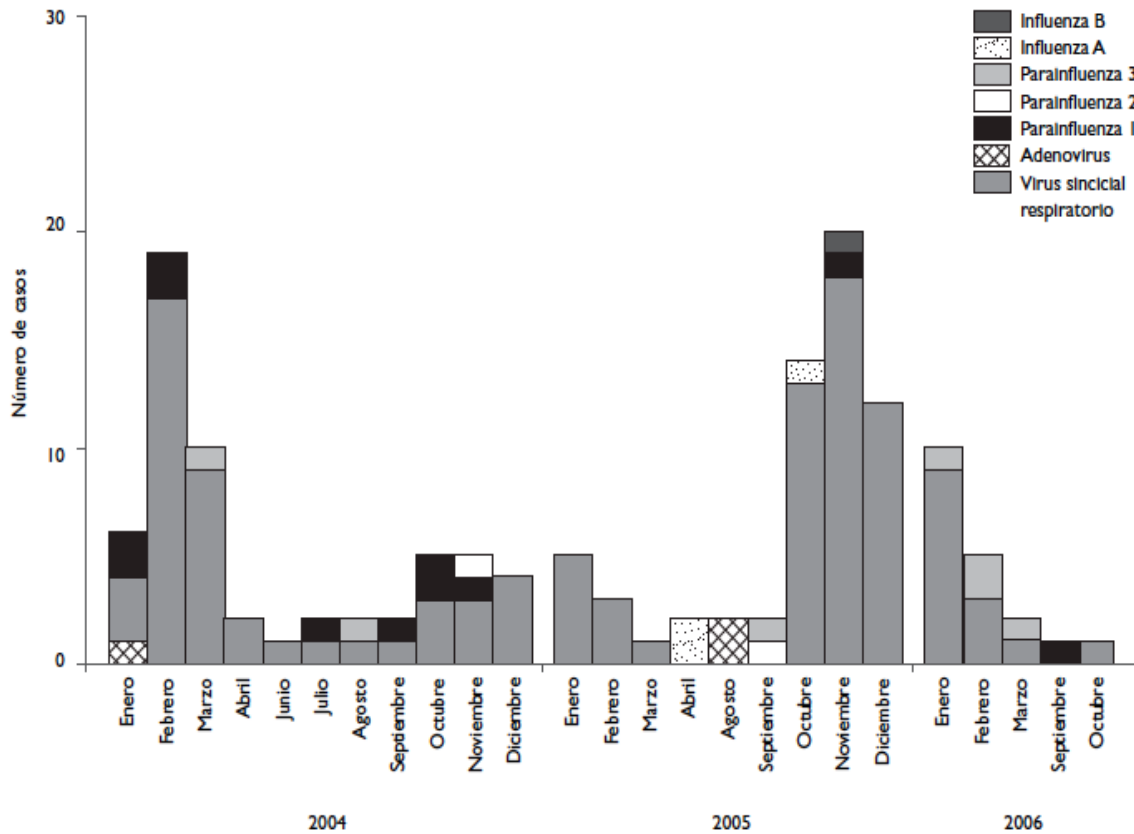


Figura 3. Distribución de infecciones respiratorias en el Hospital Infantil de México. El VSR toma gran importancia como la causa primordial de hospitalización (13).

VIRUS	AÑO					TOTAL
	2004	2005	2006	2007	2008	
VSR	49	57	23	89	48	266
Parainfluenza 3	2	1	4	18	4	29
Influenza A	1	3	0	21	0	25
Parainfluenza 2	2	1	0	3	7	13
Parainfluenza 1	7	0	1	0	3	11
Adenovirus	2	2	0	4	1	9
Influenza B	0	1	0	1	1	3
Total positivo	63	65	28	136	64	356
Total negativo	215	366	391	774	695	2441

Tabla 1. Identificación de virus respiratorios en el Hospital Infantil de México. Los reportes señalan que el VSR sigue siendo la causa principal de hospitalización en niños menores de 5 años, modificado (3).

1.2.1 Patología.

El período de incubación de la enfermedad producida por VSR está estimado en 5 días (14). En el infante sano que tiene contacto por primera vez con el virus a la edad de 6 semanas a 9 meses, el VSR normalmente causa fiebre, sibilancia, tos y dificultad para respirar. En el 25 al 40% de los casos, la infección progresa hacia el tracto respiratorio inferior, donde la bronquiolitis y la neumonía son las manifestaciones más graves. Se produce otitis media aguda en la tercera parte de los niños con infección por VSR. En aquellos lactantes hay un período con rinorrea a veces acompañada de disminución del apetito. Puede aparecer una tos entre el 1er y 3er día. Aproximadamente del 1 al 2% de todos los lactantes que tienen bronquiolitis requieren hospitalización, y entre éstos el 2 al 5% necesitan ventilación mecánica. En los casos más severos, la tos y las sibilancias progresan y el niño se vuelve disneico. Se observa hiperexpansión del tórax y retracciones intercostales y subcostales. Se produce taquipnea, aun en ausencia de cianosis evidente, se incrementa la hipoxia y se produce una falla respiratoria aguda, por lo que se necesita una ventilación mecánica. Este tipo de infecciones graves son más comunes en pacientes menores de nueve meses y en los lactantes con enfermedades de base respiratoria o cardiopatías (15). En adulto mayores el VSR puede producir infecciones leves del IRS, de forma menos habitual del IRI causando neumonía, en mujeres embarazadas cuando se tiene la infección provoca un leve resfriado hasta síntomas mas graves que ocasionan una intubación, en algunos casos se vincula el VSR con otros patógenos lo que provoca sintomatologías más graves y en ellas se ha tenido que intubar a la paciente, curiosamente los neonatos no mostraron síntomas clínicos de la infección, pero no se hicieron pruebas diagnósticas y no hubo seguimiento clínico de los mismos (16,17).

En el comienzo de la enfermedad el VSR replica en la nasofaringe . El mecanismo de progresión hacia el tracto respiratorio inferior puede involucrar la aspiración de las secreciones respiratorias altas que contienen al virus, la dispersión de los mismos entre los pequeños espacios intercelulares a través del fluido extracelular o vía, las zonas mucosas que hay en la superficie del epitelio respiratorio. El VSR tiene un efecto

citopático directo sobre las células del epitelio pulmonar, llevando a la pérdida de las funciones de estas células especializadas tales como el movimiento ciliar y a veces la destrucción misma del epitelio. Asimismo, se forma un infiltrado peribronquiolar de células mononucleares que se acompaña de edema submucoso y secreción de moco. Esta inflamación lleva a la obstrucción bronquiolar. El VSR infecta la superficie apical de las células columnares ciliadas, y es excretado exclusivamente de la superficie apical de las mismas, propagándose a las células vecinas por el movimiento ciliar (16,18-21).

La respuesta inmune celular desarrollada frente al VSR es esencial para limitar la replicación del virus, dado que prácticamente todos los lactantes presentan infección por VSR en los primeros meses de vida, pero no todos desarrollan bronquiolitis y la gravedad de ésta es variable, se ha sugerido que la respuesta inmune del paciente probablemente contribuya a las diversas manifestaciones de las infecciones causadas por este virus (22). La respuesta inflamatoria a la infección por VSR se inicia probablemente en las células del epitelio respiratorio. Estas células producen una serie de citocinas y quimiocinas en respuesta a las infecciones virales. Los pacientes con bronquiolitis por VSR producen interleucina 1, factor de necrosis tumoral α , interleucina 6, interleucina 8, proteína inflamatoria de macrófagos 1 α y la proteína RANTES en las vías aéreas. En respuesta a las citocinas, se produce una infiltración de células inflamatorias, predominantemente neutrófilos. Los macrófagos también participan en la respuesta inmune inicial, aunque su cantidad en las secreciones respiratorias suele ser menor que la de neutrófilos. También se produce atracción de eosinófilos, basófilos y linfocitos B hacia las vías respiratorias. Éstos liberan una serie de mediadores, tales como histamina, leucotrienos e inmunoglobulina E (IgE), que se relacionan con el desarrollo de broncoconstricción e hiperreactividad bronquial. Una vez iniciada la respuesta inmune, los linfocitos T cooperadores (Th) son activados generando una respuesta adaptativa de tipo Th1 o Th2. La producción temprana de interferón γ (INF- γ) es la clave para que se presente una respuesta predominante Th1, mientras que una baja producción de INF- γ se asocia con una respuesta Th2 predominante con eosinofilia pulmonar persistente (21,23).

Las proteínas virales NS2, N, M, M2-1, F y SH son identificados por linfocitos T citotóxicos (CTL). De igual forma se tiene identificado que los CTL reconocen M2-1, F y N como blancos principales (24). En el caso de linfocitos T CD4 contribuyen a la

inmunidad contra el VSR, ya que producen INF- γ lo cual activa la respuesta antiviral (25).

En cuanto a los adultos mayores con infecciones por VSR se ha reportado que la protección por los anticuerpos nasales de tipo inmunoglobulina A (IgA) es mayor a la generada por los anticuerpos inmunoglobulina G (IgG) (26,27). Los adultos mayores tienden a desarrollar la infección por VSR con casos más graves desencadenando en neumonía, por lo que se tiene la idea que existe un defecto en la producción de anticuerpo contra VSR. En adultos mayores se ha reportado un mayor título de anticuerpos con respecto a adultos jóvenes, pero no se detectó incremento en la actividad de anticuerpos neutralizantes, pudiendo favorecer la susceptibilidad a la infección en adultos mayores, ya que se tiene descrito que la actividad de los anticuerpos neutralizantes contra VSR no es suficiente para detener una infección y el título de anticuerpos neutralizantes debe incrementarse para compensar la baja función de ellos (28). Los niveles de anticuerpos tanto en adultos mayores como en adultos jóvenes son similares, pero en los adultos mayores tienen una producción de anticuerpos neutralizantes para 2 subtipos de VSR y un incremento en la respuesta específica ante el antígeno F, G subtipo A y G subtipo B, esto se debe por el cambio de una respuesta de Th1 CD4⁺ a Th2 por la edad ya que existe una disminución en la respuesta de células T. Las relaciones inmunológicas asociadas a la susceptibilidad del VSR en adultos mayores no están establecidas, lo que se sabe es que los adultos mayores tienen una deficiencia Th1 CD4⁺ y la respuesta de células T de memoria CD8⁺ (29,30).

1.2.2 Vacunas y tratamientos.

Varias estrategias se han tratado de diseñar como medidas profilácticas y terapéuticas contra la infección por el VSR. Éstas incluyen vacunas, el uso de drogas antivirales, la administración de inmunidad pasiva y la utilización de los mecanismos de interferencia del ARN. Aunque la evidencia clínica y experimental indica que la respuesta inmune media la resolución de la infección del VSR, no se conocen los agentes responsables, por lo tanto, no se entiende cuál es el mecanismo inmune adecuado, así como el hecho de que no se ha desarrollado una inmunidad completa contra el VSR, esto

obstaculiza el progreso en el desarrollo de vacunas (31-33). Se tiene la evidencia experimental que la droga Ribavirina interfiere de manera eficiente con la transcripción y la replicación viral, los resultados clínicos son desfavorables y su utilidad se ha dirigido para tratar la infección en un grupo especial de individuos inmunodeficientes y durante los primeros días de un caso severo de la enfermedad (33).

La administración de un anticuerpo monoclonal contra la proteína F del VSR (Palivizumab) protege individuos en alto riesgo de desarrollar infección contra el VSR. Desafortunadamente, su utilización es costosa y existe preocupación sobre la aparición de nuevas cepas virales resistentes debido a la naturaleza de los virus tipo ARN. Se han ingeniado mediante mutagénesis nuevas variantes de Fab y de anticuerpos IgG, los cuales muestran una mejoría en cuanto a su capacidad de neutralizar el VSR en un orden que va desde 44 hasta 1,500 veces sobre el Palivizumab (34).

1.2.3 Características del Virus Sincitial Respiratorio.

El VSR se encuentra de acuerdo al Internacional Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) , en el orden de los *Mononegaviales*, de la familia *Paramyxoviridae* y la subfamilia de los *Pneumovirinae* y el género *Pneunovirus* (35). El genoma está cubierto por una nucleocápside la cual contiene una polimerasa viral necesaria para los procesos de replicación y transcripción del genoma viral. Diversos autores reportan que las partículas virales tienen una forma esférica irregular y un rango de tamaño que puede variar entre 100 y 350 nm de diámetro (36). El VSR está constituido por once proteínas (figura 4), nueve de las cuales son proteínas estructurales (aquellas que forman parte de la partícula viral) y dos son no estructurales. Las proteínas estructurales son: las proteínas transmembranales SH, G y F; la proteína de matriz M; las proteínas asociadas a la nucleocápside y a la replicación del genoma, L, M2-1, P y N; y finalmente, la proteína M2-2 que es encargada de cambiar el modo transcripcional al modo replicación. Las proteínas no estructurales son: NS1 y NS2, las cuales se agregan en el citoplasma (figura 4) (34).

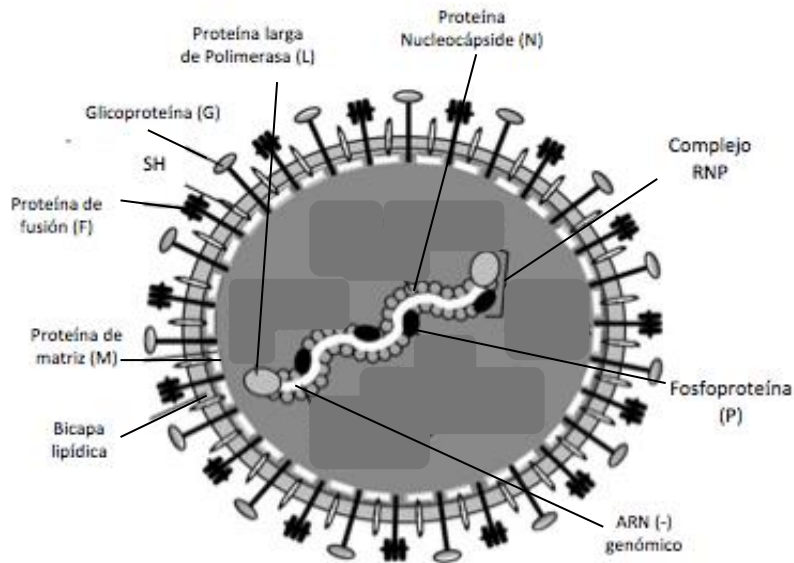


Figura 4. Representación esquemática del VSR. Se muestran la localización de las distintas proteínas que componen la partícula viral, modificado (37).

1.2.4 Genoma.

El genoma del VSR consiste de una cadena sencilla de ARN de polaridad negativa es transcrito en diez ARN mensajeros cada uno de los cuales codifica una única proteína, a excepción del ARN mensajero del gen M2 que codifica para las proteínas M2-1 y M2-2, el tamaño total del genoma es de 15.2 kb (figura 5) (38). La mayoría de las proteínas codificadas por el virus son estructurales (N, P, M, SH, G, F, M2 y L) y por lo tanto se encuentran en el virión como en las células infectadas, adicionalmente el genoma codifica dos proteínas no estructurales (NS1, NS2) (39). Se ha demostrado que el genoma viral codifica para ARN mensajeros monocistrónicos virales los cuales se les incorpora un cap (metilguanina) en el extremo 5' y se poliadenilan en el extremo 3'. Los genes presentan un marco de lectura abierto (ORF) y con la excepción de M2 ya que se sobrelapa con M2-1 y M2-2 (36).

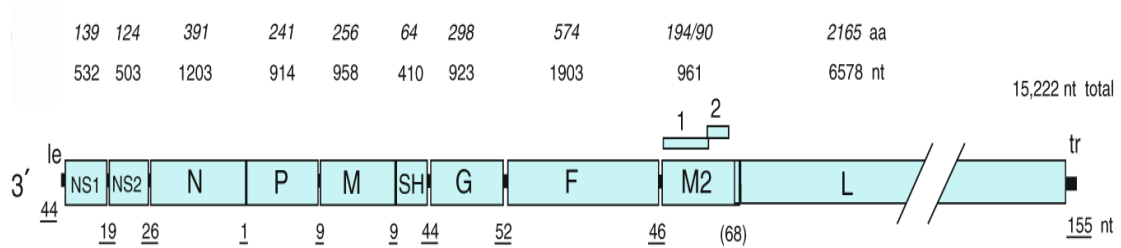


Figura 5. Genoma del VSR . En la parte superior se indica la cantidad de aminoácidos (aa), debajo se encuentra la cantidad de nucleótidos (nt) y subrayados la cantidad de nucleótidos en las regiones intergénicas. La longitud del genoma es de 15,222 nucleótidos, el orden de los genes en el sentido 3' a 5' los dos con marcos de lectura abierta (ORF). La secuencia leader (le) y la secuencia tráiler (tr) (40).

Proteínas estructurales:

La proteína de fusión F, con un peso de 50-55 kDa y sus subunidades F1 Y F2 48 y 23 kDa , media la entrada del virus a la célula debido a que induce la fusión entre la envoltura del virus y la membrana plasmática de la célula, posterior de la infección puede inducir su fusión con las células vecinas y formar sincitios (41). La proteína F forma trímeros que aparecen como espículas en forma de conos. Estas espículas parecen ser estructuras alternas que los trímeros adquieren antes y después de la fusión. Estos cambios en la estructura parecen ser necesarios en llevar el péptido de fusión hacia una posición más cercana a la secuencia “ancla” de la proteína F; desencadenando, la fusión del virus con la membrana de la célula “blanco” (42,43). Algunas moléculas de la membrana de la célula identificadas como receptores para la proteína F incluyen a las proteínas ICAM-1, Anexina II y “Toll-like receptor (TLR)-4” (44-46).

La proteína F requiere de un mecanismo de “maduración” que consiste en el corte del precursor F0 para producir el subunidades F2-F1 unidos a través de un enlace disulfuro. Dicho evento de “maduración” sucede en el compartimiento trans-Golgi y es catalizado por una enzima serina proteasa semejante a la Furina (47,48). Este evento postraduccional permite la liberación del péptido de fusión que se encuentra localizado en el extremo N-terminal de la subunidad F1. Por otro lado, la subunidad F2

parece ser determinante en el VSR humano y el VSR bovino en cuanto a la infección de células humanas y bovinas respectivamente (49).

La glicoproteína de adhesión G, con un peso de 90 kDa, fue identificada como la proteína de adhesión más importante, ya que al utilizar los anticuerpos específicos para la proteína G, éstos bloquearon la unión de partículas virales en el cultivo celular, mientras que, los anticuerpos para la proteína F evitaron la fusión pero no la unión del virus a la célula blanco; adicionalmente se encontró que la proteína G tiene un grado de glicosilación importante, ya que presenta glicosilaciones de tipo N y O, éstas se llevan a cabo en los residuos de serina y treosina, lo cual la define como una glicoproteína de tipo II. Se ha determinado que la proteína G tiene propiedades de mucina que promueve la adsorción del virus a las células huésped a través de la unión con los glicosaminoglicanos altamente sulfatados presentes en la membrana plasmática (50). Finalmente, la glicoproteína G tiene un motivo que le permite unirse al receptor de la fractalkina, y tal unión se tiene la hipótesis que es responsable de la depresión respiratoria, que tiene síntomas de respiración lenta que provoca que la ventilación en los pulmones no se ha adecuada, en neonatos infectados con el VSR (51-53).

La Proteína hidrofóbica (SH), es una pequeña proteína integral de membrana, está anclada al extremo N-terminal por una secuencia hidrofóbica, mientras que, el extremo C-terminal tiene una orientación extracelular. La proteína SH, intracelularmente se encuentra en múltiples formas: SH0 con peso de 7.5 kDa y SHt con un peso 4.6 kDa las cuales no presentan glicosilaciones; SHg con peso de 13-15 kDa que posee una cadena de carbohidratos unidos al extremo N-terminal y SHp con un peso de 21-30 kDa que tiene adición posterior de polilactosaminoglicanos en el extremo N-terminal. En la actualidad se sabe que la proteína SH al expresarse en conjunto con las proteínas G y F incrementa la fusión de las membranas, además, por su naturaleza de proteína hidrofóbica, SH participa en los procesos de penetración, adhesión y desnudamiento de las partículas virales (29).

La Proteína de matriz M con un peso de 27-29 kDa, es el componente interno más pequeño que los paramyxovirus comparten. Esta proteína M se acumula en la

membrana plasmática e interactúa con la proteína F y otros factores durante la morfogénesis de las partículas virales. Su papel para la formación de nuevas partículas virales se basa en que dirige el proceso de ensamble viral a través de su interacción con las membranas plasmáticas de la célula ya que se encuentra asociada a balsas lipídicas de la membrana lo que ayuda como una plataforma para el ensamble viral, tiene la función de mantener a la nucleocápside y con ello inhibir la transcripción antes de empaquetar a las nuevas partículas virales (53,54).

La nucleocápside del VSR está conformada por 4 proteínas; la proteína de nucleocápside N de peso 43 kDa, la polimerasa L con un peso de 250 kDa, la fosfoproteínas P con peso de 33-35 kDa y la proteína M2-1 con un peso 22 kDa, este complejo proteico cumple con papeles esenciales en diferentes eventos de transcripción y de replicación viral. La proteína N forma un complejo fuerte con el ARN genómico o antigenómico, este complejo es el que constituye la nucleocápside; dicho complejo protege al genoma viral de la acción de las ribonucleasas (ARNasa) durante la transcripción y replicación viral. La proteína P facilita dicha interacción al servir como chaperona de la proteína N (55). Estos oligómeros N-P también funcionan como cofactores de la enzima polimerasa viral. Para ésto la proteína P debe ser fosforilada, para que el complejo polimerasa sea funcional (56). La proteína L es la subunidad principal de la enzima ARN polimerasa dependiente de ARN. El oligómero formado por las proteínas N, P y L es suficiente para la replicación viral; sin embargo, el factor de antiterminación M2-1 es necesario que forme parte del complejo con el fin de obtener una máxima eficiencia en la transcripción. La proteína M2-1 cumple con este papel debido a que reduce el número de complejos de polimerasa que son separados del genoma. De esta manera, la proteína M2-1 facilita la transcripción a través de las regiones intergénicas e incrementa la expresión de los genes que se encuentran en la región distal (57,58).

La proteína M2-2 con un peso de 11 kDa, es un factor regulador, el cual juega el papel de cambiar el balance del complejo polimerasa del modo transcripcional al modo de replicación, teniendo una función en la regulación de la síntesis de ARN; en un estudio la proteína M2-2 se sobre expresó e inhibió la replicación del VSR, con lo que sugieren

que el nivel de M2-2 producido en las células infectadas es fundamental para la replicación del VSR (33,39,60,61)

Proteínas no estructurales:

Las Proteínas NS1 y NS2 tienen 139 y 124 aminoácidos respectivamente. Sólo son detectadas en pequeñas cantidades en viriones purificados. Inhiben la inducción del interferón α y β en respuesta a la infección viral. Ésto se logra por la inhibición de la fosforilación y la translocación nuclear del factor de regulación de interferón 3 (IRF3), el cual comienza con la señalización de la inducción del interferón en humanos (40). Inhiben la apoptosis, prologando la vida de la célula con lo que aumenta el rendimiento viral; NS1 y en menor medida NS2 inhiben la transcripción y la replicación de ARN viral, que afecta a los promotores genómicos y antígenómicos. Se sugiere que ambas proteínas podrían regular a la baja y frenar la síntesis de ARN viral (34,62,63).

1.2.5 Ciclo viral.

El primer evento durante el ciclo de infección por VSR es el reconocimiento de la célula huésped involucrando la participación de las glicoproteínas virales F y G. La unión primaria del virus a la célula blanco es promovida por la proteína de unión al receptor G, la cual se une a heparina y proteoglicanos de superficie celular (64). La proteína F es luego responsable de la penetración viral mediante la fusión de la envoltura viral con la membrana de la célula huésped. Se ha demostrado que la proteína F es capaz de unirse a heparan sulfato y sulfato condrotina B, aunque el requerimiento por los glucosaminoglicanos es menor que para la proteína G lo que sugiere la existencia de interacciones de un coreceptor como CX3CR1 y anexina II y en el caso de la proteína F a la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM 1), Rhoa, TLR4 (65,66). Se ha reportado que la proteína F estaría involucrada con la integrina $\alpha V\beta 1$ que permite la fusión y posterior entrada del virus a la célula huésped (67).

Los datos sugieren que la interacción de la proteína G con los glucosaminoglicanos podría ser el contacto inicial para facilitar el acceso. A partir del proceso de fusión de la partícula viral con la membrana plasmática de la célula blanco, la nucleocápside viral,

la polimerasa y el resto de las proteínas del virón son introducidas en el citoplasma de la célula infectada donde la transcripción y la replicación tienen lugar (figura 6).

La transcripción resulta en la síntesis de ARN mensajeros virales monocistrónicos, con cap 5', metilados y poliadenilados los cuales se traducen por la maquinaria celular. La etapa de transcripción da inicio cuando el complejo polimerasa interactúa con el promotor localizado en el extremo 3' del genoma viral. La transcripción de los genes del VSR ocurre de manera secuencial con la ayuda de la proteína M2-1 que permite al complejo polimerasa pasar a través de las regiones intergénicas. Los productos génicos se acumulan, y cuando el factor regulador M2-2 alcanza una cantidad proteica, después de la síntesis de los ARN mensajeros virales, el complejo polimerasa cambia de la forma transcripcional a la forma de replicación (68).

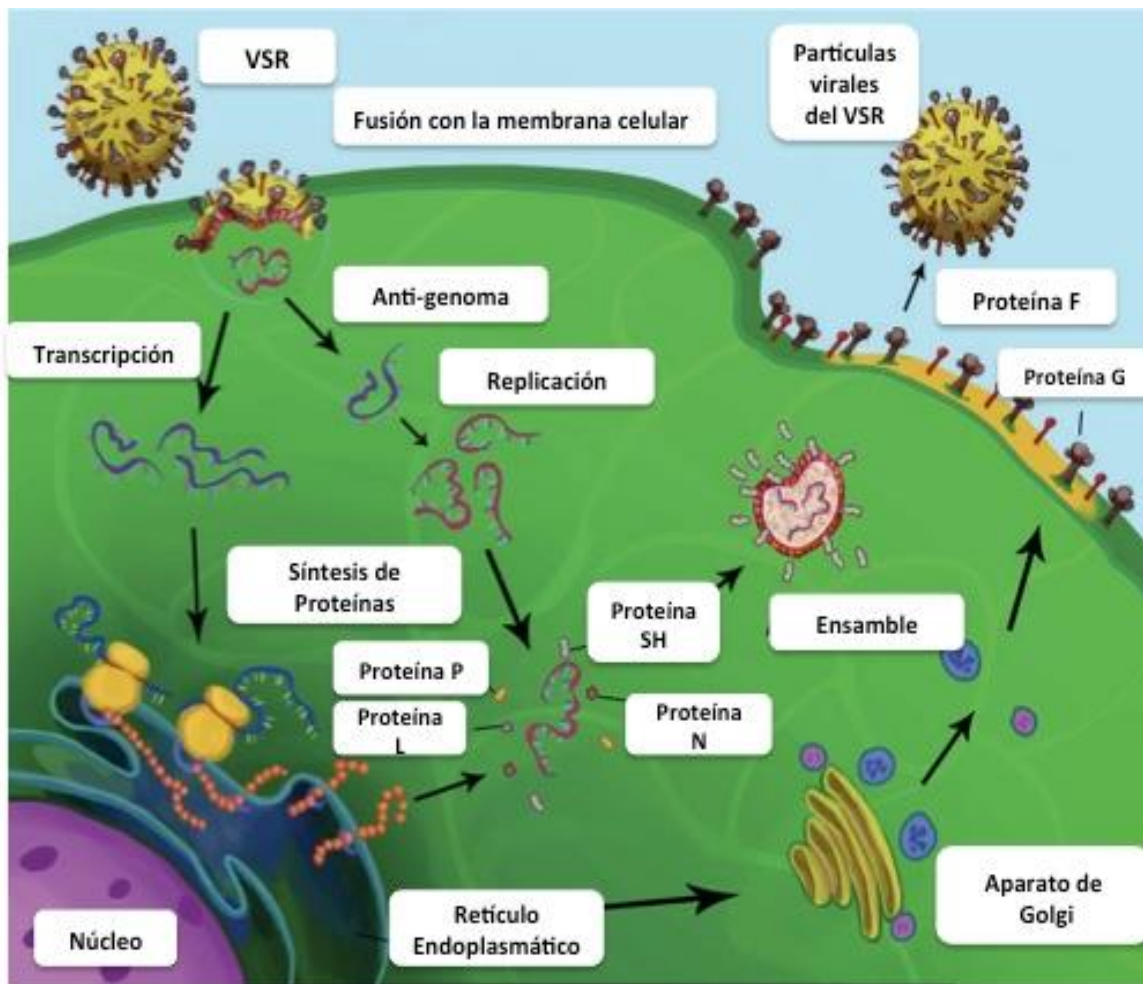


Figura 6. Ciclo viral del VSR. Representación del proceso infección del VSR sobre una célula y la interacción de proteínas virales, modificado (69).

Después los ARN mensajeros virales son poliadenilados y liberados del complejo proteico de transcripción como cadenas de ARN mensajero. El proceso de traducción de los ARN mensajeros virales, ocurre en el citoplasma a través de los complejos ribosomales de la célula huésped; la transcripción es un proceso que ocurre en un tiempo muy rápido, que los ARN mensajeros virales se ha detectado desde 4 a 6 horas después de una infección por VSR (70).

La replicación por su parte involucra la generación de un ARN completo, de polaridad positiva, complementario al genoma (el ARN antígenómico); éste es generado una vez finalizada la síntesis de ARN mensajero y actúa como molde para la síntesis del ARN negativo; la replicación del ARN se lleva a cabo por la proteína L, la cual también se encarga de añadir el cap y la cola de poli A en los ARN mensajeros monocistrónicos virales que después de ser producidos serán traducidos por los ribosomas, la unión de la proteína N al ARN genómico o antígenómico ocurre en el ensamble de la nucleocápside, se ha reportado que el proceso de replicación comienza con un aumento de la proteína N la cual se complementa con la incorporación del resto de las proteínas asociadas a la misma (71).

Las proteínas virales llegan al aparato de Golgi para glicosilarse y posteriormente migran a la membrana celular; simultáneamente son sintetizados los genomas y las proteínas virales (complejo RNP), las proteínas de la nucleocápside llegan a la membrana plasmática, donde interactúan con la proteína M, donde se concentran filamentos virales y se acumulan estructuras citoplasmáticas que son inducidas por el mismo virus, llamados cuerpo de inclusión, los cuales son sitios de replicación del VSR (72,73), estos cuerpos de inclusión se encuentran localizados en regiones enriquecidas de balsas lipídicas. Por otro lado, las proteínas F, G y SH también se acumulan en las balsas lipídicas (74). Así, las balsas lipídicas constituyen microdominios donde ocurre el proceso de ensamblaje y de salida de las partículas de VSR, la producción de partículas virales ocurre de 10 a 12 horas después de la infección, la salida de las partículas virales se da por gemación y adquieren una envoltura lipídica que proviene de la membrana plasmática de la célula infectada, esto ocurre por el lado apical de las células del epitelio bronquial (52,75,76). Las proteínas NS1 y NS2 juegan diferentes papeles en la regulación negativa de la producción de IFN al interferir con la activación del receptor RIG-I con la molécula de señalización antiviral de la mitocondria (MAVS).

La degradación de STAT2 por NS2 es probable que se produzca a través de un mecanismo de proteasoma , mientras que NS1 tiene el potencial de actuar como una enzima ubiquitina ligasa y con ello marcar a la molecula STAT2 hacia el proteasoma. Tanto NS1 y NS2 están asociados con la inhibición de la señalización de RIG-I-MAVS. NS1 co-localiza con MAVS para inhibir la interacción RIG-I-MAVS que se requiere para la producción de IFN, mientras que NS2 inhibe la activación de la transcripción de IFN-I mediante la interacción con RIG-I. Con lo que las proteínas NS inhiben la señalización antiviral IFN en múltiples sitios. Las proteínas NS suprimen la defensa antiviral del huésped y podrían asegurar un seguimiento eficaz en la replicación viral independiente de la activación endógena del IFN-I. Ya que el IFN regula la apoptosis a través de múltiples vías, las proteínas NS1 y NS2 inhiben la síntesis y la respuesta del IFN, se reportó que estas proteínas suprimen la apoptosis temprana de la célula infectada y mejoran la replicación viral, ésto se debe a la activación de NF-kB y P13K/AKT (63,77-82).

1.3 Infección vertical.

La mujer embarazada está expuesta a contraer infecciones por diversos patógenos; muchas implican un riesgo de afectar al feto y al recién nacido. La transmisión de la madre a hijo se le denomina transmisión vertical, puede ocurrir durante el embarazo, el parto o aún posparto siendo concretamente:

- 1) Intrauterina: pasando los patógenos de la madre gestante al feto vía transplacentaria ,antes que ocurra el parto.
- 2) Intranatal: por el contacto del feto con la sangre, secreciones u otros productos contaminados de la madre durante el parto.
- 3) Posnatal: tras el nacimiento, a través de la lactancia materna.

En la mayoría de los recién nacidos con infecciones perinatales se encuentran en buenas condiciones de salud al momento de nacer, ésto genera confusión y un alto

costo económico por las secuelas que se muestran después en etapas de niñez o adolescencia (83).

La infección por VSR requiere un contacto directo de persona infectada o por el contacto con superficies contaminadas con VSR, por lo cual una infección horizontal es la ruta más común para su diseminación. Las vías por las cuales el VSR se puede propagar son diversas, desde el sudor, la saliva, secreciones nasales y heces fecales. Este virus presenta tropismo hacia las vías respiratorias y tejidos pulmonares y se replica en la capa superficial del epitelio respiratorio (21).

Por muchos años, ha sido aceptado que la fisiopatología durante una infección por VSR es impulsada por una respuesta inflamatoria provocada por una transmisión horizontal. Hasta ahora, se creía que cuando una mujer embarazada tenía un resfriado producido por una infección viral, el feto en desarrollo estaba protegido por la placenta de diferentes agentes infecciosos como el VSR y otros virus respiratorios (8,84,85).

1.4 Interfase placentaria.

La formación del complejo transplacentario es el resultado de la interacción entre los tejidos extraembrionarios y los tejidos endometriales de la madre (figura 7). La placentación implica el establecimiento de una relación entre la madre y el embrión, y representa una característica propia de los mamíferos. (86) La formación del complejo transplacentario representa un esfuerzo entre los tejidos extraembrionarios y el endometrio materno. Cuando la implantación se ha completado, el trofoblasto original se ha diferenciado en dos capas: el citotrofoblasto veloso interno y el sincitiotrofoblasto externo. Las lagunas existentes en el trofoblasto en expansión rápidamente se han llenado con sangre materna y las células del tejido conectivo endometrial han pasado por la decidualización en respuesta a la infiltración trofoblástica. A finales de la segunda semana de gestación empiezan a formarse proyecciones citotrofoblásticas bien definidas denominadas vellosidades primarias, que se caracterizan por estar formadas sólo por citotrofoblastos y sincitiotrofoblastos. Poco después, las vellosidades primarias se expanden, dando vellosidades secundarias, dentro de las cuales aparece una zona central mesenquimal. Están rodeadas por una

capa de células citotrofoblásticas, y por fuera de ella se encuentra el sincitiotrofoblasto (87,88).

Al final de la tercera semana de gestación, las vellosidades secundarias se convierten en vellosidades terciarias ya que se ramifican y su zona mesenquimal es atravesada por vasos sanguíneos fetales. Bajo el efecto del ambiente local hipóxico, la columna citotrofoblástica se expande distalmente, atravesando la capa sincitiotrofoblástica, comprime la decidua materna y crece sobre la misma formando una capa celular completa que rodea a todo el embrión. Las vellosidades que dan lugar a estas extensiones citotrofoblásticas se denominan vellosidades de anclaje, debido a que representan los puntos reales de unión entre el embrión y los tejidos maternos. Las ramas que quedan sin fijar se denominan vellosidades flotantes y se mueven libremente en la sangre materna que llena el espacio entre la placa corial y la cubierta citotrofoblástica.

En las vellosidades flotantes, las células citotrofoblásticas se diferencian por fusión para formar el sincitiotrofoblasto multinucleado, estando en la superficie de la vellosidad y en contacto con la sangre materna, será el responsable del intercambio de gases y nutrientes entre la madre y el feto, así como también de la producción de hormonas placentarias y factores de crecimiento (89).

Una vez que la vellosidad corial madura, queda formada por una masa muy compleja de ramificaciones. La parte central de la vellosidad está constituida por vasos sanguíneos y por mesénquima que contiene las células de Hofbauer dispersas, las cuales actúan como macrófagos fetales. La parte central de la vellosidad está cubierta por una capa continua de sincitiotrofoblastos con células citotrofoblásticas bajo la misma. Además, durante todas las etapas de la gestación, existe en las vellosidades una población indiferenciada de células que son citotrofoblastos disponibles para diferenciarse cuando sea necesario (87).

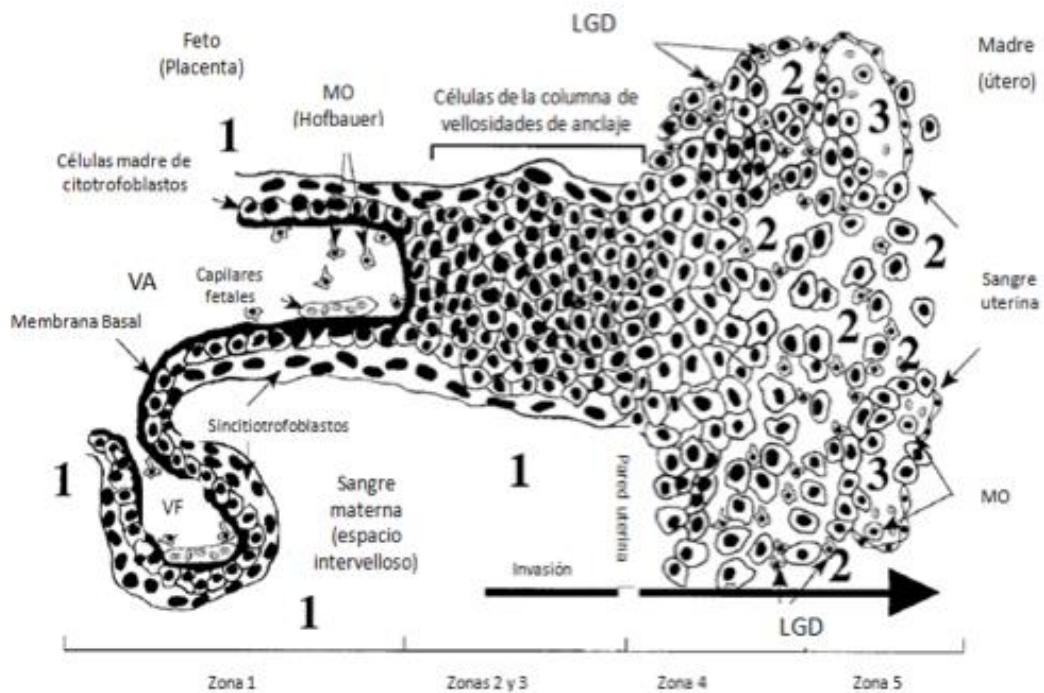


Figura 7. Diagrama de una sección longitudinal. Incluye un flotante y una de vellosidades coriónicas de anclaje en la interfase materno-fetal cerca del final del primer trimestre del embarazo humano (10 semanas de edad gestacional). La vellosidad de anclaje (VA) funciona como un puente entre los compartimentos feto y la madre, mientras que la vellosidad flotante (VF), que contienen macrófagos (MO, células de Hofbauer) y los vasos sanguíneos fetales, está inmersa por la sangre materna. Citotrofbastos en las VA forma la columna de vellosidades (zona1) que se adhieren a la pared del útero (zonas 2 y 3). Citotrofbastos invaden la pared uterina (decidua y primer tercio del miometrio zona 4) y la vasculatura materna (zona 5), anclando de ese modo el feto a la madre y el acceso a la circulación materna. Leucocitos granulares deciduales (LGD) y macrófagos (MO) en la sangre materna; áreas propuestas como sitios de transmisión del virus (1, 2, 3), modificado (89).

Diversos agentes virales como los *flavivirus*, *herpervirus*, *retrovirus* e incluso *ortomixovirus*, se han reportado que atraviesan la barrera materno-fetal, usando diversas estrategias; para ello diferentes ensayos han empleado líneas celulares de origen trofoblástico (Bewo, JAR, JEG-3) ya que poseen propiedades morfológicas y marcadores bioquímicos comunes con los trofoblastos de cultivo primario; estas células son usadas como un primer parámetro para identificar los patrones de entrada viral, permisividad, y susceptibilidad de las células a la infección (6,7). Los hallazgos en estas investigaciones han sido empleados para diseñar pre estrategias antivirales y la posible similitud con un cultivo primario de células trofoblásticas. Entre los virus que se emplearon para infectar las líneas celulares de trofoblasto se tiene el VIH, Citomegalovirus, Dengue, Zika, Herpes Simplex, Hepatitis B y C (90-92).

Posteriormente, si existe permisividad se analiza el proceso de infección en un cultivo primario de trofoblastos humanos, donde el VIH, Citomegalovirus, Zika, Herpes Simplex, Hepatitis B y C son susceptibles (tabla 2). En un estudio con Hepatitis B se describió como la partícula viral emplea algunos mecanismos para poder entrar a la célula y producir una infección vertical, a este respecto se usaron células Bewo cultivadas en membranas (transwell) y con ellas se evaluó el transporte viral por microscopia confocal, evidenciando que el virus usa la transcitosis como vía de entrada a la célula, posteriormente en cultivo primario identificaron el decremento de la diferenciación de los citotrofoblastos con lo que sugieren que la madurez de las células protege al feto de la infección (93). Por otra parte, con el virus de la Hepatitis C se evaluaron eventos de replicación viral por RT-PCR en los sobrenadantes de citotrofoblastos infectados, adicionalmente se observó por microscopia electrónica estructuras inducidas por la infección en los citotrofoblastos infectados las cuales son diferentes a las células no infectadas, demostrando hiperplasia lisosomal, alteraciones en retículo endoplasmático rugoso, disminución en agregados lipídicos, presencia de vacuolas y aparición de partículas virales de Hepatitis C, evidenciando que este virus infecta *in vitro* al citotroblasto y sugiriendo una posible infección vertical (94). En Dengue por medio inmunohistoquímica se identificaron la expresión de antígenos virales concretamente NS1 y NS3 dentro de células de cordón umbilical, lo cual sugiere que altera la permeabilidad y permite la replicación viral induciendo citocinas y éstas modulando la señalización de la respuesta inmune (95). Recientemente se descubrió que Zika infecta en menor grado estas células y sigue otra estrategia para llegar al feto, como lo son la infección de macrófagos de tipo Hofbauer. Esto lleva a que la infección por virus en las líneas celulares de origen trofoblastos, son claves para una posible infección *in vivo* y la repercusión al feto (96).

Enfermedad	Año 2008		Año 2009	
	Casos (n)	Incidencia**	Casos (n)	Incidencia**
Candidiasis urogenital	255,688	858.2	248,785	826.02
Enfermedad de Chagas	98	0.3	81	0.27
Herpes genital	891	1.04	975	3.24
Hepatitis A	1,541	16.38	1,545	5.13
Hepatitis B	166	0.68	137	0.45
Hepatitis C	407	1.76	411	1.36
Leishmaniasis	121	0.38	91	0.30
Paludismo <i>P. vivax</i>	518	1.98	565	1.88
Paludismo <i>P. falciparum</i>	0	0.0	0	0.0
Rubéola adquirida	18	0.04	0	0.0
Sífilis adquirida	1,393	2.78	1,152	3.82
Tuberculosis pulmonar	3,154	10.46	3,155	10.48
Tuberculosis meníngea	52	0.16	58	0.19
Tuberculosis, otras formas	799	2.56	783	2.60
Virus del papiloma humano	19,735	41.26	23,285	77.31
Fiebre por dengue	9,055	28.95	42,648	141.60
Fiebre hemorrágica por dengue	2,322	7.04	3,488	11.55

Tabla2. Casos reportados de enfermedades transmisión vertical. Las enfermedades se reportaron en mujeres en México entre 15 a 49 años de edad (97).

Las infecciones verticales, en un 80 a 90% de los casos, no presentan signos clínicos al nacer o aparecen días después, mientras que del 10 a 20% restante pueden presentarse varios síntomas como: problemas hepáticos, alteraciones cardíacas y encefálicas, sólo por mencionar las más comunes, y dependerá del tipo de infección que estén presentes unos u otros signos (4,8).

El VSR se ha identificado en un modelo animal, una posible infección vertical. Se evaluó en un modelo en ratas gestantes que el VSR es capaz de propagarse a través de la circulación materna a la fetal, posteriormente se detectó niveles de VSR durante el desarrollo en embriones, en los pulmones de las ratas neonatas, en su etapa neonatal y en la edad adulta; lo cual sugiere que el VSR se transmite de la madre a la descendencia. La infección se asoció con la desregulación de las vías neurotróficas durante el desarrollo fetal, lo que lleva al aumento de la reactividad de las vías respiratorias después de la reinfección posnatal con VRS. Esto sugiere que posiblemente la infección por VRS no solo se adquiere después del nacimiento y existe efectos prenatales asociados a la infección, desencadenando consecuencias más graves y persistentes (bronquiolitis y asma) al interferir con los procesos embrionarios (4,11,85).

2. JUSTIFICACIÓN.

En diversos estudios se ha reportado que *flavivirus*, *herpesvirus* y *retrovirus* son los principales agentes virales transmitidos verticalmente, pocos son los estudios clínicos acerca de la incidencia de infecciones respiratorias en el embarazo. Sin embargo, recientes hallazgos pueden sugerir que virus respiratorios tienen la capacidad de producir una infección vertical. Adicionalmente el VSR es la principal causa de ingreso médico de la población de neonatos y niños por lo cual es probable que una infección vertical persistente adquirida en el útero podría ser un factor de este problema. Se tiene reporte de estudios en un modelo animal concretamente en rata, donde se muestra que las vías respiratorias los fetos adquirieron la infección del VSR, esto sugiere que en este modelo existe una infección en la interfase materno-fetal. Para llegar a la vías respiratorias del feto, el VSR debió interactuar con un puente transplacentario (madre-hijo) como se ha reportado con el citomegalovirus, VIH, Hepatitis B y C; en este puente se encuentran las células trofoblásticas que son fundamentales para el transporte de nutrientes, y factores necesarios para el desarrollo del producto. Se desconoce la permisividad de las células placentarias humanas al VSR, para ello se desarrollará el modelo de infección en una línea celular de coriocarcinoma humano, la cual ha sido utilizada ampliamente en diferentes estudios de infección vertical por virus y con ello establecer la eficiencia del proceso de infección con el VSR.

3. HIPÓTESIS.

La línea celular de coriocarcinoma humano Bewo es permisiva a la infección por el VSR, por lo cual se identificará ciclo completo de infección viral.

4. OBJETIVO GENERAL.

Caracterizar el ciclo de infección del VSR en la línea celular de placenta (Bewo).

4.1 Objetivos Particulares.

- I. Generar un stock del virus sincitial respiratorio en células Hep-2.
- II. Determinar si existe entrada de VSR en las células Bewo identificando la proteína F y M2-1 por inmunofluorescencia y western blot.
- III. Identificar la acumulación de antígeno viral durante una cinética de infección en células Bewo.
- IV. Analizar la permisividad viral mediante cinéticas de infección a diferentes multiplicidades de infección por ensayos de Inmunofluorescencia.
- V. Determinar la producción de partículas virales infectivas en sobrenadantes de células Bewo, al reinfectar células A549.

5. METODOLOGÍA.

Cultivos celulares.

La línea celular epitelial humana derivada de carcinoma laríngeo (Hep-2) se propagaron en medio DMEM (GIBCO), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de antibiótico-antimicótico (penicilina sódica 10,000 U/ml, sulfato de estreptomicina 10,000 µg/ml GIBCO) se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%.

La línea celular de coriocarcinoma humano (Bewo) se propagaron en medio F-12K (GIBCO) adicionando 10% de SFB y 1% de antibiótico-antimicótico (penicilina sódica 10,000 U/ml, sulfato de estreptomicina 10,000 µg/ml GIBCO) se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%.

La línea celular epitelial alveolar basal humana (A549) se propagaron con medio DMEM (GIBCO) con 10% SFB, y 1% de antibiótico-antimicótico (penicilina sódica 10,000 U/ml, sulfato de estreptomicina 10,000 µg/ml GIBCO) y 1% L-glutamina (GIBCO) se incubaron 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%.

Propagación del Virus Sincitial Respiratorio.

Células Hep-2 se crecieron en medio DMEM (GIBCO) suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico-antimicótico en una caja de 150 cm² se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% hasta que se llegó a un 90% de confluencia, estas células son ampliamente utilizadas para la propagación de VSR. Antes de la infección las células se lavaron dos veces con PBS 1X, posteriormente se dejaron con 5 ml de medio base DMEM y se infectaron con VSR (donado por Dra. Beatriz Gómez García Facultad de Medicina, UNAM el cual fue adquirido por la empresa ATCC VR-1580™) . Se incubaron 2 horas con agitación cada 15 minutos. Finalizado el tiempo se agregó DMEM con 2% de SFB y 1% de antibiótico-antimicótico, las células fueron incubadas

hasta la formación de sincitios en un 80% en el cultivo celular, posteriormente las células se despegaron mediante un scraper y el sobrenadante se homogenizó a 4 grados, enseguida se sonicó a 25W por 3 ciclos de 5 segundos a 4 grados, y finalmente se centrifugó a 3,000 rpm por 7 minutos a 4°C, con el sobrenadante se hicieron alícuotas de 400 µl y se congeló a -70° hasta su uso.

Titulación del abasto viral.

Para determinar el título viral de estos sobrenadantes se realizaron ensayos de titulación por placa lítica y con ello determinar las unidades formadoras de placa (UFP). Este ensayo es utilizado para conocer la cantidad de partículas infecciosas por mililitro de solución y conforme a esto se pueda estimar la multiplicidad de infección (MOI). Se sembraron células Hep-2 en medio DMEM al 10% de SFB y 1% de antibiótico-antimicótico, en una placa de 6 pozos con 1,500,000 células en cada uno. Por otra parte se realizaron diluciones seriadas del abasto viral, se adicionaron a cada tubo 800 µl de DMEM base, estas fueron incubadas en hielo, posteriormente se le agregó 100 µl del virus al primer tubo y se agitó con vortex, se hicieron 5 diluciones seriadas a la original y se usó un control sin infectar. A cada pozo se le inoculó 800 µl de cada dilución. Las células se incubaron durante 2 horas a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% con una agitación cada 15 minutos y aproximadamente 30 minutos antes que termine la incubación del inóculo se preparó una mezcla de 1 parte de agarosa al 3%, previamente fundida en parrilla de calentamiento y 9 partes de DMEM con 2% SFB tibio (la concentración total de agarosa fue de 0.3% P/V) la mezcla se mantiene a baño maría a 50 y 60°C hasta usarlo. Posteriormente a las 2 horas de incubación se le adiciono 3 ml a cada pozo de la solución de agarosa al 0.3% P/V.

Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% y se dejó por 4 días para la formación de placas líticas. Finalmente pasados los 4 días, se agregaron 3 ml de formaldehído (3.65% V/V) sin quitar la agarosa y se dejó incubando por 1 hora a temperatura ambiente; se retiró el formaldehído de los pozos a chorro de agua, la agarosa se quitó sumergiendola en un recipiente con agua y por último se agregó 5 ml a cada pozo del colorante naftol azul-negro 0.1% (SIGMA), acetato de sodio 1.36%,

ácido acético glacial al 6% durante 30 minutos, los pozos fueron lavados con agua y las placas líticas fueron calculadas con la siguiente fórmula:

$$UFP = \frac{(\bar{x} \text{ de placas})(\text{disolución})}{\text{volumen inoculado}}$$

Evaluación de la entrada viral por Inmunofluorescencia y Western Blot.

Las células Bewo y Hep-2 se cultivaron en cubreobjetos a una confluencia de 150,000 y 80,000 células respectivamente. Se infectaron con una multiplicidad de infección de 1 MOI del VSR y virus inactivo por calor (Mock) para el control negativo, se dejaron absorbiendo durante 2 horas y cada 15 minutos se agitaron, finalmente el inóculo fue retirado y se lavaron con PBS 1X estéril y se adicionó medio de crecimiento, las células se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%, posteriormente se agregó medio DMEM al 10% SFB y 1% de antibiótico-antimicótico y se dejó la infección por 24 horas en incubación de 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Pasado el tiempo se fijaron las células con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 30 minutos, las células se lavaron con PBS1X-0.1%tritonX100, después se le agregó la solución permeabilizadora (PBS1X-0.1%tritonX100 y 0.05 mg de gelatina) durante 40 minutos, posteriormente se lavaron 3 veces con PBS1X-0.1%tritonX100. Después de los lavados se le agregó a las células solución de bloqueo (PBS1X-triton 0.1% y 1% de suero de cabra) y se incubó durante 1 hora, finalizado el tiempo de incubación las células fueron lavadas como lo descrito anteriormente. A continuación las células fueron incubadas con el anticuerpo primario para la anti-mouse-F (proteína F del VSR) a una dilución (1:100) por una hora, finalizado el tiempo las células se lavaron y se incubó para el anticuerpo secundario anti-mouse FITC a una dilución 1:100 por una hora; finalmente las células fueron lavadas y se montaron las preparaciones en portaobjetos con 3 µl DAPI y se analizaron en microscopio confocal Leica TCS SP5.

Para el ensayo de western blot se obtuvo un extracto proteico, primero se cultivaron 1×10^6 células Bewo en botellas 25 cm², luego fueron infectadas con el VSR a 5 MOI y con virus inactivo como control negativo. Se incubaron a 24 horas en condiciones anteriormente descritas. Después del tiempo de incubación las células se tripsinizaron con Tripsina-EDTA, se resuspendió con PBS 1X estéril y se centrifugaron a 1,000 rpm por 5 minutos, posteriormente el paquete celular se resuspendió con PBS 1X y se centrifugó a 2,000 rpm 5 minutos. El paquete celular se incubó con 100µL de buffer RIPA (NaCl 150mM, Tritón 1%, Deoxicolato de sodio 0.5%, Tris base pH 8.0 y SDS 0.1%) a 4°C por 1 hora en agitación, posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm por 20 minutos a 4°C y los sobrenadantes se recuperaron, se les agregó inhibidor de proteasas y se almacenaron a -20°C. Adicionalmente con las alícuotas de los extractos se realizó una cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford (Bio-Rad) con el equipo Synergy™ HT (BioTek) midiendo la absorbancia a 630nm y utilizando una curva estándar de albúmina, para identificar la concentración final de cada extracto.

Finalmente con estos lisados se tomaron 50 µg de cada extracto proteico y se resuspendieron en buffer laemmli, se desnaturalizaron las proteínas a temperatura de 96°C durante 10 minutos. Se realizaron geles desnaturalizantes de poliacrilamida 10% y 12% para M2-1, 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 incubó en la membrana el anticuerpo primario anti-mouse-F (dilución 1:500) y en otra membrana anti-mouse-M2-1 (1:500) en 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 goat-anti-mouse HRP (1:10,000) con PBS-Tween-leche 5% durante 1 hora a temperatura ambiente, posteriormente se lavó con las condiciones antes mencionadas. Finalmente se reveló la membrana mediante el uso de un Kit

ultrasensible de quimioluminiscencia (SuperSignal™ West Femto, Thermo Scientific) y se detectó empleando el sistema ChemiDoc™ MP System, Bio-Rad.

Determinación de acumulación de antígeno viral del VSR mediante ensayos de Western Blot.

En este ensayo, se obtuvieron extractos proteicos de las células Bewo infectadas con el VSR a tiempos de 12, 24 y 36 horas y un Mock como control negativo. Después de los tiempos transcurridos de infección se tripsinizaron las células y se resuspendió con PBS 1X estéril para centrifugar a 1,000 rpm por 5 minutos, obteniendo los extractos como se mencionó anteriormente.

Con los lisados obtenidos se comenzó el western blot, en un gel desnaturizante de poliacrilamida al 12% y se prosiguió la electroforesis y transferencia como lo mencionado anteriormente, después se incubó el anticuerpo primario anti-mouse-M2-1 (1:500) en PBS-Tween-leche descremada 5% durante 1 hora, finalmente se agregó el anticuerpo secundario goat-anti-mouse HRP (1:10,000) y se reveló la membrana como lo descrito anteriormente.

Cinéticas de crecimiento viral del VSR en células Bewo por ensayos de Inmunofluorescencia

Las células Bewo se cultivaron en cubreobjetos a una confluencia de 150,000 células; mientras que las células Hep-2 con una confluencia de 80,000 células. Se infectaron células con VSR a 1 MOI, 5 MOI y 10 MOI y Mock y se dejaron incubando durante 2 horas en condiciones ya descritas; posteriormente se incubaron por 12, 24 y 36 horas a 37°C con CO₂ al 5%. Una vez finalizado el tiempo de incubación se fijaron las células con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 30 minutos y se desarrolló el método de inmunofluorescencia descrito anteriormente para detectar a la proteína F de VSR.

Finalmente se analizaron 5 campos donde se cuantificaron las células que fueron positivas a la infección por VSR en el microscopio confocal Leica TCS SP5

Determinación de producción de partículas virales del VSR.

Con los sobrenadantes de la cinética anterior, se evaluó la producción de partículas virales; para esto se recuperaron los sobrenadantes de células Bewo infectadas con el VSR; adicionalmente se cultivaron células A549 en cubreobjetos con confluencia de 80,000. Posteriormente las células fueron infectadas a 12, 24 y 36 horas bajo las condiciones ya descritas. Una vez transcurrido el tiempo de infección, se fijaron con PFA 4% y se desarrolló la inmunofluorescencia como ya se mencionó anteriormente, utilizando un anticuerpo contra la proteína viral F de VSR. Finalmente se observaron las muestras al microscopio confocal Leica TCS SP5.

6. RESULTADOS.

Obtención del abasto viral.

Para evaluar el ciclo de replicación del VSR en las células Bewo se generó un abasto viral a partir de la línea celular Hep-2 la cual ha sido un modelo ampliamente utilizado para el estudio y propagación del VSR (98). Como se observa en la figura 8 existe un efecto citopático (formación de sincitios) el cual es característico de la infección con el VSR. Adicionalmente se observó como este efecto se incrementa pasando el tiempo pos-infección de 24 a 48 horas, por lo cual se decidió a cosechar a las 48 horas cuando los sincitios tiene un mayor tamaño y éstos no se despegan ya que a 72 horas ocurre lo antes mencionado. Posteriormente el stock viral se utilizó para determinar cuántas partículas virales se tenían con el ensayo de UFP en la figura 9 se muestra dicho ensayo y se observó que el VSR generó placas líticas hasta la dilución 1×10^{-5} y se determinó el título viral por la fórmula antes mencionada, obteniendo un título de 1.5×10^{-5} UFP/ml.

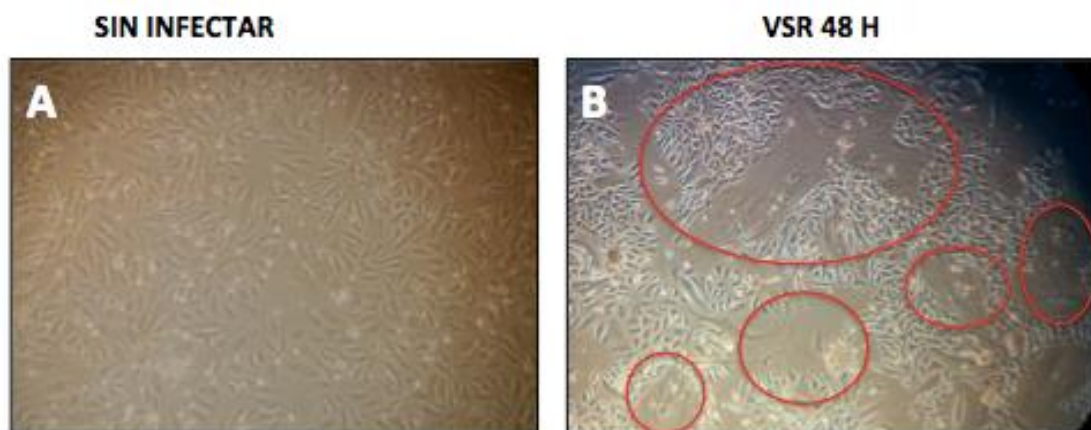


Figura 8. Efecto citopático en células Hep-2 por infección de VSR 10X. A) control negativo sin infectar, B) La formación de sincitios marcados en rojo, por infección del VSR a 48 horas.

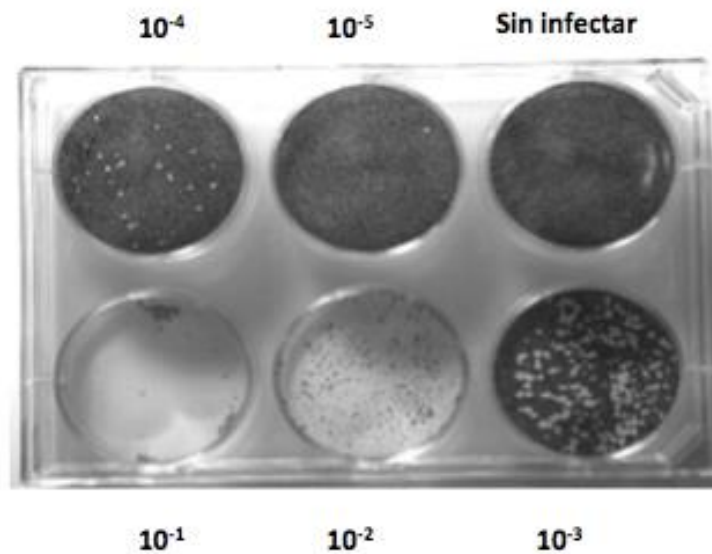


Figura 9. Titulación del VSR. Se infectaron células Hep-2 con diluciones seriadas del virus y un control sin infectar, tomando la dilución de 10^{-5} .

Determinación de entrada viral en células Bewo detectado la proteína F y M2-1 del VSR.

Como primer acercamiento se decidió a evaluar si el VSR podría acceder a la línea celular Bewo, lo cual nos sugiere la posible existencia de un receptor en membrana plasmática, el cual estaría participando en un proceso de anclaje y entrada viral. Por tal razón se infectaron células Bewo a 5 MOI durante 24 horas así como la línea Hep-2 como un control positivo de infección, y se analizó por inmunofluorescencia la expresión de la proteína F. Como se observa en la figura 10 A, se identificó señal positiva en las células Bewo infectadas, no siendo así en las células infectadas con un virus inactivado por calor (Mock), lo cual nos indica que el virus pudo entrar a la línea celular Bewo. Adicionalmente se pudo observar el mismo patrón de agregados citoplasmáticos (cuerpos de inclusión viral) tanto en la línea hep2 y Bewo (figura 10 B), estos agregados son importantes para la replicación viral, lo cual sugiere que el virus puede generar el mismo efecto citopático característico de la infección en la línea placentaria. Para tener una evidencia más de este fenómeno, se identificó otros antígenos virales por ensayos de western blot, como se observa en la figura 11, en los extractos de células Bewo infectadas, una banda de 55 KDa y 22 KDa que corresponden a los pesos para la proteína F y M2-1 respectivamente, lo cual no fue

observado en las células falsamente infectadas. Estas evidencias nos sugieren que el VSR, puede entrar a la células Bewo.

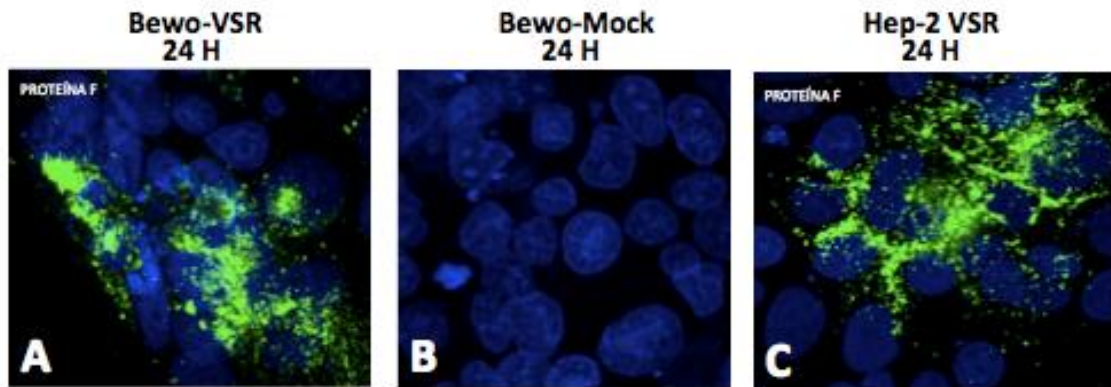


Figura 10. Infección del VSR a células Bewo por inmunofluorescencia. A) se observa como las células Bewo son positivas a la infección por VSR con 5 MOI. B) teniendo un control negativo falsamente infectado (Mock) y C) las células Hep-2 que son permisivas a la infección son también positivas para anti-F a 5 MOI. Tinción celular con DAPI/anti-F VSR.

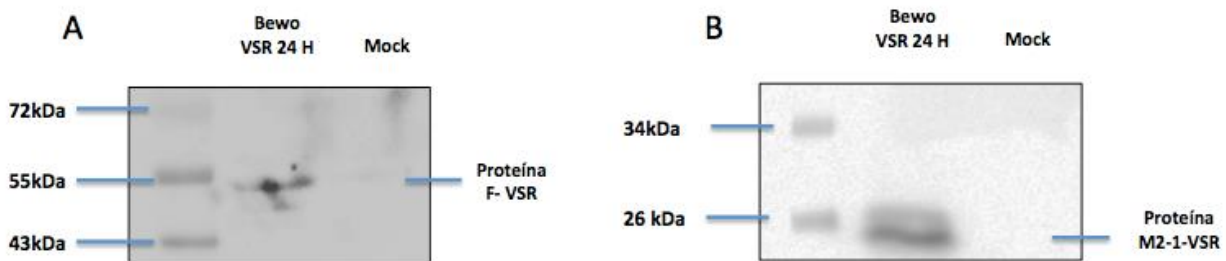


Figura 11. Infección de células Bewo por western blot. Se observó la expresión de la proteína F A) a 24 horas y de igual forma B) la proteína M2-1 se expresó a 24 horas posinfección.

Determinación de la acumulación de antígeno viral posinfección.

Establecida la entrada del VSR en la línea celular Bewo, el siguiente evento del ciclo de infección son los procesos de replicación y traducción del genoma viral, en este evento los virus emplean la maquinaria de la célula para producir proteínas virales. Para ello, se realizó la identificación de acumulación de antígeno viral y así de forma indirecta sugerir que el genoma viral replica y se traduce en la línea Bewo, por lo cual

una cinética de infección fue llevada a cabo, considerando tiempos tempranos y tardíos y finalmente identificar en la línea celular Bewo el punto máximo de acumulación de proteína viral; ya que se ha determinado que durante una infección viral activa hay acumulación de proteínas virales transcurrido el tiempo posinfección. Los resultados obtenidos identificaron la expresión de la proteína M2-1 con una banda de un peso de 22kDa similar a lo reportado en diversos estudios; donde el incremento de proteínas virales ocurre transcurrido el tiempo posinfección. Adicionalmente el control de carga de β -actina, comprueba que esta acumulación es generada por la infección viral (figura 12).

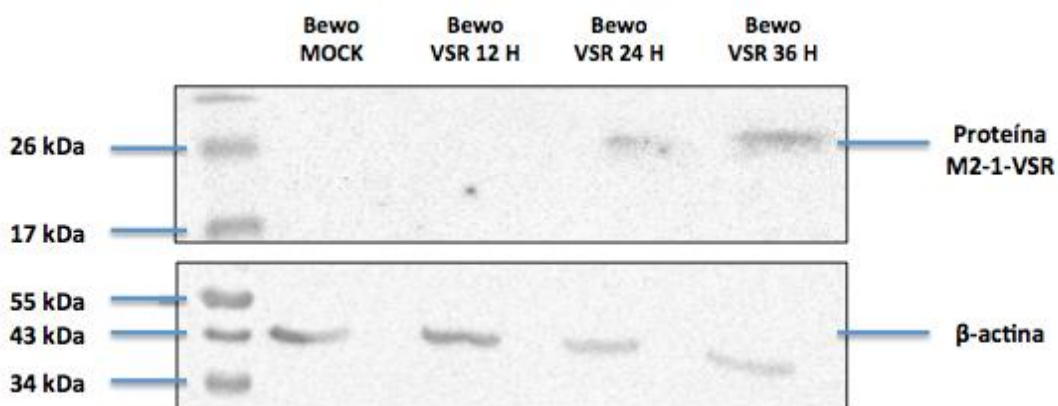


Figura 12. Acumulación viral de células Bewo. Se observa que existe un incremento de la proteína viral donde se nota que a 36 horas la banda es mas gruesa, en comparación del Mock donde no muestra expresión.

Permisividad viral de la línea celular Bewo por infección del VSR.

Para establecer la permisividad de las células Bewo a la infección con el VSR, las células fueron infectadas con diferentes MOI a tiempos tempranos 12 horas y tardíos 48 horas, y con ello monitorear el efecto citopático y la acumulación de antígeno viral al detectar la proteína viral F. El comportamiento de la infección a 12 horas en la línea celular Bewo mostró que a tiempos tempranos con diferentes MOI, se observa un efecto acumulativo discreto a la señal positiva de la proteína viral F (figura 13 A,B,C) conforme las multiplicidades se incrementaron; este fenómeno es mas evidente a las 48 horas observándose un mayor efecto citopático y menor cantidad de células asociado a la posible muerte por la infección por VSR (figura 13 E, F, G); este

comportamiento de la acumulación de antígeno viral es similar al control positivo con células Hep-2 llevando el mismo patrón de incremento con el tiempo y concentración viral (figura 13 D, H).

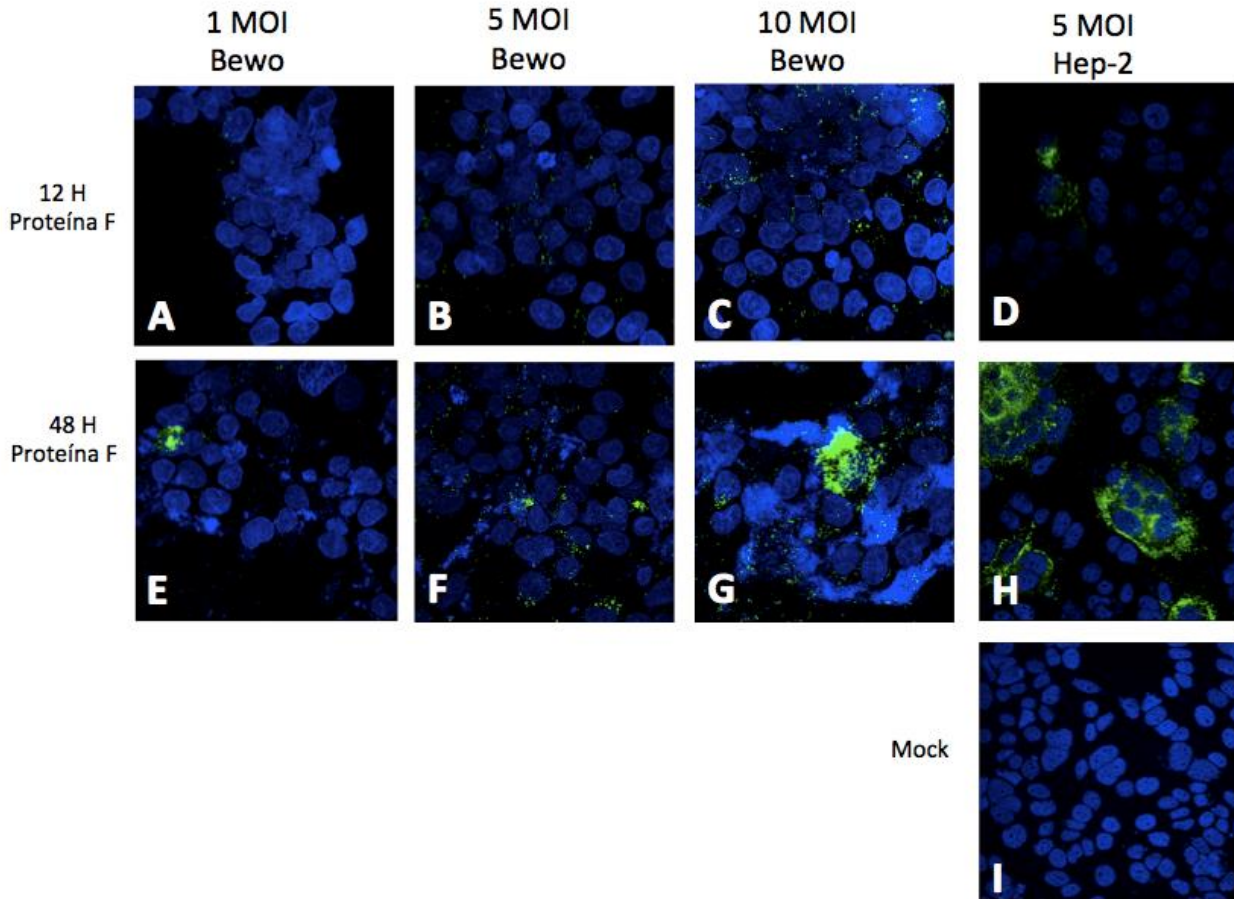


Figura 13. Permisividad viral en línea Bewo. Se observa que en las etapas tempranas de infección es muy poca la señal positiva de la anti-F ni con 10 MOI se ve un cambio en el aumento de la señal (A,B,C), mientras que a etapas finales de la infección se nota el incremento conforme aumenta la concentración viral y a 10 MOI se nota desprendimiento de células por efecto citopático (E,F,G); se aprecia que el control positivo (y H) tiene el mismo patrón de crecimiento de la señal positiva, mientras que en el Mock (I) no hay señal de la proteína F.

Determinación de la producción de partículas de partículas virales del VSR.

El ciclo de infección viral tiene como finalidad la generación de partículas virales competentes para poder infectar a otras células, por lo cual este fenómeno fue determinado en la línea celular Bewo, al evaluar si los sobrenadantes de células Bewo infectadas con VSR pueden infectar otra línea permisiva al VSR. Para garantizar la presencia de partículas virales, los sobrenadantes de se cosecharon a 36 horas y se utilizaron para infectar la línea celular A549. Los ensayos de inmunofluorescencia demostraron la presencia de señal positiva para la proteína viral F, así como una mayor cantidad de células infectadas a tiempos tardíos (figura 14 D,E,F), no siendo así en células A549 infectadas con sobrenadantes obtenidos de células Bewo falsamente infectadas (Figura 14 A,BC), por lo cual con este ensayo se puede determinar que la infección de las células Bewo con VSR generan partículas virales infectivas.

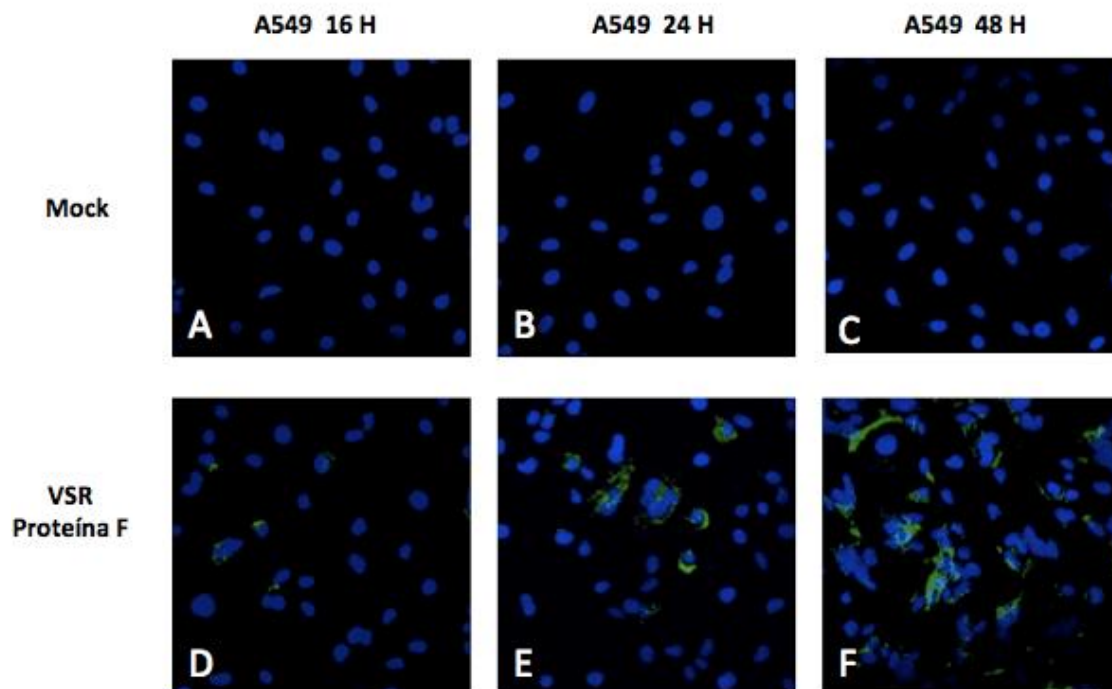


Figura 14. Partículas virales infecciosas. Como se muestra en A,B y C el Mock no mostro señal al anticuerpo anti-F en las células A549. Mientras que en la cinética la infección fue positiva y sigue con el mismo patrón de incremento de la señal viral transcurrido el tiempo de infección D, E y F.

7. DISCUSIÓN.

Las infecciones respiratorias tienen una etiología por diversos patógenos, dentro de los cuales el VSR juega un papel preponderante, al causar un gran número de hospitalizaciones en menores de 5 años a nivel mundial, considerando a esta infección un problema de salud pública. Nuestro país no queda exento de ello ya que es la causa principal ingreso clínico por enfermedades respiratorias en neonatos. (3,9,12,13).

Hasta el momento no se cuenta con estudios que hablen sobre una posible infección vertical por VSR, debido que el 80% de la población de neonatos a sufrido de dicha infección, ya que el virus está en circulación, mostrando síntomas comunes de tos o resfriado que no llevan más que unos días de observación clínica; en los casos graves neumonías o bronquitis y en casos crónicos el desarrollo de asma. Sin embargo el origen de estas afecciones respiratorias tienen como principal causa una transmisión horizontal del VSR. Adicionalmente se tiene registrado que en mujeres embarazadas las cuales tuvieron la infección de VSR durante el periodo de gestación, al nacer los hijos no mostraron algún síntoma común por el VSR, cabe resaltar que este estudio se llevó un registro posterior de los niños donde se podría presentar algún síntoma crónico como el asma (17). El grupo de Piedimonte en el 2013 desafió esta idea, mostrando una hipótesis sobre la infección vertical por el VSR, y con ello definir si este virus tiene una nueva vía de infección, como lo visto en *flavivirus*, *herpesvirus*, *retrovirus* u *ortomixovirus* (6). Este grupo de investigación logró demostrar que en un modelo animal, existe una infección *in útero*, dañando las vías respiratorias de los fetos demostrando efectos pre y posnatales. Esta nueva idea sobre el VSR abre un panorama, sobre si este virus puede transmitirse de manera vertical en humanos y los posibles efectos en el desarrollo embrionario de las vías respiratorias.

El presente estudio es un acercamiento a la hipótesis mencionada anteriormente, al extrapolar que en una línea celular humana placentaria, que en este caso fue de coriocarcinoma humano (Bewo), la cual tiene características morfológicas y bioquímicas de los trofoblastos, ya que estas células son la primera vía de contacto de madre e hijo, al transportar nutrientes, gases, hormonas y factores de crecimiento

(87). Sin embargo, también pueden ser la conexión para el acceso de patógenos como los virus(6). Por lo cual con este modelo nosotros podremos indicar que el VSR puede replicar en este componente de la interfase materno-fetal y posteriormente acceder a la circulación fetal como lo visto por Citomegalovirus, Zika , Hepatitis B y C (90-96).

Como se tiene reportado en diversos trabajos la proteína F esta asociada a la fusión de partícula viral del VSR a una célula blanco (71), con ello se infectaron células Bewo a 24 horas, con un control positivo (Hep-2 VSR) y negativo (Bewo-Mock); donde se observó la señal por medio de una inmunofluorescencia de la proteína F, la infección de las células Bewo muestra un patrón similar al control positivo, este patrón de agregados citoplasmáticos es muy similar a lo ya reportado (99-100). Lo anterior nos sugiere que la expresión de la proteína F se esta presentando en el citoplasma de la células Bewo y esto a su vez indicaría que el VSR esta ingresando a la célula. Cabe resaltar que estos cuerpos citoplasmáticos están asociados a los cuerpos de inclusión donde se lleva acabo la replicación y ensamble del virus, lo que también sugiere que en las células Bewo se estén reclutando estos cuerpos para una posible replicación viral. Para respaldar la posible entrada del VSR se extrajo proteína total de células Bewo infectadas con VSR, donde se analizó la expresión de 2 proteínas estructurales del VSR, que fue la proteína F con las funciones ya mencionadas y la proteína M2-1 que juega un papel en eventos tempranos de la transcripción del genoma del VSR (57-58). Ambos ensayos de western blot muestran la presencia de las bandas que corresponden a la expresión de las proteínas virales esperadas, con lo que en primera instancia respalda que la proteína F del VSR se encuentra dentro de las células Bewo , y con ello sugerir la posible entrada de la partícula viral y consecuentemente que la proteína M2-1 se está expresando y con ello nos indicaría que la maquinaria viral está actuando ya que empezaría la transcripción del material genético del VSR.

Posteriormente una vez que los virus acceden a la célula e internalizan su genoma viral, procesos de transcripción, traducción y replicación del genoma viral pueden ocurrir. Para confirmar que la maquinaria viral está actuando dentro de las células Bewo, se determinó el incremento de una proteína viral en una cinética de infección, evaluando la proteína M2-1 del virus, observando un efecto acumulatorio conforme el

tiempo de infección avanzó, este patrón de incremento es muy similar con diversos reportes en un modelo de células Hep-2 infectadas con VSR (54), por lo tanto al aumentar la expresión de la proteína viral M2-1, los ARN mensajeros del virus están traduciendo por la maquinaria celular (68). Por lo tanto la proteína M2-1 viral y el complejo polimerasa en las células Bewo, están teniendo una función activa y es probable que factores celulares asociados a estos procesos están presentes en la línea celular Bewo, tal es el caso de la presencia de balsas lipídicas, las cuales son reclutadas por la maquinaria viral para llevar a cabo los procesos de replicación (101). Diversos trabajos han demostrado la presencia de estos microdominios lipídicos en la línea celular BeWo y como son reclutados en la infección con el virus Coxsackie (102) .

Eventualmente un punto clave es determinar la permisividad que tienen las células Bewo a la infección por VSR, para ello se infectaron a tres diferentes MOI y dos tiempos fueron considerados, evaluando con ello etapas tempranas y tardías del ciclo de infección del VSR. Los resultados de este ensayo nos sugieren que la línea Bewo tiene cierta permisividad a la infección, al identificarse como hay un aumento discreto de la presencia de proteína viral F a lo largo de la cinética y con diferentes multiplicidades, lo cual coincide con el control positivo (70, 76, 78). Si bien, la permisividad es mayor en la línea Hep2 que en nuestro modelo, la evidencia en la literatura ha reportado que en la línea celular Bewo se expresan algunos de los receptores que el VSR utiliza para acceder a la célula, como son TLR4 y Heparan Sulfato, quizás esta línea celular no exprese alguno de los factores que son necesarios para observar la misma permisividad que en el modelo Hep-2. Adicionalmente, se debe considerar que este ensayo tiene un enfoque cualitativo, por lo cual en futuros ensayos se utilizará citometría de flujo para definir la permisividad de las células Bewo infectadas con VSR. Sin embargo, podemos decir que esta línea celular tiene el potencial para ser considerada como un modelo *in vitro* de células de trofoblasto y ser utilizado ampliamente para evaluar una infección por VSR y las interacciones que podría llevar con diversos receptores y moléculas de la misma línea celular Bewo. Otro punto a considerar es que a tiempos tardíos de la infección las células Bewo tienen un efecto citopático mayor observándose una menor cantidad de células, esto podría estar asociado a un proceso apoptótico debido a la interacción de las proteínas NS1 y NS2

que tienen una función antiapoptótica en etapas tempranas de la infección. Lo anterior nos sugiere que se expresan estas proteínas no estructurales NS1 y NS2 en etapas tempranas para retrasar la apoptosis y promover la replicación viral.

Para que un ciclo de infección viral se complete, es necesario generar partículas infectivas competentes, lo cual significa que la célula tiene los diferentes componentes para que los nuevos viriones se ensamblen y se liberen al medio extracelular. Los resultados obtenidos muestran que las células Bewo tienen la maquinaria celular adecuada para producir nuevas partículas virales con capacidad infectiva, al identificar infección en las células A549 (98). Nosotros fuimos capaces de observar en esta línea celular el patrón característico de la proteína F, el cual fue similar a los resultados anteriores observándose un aumento del antígeno viral y los agregados citoplasmáticos característicos de una infección tanto de Hep2 y A549; lo que sugiere podrían ser los cuerpos de inclusión. Diversos estudios, han demostrado que estos cuerpos de inclusión están enriquecidos por balsas lipídicas que ayudan al transporte y protección de estos cuerpos y además participan en los procesos de la replicación, morfogénesis viral, y egreso de las partículas virales (72-74,98-100). Ésto lleva a definir que existe una producción de partículas virales provenientes de la línea celular Bewo que posiblemente están asociados a las balsas lipídicas que son microdominios asociados a la salida de partículas virales ya que ellas son expulsadas al ambiente extracelular por medio de la exocitosis (52,76). Ésto lleva a vislumbrar que la línea celular de coriocarcinoma Bewo es otra línea celular permisiva al VSR y el panorama de una infección por VSR no solo se limita al aparato respiratorio, nervioso y médula ósea, ya que podría tener un blanco adicional en la placenta humana y con ello vislumbrar las posibles implicaciones que el virus estará llevando en el desarrollo embrionario.

8. CONCLUSIÓN.

El VSR infecta las células Bewo un modelo de trofoblastos de placenta humana, una vez ingresando a la célula, utiliza la maquinaria celular para llevar a cabo procesos de transcripción y replicación viral, y finalmente producir partículas virales infectivas. Esto abre un nuevo panorama acerca del proceso de infección vertical por el VSR. Por lo cual se estableció que la línea celular Bewo es un buen modelo *in vitro* para estudiar el ciclo infectivo del VSR en humanos.

Perspectivas.

- Encontrar el mecanismo o receptores específicos responsables de la infección por VSR en células Bewo.
- Determinar si existe una infección en un modelo de cultivo primario de trofoblastos.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- 1.- Wright M. & Piedimonte G. (2011). Respiratory syncytial virus prevention and therapy: Past, present, and future. *Pediatr Pulmonol*, 46, 324–347.
- 2.- Partida V. (2006). Proyecciones de la población de México 2005-2050. México: Consejo Nacional de Población.
- 3.- Rodríguez J. P., Nava M., Casasola J., Johnson K. M., Nava A., Pérez V. & Caniza M. A. (2012). The epidemiology and clinical characteristics of respiratory syncytial virus infection in children at a public pediatric referral hospital in Mexico. *International Journal of Infectious Diseases*, 16(7), 508-513.
- 4.- Klein J. O. & Remington J. S. (2002). Current concepts of infections on the fetus and newborn infants. En: Remington JS, Klein JO, eds. *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*. Philadelphia: WB Saunders, 1-22.
- 5.- Piedimonte G., Walton C. & Samsell L. (2013). Vertical transmission of respiratory syncytial virus modulates pre-and postnatal innervation and reactivity of rat airways. *PloS one*, 8(4).
- 6.- Mims C. A. (1981). Vertical transmission of viruses. *Microbiological Reviews*, 45, 267–286.
- 7.- Pattillo R. A. & Gey G. O. (1968). The establishment of a cell line of human hormone-synthesizing trophoblastic cells in vitro. *Cancer Research*, 28(7), 1231-1236.
- 8.- Ramos A. J., Cantero M. R., Zhang P., Raychowdhury M. K., Green A, MacPhee D. & Cantiello H. F. (2008). Morphological and electrical properties of human trophoblast choriocarcinoma, BeWo cells. *Placenta*, 29(6), 492-502.
- 9.- Quadros C. (2004). Vacunas Prevención de enfermedades protección de la salud. Editorial Organización Panamericana de la Salud. España, 79, 183-184.
- 10.- Feigin R. & Cherry J. (2005). Textbook of pediatric infectious diseases. 5a edición. Philadelphia: WB Saunders, 1,137-270.
- 11.- Piedimonte G. & Perez M. K. (2014). Respiratory Syncytial Virus Infection and Bronchiolitis. *Pediatrics in Review*, 35, 519-530.
- 12.- WHO, World Health Report 2005 Geneva: World Health Organization, 2005 (consultado 2016 agosto 12) disponible en: <http://www.who.int/whr/2005/en/index.html>
- 13.- Wong R., Farfán R., Sánchez J. L., Nava M., Casasola J. & Santos J. I. (2010). Frecuencia de virus respiratorios y características clínicas de niños que acuden a un hospital en México. *Salud Pública en México*, 52, 528-532.

- 14.- Lessler J., Reich N. G., Brookmeyer R., Perl T. M., Nelson K. E. & Cummings D. A. (2009). Incubation periods of acute respiratory viral infections: a systematic review. *Lancet Infectious Diseases*, 9, 291-300.
- 15.- Meert K., Heidemann S., Lieh-Lai M. & Sarnaik A.P. (1989). Clinical characteristics of respiratory syncytial virus infections in healthy versus previously compromised host. *Pediatric Pulmonal*, 7, 167-70.
- 16.- L rida A., Marr n A., Cassanova A., Ros n B., Carratal  J. & Gudiol F. (2000). Respiratory syncytial virus infection in adults patients hospitalized with community-acquired pneumonia. *Enfermedades Infecciosas y Microbiolog a Cl nica*, 4, 177-181.
- 17.- Wheeler S., Dotters S., Heine P., Grotegut C. & Swany G. (2015). Maternal Effects of Respiratory Syncytial Virus Infection during Pregnancy. *Emerging Infectious Diseases*. 21(11), 1951-1955.
- 18.- Hall C. B., Douglas R. G. Geiman J. M. & Messner M. K. (1975). Nosocomial respiratory syncytial virus infections. *New England Journal of Medicine*, 293, 1343-1346.
- 19.- Aherne W., Bird T., Court S. D. M., Gardner P. S. & McQuillin J. (1970). Pathological changes in virus infections of the lower respiratory tract in children. *Journal of Clinical Pathology*, 23, 7-18.
- 20.- Gardner P. S., McQuillin J. & Court S. D. M. (1970). Speculation on pathogenesis in death from respiratory syncytial virus infection, *British Medical Journal*, 1, 327-330.
- 21.- Zhang L., Peeples M. E. , Boucher R. C., Collins P. L. & Pickles R. J. (2002). Respiratory syncytial virus infection of human airway epithelial cells is polarized, specific to ciliated cells, and without obvious cytopathology. *Journal Virology*, 76, 5654-5666.
- 22.- Viegas M. (2011). Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus in pediatric patients in a six-year period. *Acta Bioquim ca Cl nica Latinoamerica*, 45(1), 3-45
23. Hoffman S. J., Laham F. R. & Polack F. P. (2004). Mechanisms of illness during respiratory syncytial virus infection: the lungs, the virus and the immune response. *Microbes and Infection*, 6, 767-72.
- 24.- Nicholas J. A., Rubino K. L., Lively M., Adams E. G. & Collins P. L. (1990). Cytolytic T-lymphocyte responses to respiratory syncytial virus: effector cell phenotype and target proteins. *Journal Virology*, 64(9), 4232-4241.
- 25.- Boelen A., Kwakkel J., Barends M., de Rond L., Dormans J. & Kimman T. (2002). Effect of lack of interleukin-4, interleukin-12, interleukin-18, or the interferon-gamma receptor on virus replication, cytokine response, and lung pathology during respiratory

syncytial virus infection in mice. *Journal of Medical Virology*, 66, 552-560.

26.- Tripp R. A. (2004). Pathogenesis of respiratory syncytial virus infection. *Viral Immunology*, 17, 165-181.

27.- Mills J., Kirk J. E., Wright P. & Chanock R. (1971). Experimental respiratory syncytial virus infection of adults. Possible mechanisms of resistance to infection and illness. *Journal of Immunology*, 107(1), 123-130.

28.- Falsey A., Walsh E., Looney R., Kolassa J., Formica M. A., Criddle M. & Hall W. (1999). Comparison of respiratory syncytial virus humoral immunity and response to infection in young and elderly adults. *Journal of Medical Virology*, 59(2), 221-226.

29.- Walsh E. E. & Falsey A. R. (2004). Age related differences in humoral immune response to respiratory syncytial virus infection in adults. *Journal of Medical Virology*, 73, 295-299.

30.- Gardner E. M. & Murasko D. M. (2002). Age-related changes in Type 1 and Type 2 cytokine production in humans. *Journal Biogerontology*, 3, 271-290.

31.- Openshaw P. J. M. & Tregoning J. S. (2005.) Immune Responses and Disease Enhancement during Respiratory Syncytial Virus Infection . *Clinical Microbiology Reviews*, 18, 541-555.

32.- Maggon, K., & Barik S. (2004) New drugs and treatment for respiratory syncytial virus. *Reviews in Medical Virology*, 14, 149-168.

33.- Huang D. B., Wu J. J. & Tying S. K. (2004). A review of licensed viral vaccines, some of their safety concerns, and the advances in the development of investigational viral vaccines. *Journal of Infection*, 49, 179-209.

34.- Vergara H., Gutiérrez M. & Mohapatra S. (2006). Molecular biology of syncytial respiratory virus and development of prophylactic strategies. *Salud Uninorte*, 22, 135-153.

35.- Collins P. L. & Crowe J. E. (2007). Respiratory Syncytial Virus and Metapneumovirus Title: Fields Virology, 5th Edition. Editors: Knipe, David M.; Howley, Peter M. p. 1601-1646.

36.- García J., García B., Vivo A. & Melero J. A. (1993). Cytoplasmic inclusions of respiratory syncytial virus-infected cells: formation of inclusion bodies in transfected cells that coexpress the nucleoprotein, the phosphoprotein, and the 22K protein. *Journal Virology*, 195, 243-7.

37.- Saravolatz L. D., Empey K. M., Peebles R. S. & Kolls J. K. (2010). Pharmacologic advances in the treatment and prevention of respiratory syncytial virus. *Clinical infectious diseases*, 50(9), 1258-1267.

- 38.- Wu H., Pfarr D. S., Tang Y., An L. L., Patel N. K., Watkins J. D., Huse W. D., Kiener P. A., & Young J. F. (2005). Ultra-potent antibodies against respiratory syncytial virus: Effects of binding kinetics and binding valence on viral neutralization. *Journal of Molecular Biology*, 350,126-144.
- 39.- Collins, P. L., Hill M. G., & Johnson P.R. (1990).The two open reading frames of the 22K mRNA of human respiratory syncytial virus: sequence comparison of antigenic subgroups A and B and expression in vitro. *Journal of General Virology*, 71, 3015-3020.
- 40.- Collins P. L., Fearn R. & Graham B. S. (2013). Respiratory Syncytial Virus: Virology, Reverse Genetics, and Pathogenesis of Diseases. *Microbiology and Immunology*, 372, 3-38
- 41.- Collins P. L., Huang Y. T. & Wertz G. W. (1984). Nucleotide sequence of the gene encoding the fusion (F) glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 81(24), 7683-7687.
- 42.- Calder L. J., Gonzalez L., Garcia B., Wharton S. A., Skehel J. J., Wiley D. C. & Melero J. A. (2002). Electron microscopy of the human respiratory syncytial virus fusion protein and complexes that it forms with monoclonal antibodies. *Virology*, 271, 122-131.
- 43.- Morton C. J., Cameron R., Lawrence L. J., Lin B., Lowe M., Luttkick A., Mason A., McKimm-Breschkin J., Parker M. W., Ryan J., Smout M., Sullivan J., Tucker S. P. & Young P. R.(2003). Structural characterization of respiratory syncytial virus fusion inhibitor escape mutants: homology model of the F protein and a syncytium formation assay. *Virology*, 311, 275-288.
- 44.- Malhotra R., Ward M., Bright H., Priest R., Foster M. R., Hurle M, Blair E. & Bird M. (2003). Isolation and characterisation of potential respiratory syncytial virus receptor(s) on epithelial cells. *Microbes and Infection*, 5, 123-133.
- 45.- Kurt E. A., Popova L., Kwinn L., Haynes L. M., Jones L. P., Tripp R. A., Walsh E. E., Freeman M. W., Golenbock D. T., Anderson L. J. & Finberg R. W. (2000). Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nature Immunology*, 5, 398-401.
- 46.- Behera, A. K., Matsuse H., Kumar M., Kong X., Lockey R. F. & Mohapatra S. S. (2001). Blocking intercellular adhesion molecule-1 on human epithelial cells decreases respiratory syncytial virus infection. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 280, 188-195.
- 47.- Gonzalez L., Ruiz M. B., Garcia B., Calder L., Lopez J. A., Albar J. P., Skehel J. J., Wiley D. C. & Melero J. A. (2001). Cleavage of the human respiratory syncytial virus fusion protein at two distinct sites is required for activation of membrane fusion. *Proceedings of the Nacional Academy of Sciencies*, 98, 9859-9864.

48.- Sugrue R. J., Brown C., Brown G., Aitken J. & Mc L. R. H. W. (2001). Furin cleavage of the respiratory syncytial virus fusion protein is not a requirement for its transport to the surface of virus-infected cells. *Journal of General Virology*, 82, 1375-1386.

49.- Schlender J., Zimmer G., Herrler G. & Conzelmann K. K.. (2003). Respiratory syncytial virus (RSV) fusion protein subunit F2, not attachment protein G, determines the specificity of RSV infection. *Journal Virology*, 77, 4609-4616.

50.- Bourgeois C., Bour J. B., Lidholt K., Gauthray C. & Pothier P. (1998). Heparin-like structures on respiratory syncytial virus are involved in its infectivity in vitro. *Journal Virology*, 72, 7221_7227.

51.- Tripp R. A., Dakhama A., Jones L. P., Barskey A., Gelfand E. W. & Anderson L. J. (2003). The G glycoprotein of respiratory syncytial virus depresses respiratory rates through the CX3C motif and substance P. *Journal Virology*, 77, 65806584.

52.- Tripp R. A., Jones L. P., Haynes L. M., Zheng H., Murphy P. M. & Anderson L. J. (2001). CX3C chemokine mimicry by respiratory syncytial virus G glycoprotein. *Nature Immunology*, 2, 732-738

53.- Heldricks D.A., McIntosh K., & Patterson J.L. (1988). Further characterization of the soluble form of the G glycoprotein of respiratory syncytial virus. *Journal Virology*, 62, 2228-2233.

54.- Ghildyal R., Mills J., Murray M., Vardaxis N. & Meanger J. (2002). Respiratory syncytial virus matrix protein associates with nucleocapsids in infected cell. *Journal of General Virology*, 83(4), 753-757.

55.- Huang Y.T., Collins P.L. & Wertz G.W., (1985). Characterization of the ten proteins of human respiratory syncytial virus: identification of a fourth envelope-associated protein. *Virus Research*, 2, 157-173.

56.- Castagne N., Barbier A., Bernard J., Rezaei H., Huet J. C., Henry C., Da Costa B. and Eleouet J. F. (2004). Biochemical characterization of the respiratory syncytial virus P-P and P-N protein complexes and localization of the P protein oligomerization domain. *Journal of General Virology*, 85, 1643-1653.

57.- Dupuy, L. C., Dobson S., Bitko V., and Barik S. (1999).Casein kinase 2-mediated phosphorylation of respiratory syncytial virus phosphoprotein P is essential for the transcription elongation activity of the viral polymerase; phosphorylation by casein kinase 1 occurs mainly at Ser(215) and is without effect. *Journal Virology*, 73(10), 8384-8392.

58.- Fearn R. & Collins P. L. (1999).Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. *Journal Virology*, 73(7), 5852-5864.

- 59.- Mason S. W., Aberg E., Lawetz C., DeLong R., Whitehead P. & Liuzzi M. (2003). Interaction between human respiratory syncytial virus (RSV) M2-1 and P proteins is required for reconstitution of M2-1-dependent RSV minigenome activity. *Journal Virology*, 77, 10670-10676.
- 60.- Jin H., Cheng X., Helen Z. Y., Zhou H., Shengqiang L. & Seddiqui A. (2000). Respiratory syncytial virus that lacs open reading frame 2 of the M2 Gene (M2-2) has altered growth characteristics and is attenuated in rodents, *Journal Virology*, 74(1), 74-82.
- 61.- Cheng X., Park H., Zhou H. & Jin H. (2005). Overexpression of the M2-2 protein of Respiratory Syncytial Virus inhibits viral replication. *Journal of Virology*, 79(22) , 13943-13952.
- 62.- Atreya P. L., Peeples M. E. & Collins P.L. (1998). The NS1 protein of human respiratory syncytial virus is a potent inhibitor of minigenome transcription and RNA replication. *Journal Virology*, 72(2),1452–1461.
- 63.- Bitko V., Shulyayeva O., Mazumder B., Musiyenko A., Ramaswamy M., Look D.C. & Barik S. (2007). Nonstructural proteins of respiratory syncytial virus suppress premature apoptosis by an NF-kappaB-dependent, interferon-independent mechanism and facilitate virus growth. *Journal Virology*, 81, 1786–1795.
- 64.- Vergara H., Gutiérrez M. & Mohapatra S. (2006). Biología molecular del virus sincitial respiratorio y desarrollo de estrategias profilácticas. *Salud Uninorte*, 22, 135-53.
- 65.- Escribano E., Rawling J., Garcia B. B. & Melero J. A. (2004). The soluble form of human respiratory syncytial virus attachment protein differs from membrane bound form in its oligomeric state but is still capable of binding to cell surface proteoglycans *Journal Virology*, 78 (7), 3524 -3532.
- 66.. Fields B.N., Knipe D.M. & Howley P.M. (2007). *Fields Virology*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkin.
- 67.- Feldman S. A., Audet S. & Beeler J. A. (2000). The fusión glycoprotein of human respiratory syncytial virus facilitates virus attachment and infectivity via an interaction with cellular heparan sulfate. *Journal Virology*, 74(14), 6442 -6447.
- 68.- Cseke G., Maginnis M. S., Cox R. G. & Tollefson S. J. (2009). Integrin alphavbeta1 promotes infection by human metapneumovirus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(5), 1566-1571.

- 69.- Swapnil S. B., Pooja M. T., Shreekumar P., Vida D. & Shree R. S. (2013). Recent advances in diagnosis , prevetion, and treatmen of human respiratory syncytial virus. *Advances in Virology*. Vol. 2013, Article ID 595768.
- 70.- Lamarre P., Bordeleau E., Rancourt S., Fazal J. & Simoneau B. (2005). Inhibitors of respiratory syncytial virus replication target cotranscription mRNAg guanylation by viral RNA-dependent RNA polymerase. *Journal Virology*, 79(20), 13105-13115.
- 71.- Fearn R., Peebles M. E. & Collins P. L. (2002). Mapping the transcription and replication promoters of respiratory syncytial virus. *Journal Virology* , 76, 1663–1672.
- 72.- Mitra R., Baviskar P., Duncan-Decocq R. R., Patel D & Oomens A.G. (2012). The human respiratory syncytial virus matrix protein is required for maturation of viral filaments, *Journal Virology*. 86, 4432–4443.
- 73.- Baviskar P. S., Hotard A. L., Moore M. L. & Oomens A. G. (2013). The Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein Targets to the Perimeter of Inclusion Bodies and Facilitates Filament Formation by a Cytoplasmic Tail-Dependent Mechanism. *Journal Virology*, 87, 10730-10741.
- 74.- Collins P. L. & Melero J. A. (2011). Progress in undersatnading anda controlling respiratory syncytial virus: still crazy after all these years. *Virus Research*. 326(5957), 80-99.
- 75.- Brown G., Aitken J., Rixon H. W. & Sugrue R. J. (2002). Caveolin-1 is incorporated into mature respiratory syncytial virus particles during virus assembly on the surface of virus-infected cells. *Journal of General Virology*, 83, 611-621.
- 76.- Rixon H. W., Brown G., Aitken J., McDonald T., Graham S. & Sugrue. R. J. (2004). The small hydrophobic (SH) protein accumulates within lipid-raft structures of the Golgi complex during respiratory syncytial virus infection. *Journal of General Virology*, 85,1153- 1165.
- 77.- Swedan S., Andrews J., Majumdar T., Musiyenko A. & Barik S.(2011). Multiple functional domains and complexes of the two nonstructural proteins of human respiratory syncytial virus contribute to interferon suppression and cellular location. *Journal of Virology*, 85(19), 10090–10100.
- 78.- Hastie M. L., Headlam M. J. & Patel N. B. (2012). The human respiratory syncytial virus nonstructural protein 1 regulates type I and type II interferon pathways. *Molecular & Cellular Proteomics*, 11, 108–127.
- 79.- Boyapalle S., Wong T. & Garay J. (2012). Respiratory syncytial virus NS1 protein colocalizes with mitochondrial antiviral signaling protein MAVS following infection. *PLoS ONE*, 7(2).

- 80.-Ling Z., Tran K. C. & Teng M. N. (2009). Human respiratory syncytial virus nonstructural protein NS2 antagonizes the activation of beta interferon transcription by interacting with RIG-I. *Journal of Virology*, 83(8), 3734–3742.
- 81.- Ramaswamy M., Shi L., Varga S. M., Barik S., Behlke M. A. & Look D. C. (2006). Respiratory syncytial virus nonstructural protein 2 specifically inhibits type I interferon signal transduction. *Virology*, 344, 328–339.
- 82.- Zheng J., Yang P., Tang Y., Pan Z. & Zhao Dongchi Z. (2015). Respiratory syncytial virus nonstructural proteins upregulate SOCS1 and SOCS3 in the different manner from endogenous IFN signaling. *Journal of Immunology Reserarch*. ID 738547, 11 pages.
- 83.- Vázquez L., Garcia F., Devoto S. & Galarza P. (2010). Infecciones de Transmisión Vertical “de madre a hijo”. Dirección Nacional de Maternidad e Infancia.
- 84.- Linstow M. L., Eugen O. J., Koch A., Winther T. N., Westh H. & Hogh B. (2006). Excretion patterns of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus among Young children. *European journal of medical research*, 11, 329-335.
- 85.- Piedimonte G. & Perez M. K. (2014). Alternative mechanisms for respiratory syncytial virus (RSV) infection and persistence: could RSV be transmitted through the placenta and persist into developing fetal lungs?. *Current opinion in pharmacology*, 16, 82-88.
- 86.- Bischof, P. & Irminger I. (2005). The human cytotrophoblastic cell, a mononuclear chameleon. *Internacional Journal Biochemistry & Cell Biology*, 37, 1-16.
- 87.- Carlson B. M. (2005). Embriología Humana y Biología del Desarrollo. 3º ed. España., Madrid. 527.
- 88.- Goldman D. & Yagel S. (2002). Regulation of trophoblast invasion: from normal implantation to preeclampsia. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 187(2), 233-238.
- 89.- Genbacev O. & Miller R. K. (2000). Post-implantation differentiation and proliferation of cytotrophoblast cells: in vitro models--a review. *Placenta*, 21 Suppl A: S45-49
- 90.- Fisher S., Genbacev O., Maidji., & Pereira L. (2000). Human cytomegalovirus infection of placental cytotrophoblasts in vitro and in utero: implicantions for transmission and pathogenesis. *Journal Virology*, 74, 6808-6820.
- 91.- Chye J., Lim C., Ng K., Lim J., George R. & Lam S. (1997). Vertical transmission of dengue. *Clinical Infectious Diseases*, 25(6),1374-1377.
- 92.- Tan X. & Phillips D. M. (2009). HIV-1 infection of the trophoblast cell line BeWo: study of virus uptake. *Research and Human Retroviruse*, 8, 1683-1691.

- 93.- Anderson D. A. & Bhat P. (2007). Hepatitis B virus translocates across a trophoblastic barrier. *Journal Virology*, 81, 7200-7207.
- 94.- Nie Q., Gao L., Cheng Y., Huang X., Zhang Y., Luo X., Wang J. & Wang Y. (2012). Hepatitis C virus infection human cytotrophoblasts cultured in vitro. *Journal of Medical Virology*. 84, 1586-1592.
- 95.- Nunes P., Paes M., Basilio C., Gomes A., Bispos A., Rocha M., Barcelos A., Amorim J., Oliviera J. & Chagas F. (2016). Detection of Dengue NS1 and NS3 Proteins in Placenta and Umbilical Cord in Fetal and Maternal Death. *Journal of Medical Virology*, DOI 10.1002/jmv
- 96.- Quicke K. M., Bowen J. R., Johnson E. L., McDonald C. E., Ma H., O'Neal J. T., Rajakumar A., Wrammert J., Rimawi B. H., Pulendran B., Raymond F., Chakraborty S. R. & Suthar M. S. (2016). Zika virus infects human placental macrophages. *Cell Host & Microbe*, 20, 1-8
- 97.- Jasso L. (2011). Congenital infections of low frequency in newborns: some relevant aspects. *Biología Médica Hospital Infantil de México*, 68, 7-20.
- 98.- Huong N., Iyer L., Huan B. & Sugrue. (2016). Evidence for a biphasic mode of respiratory syncytial virus transmission in permissive HEp2 cell monolayers. *Virology Journal*. 13, 2-17.
- 99.- Krempf C., Murphy B. & Collins P. (2002). Combinant Respiratory Syncytial Virus with the G and F genes Shifted to the Promoter-Proximal Positions. *Journal of Virology*, 76, 11931-11942.
- 100.- Radhakrishnan A., Yeo D., Brown G., Zu M., Ravi L., & Sugrue J. (2010). Protein analysis of purified respiratory syncytial virus particles reveals an important role for heat shock protein 90 in virus particle assembly. *Molecular & Cellular Proteomics*. DOI 10.1074, 1829-1840.
- 101.- McDonal T., Pitt A., Brown., Rixon H. & Sugrue R. (2004). Evidence that the respiratory syncytial virus polymerase complex associates with lipid rafts in virus-infected cells: a proteomic analysis. *Virology*. 330, 147-157.
- 102.- Delorme E., Sadovskiy Y. & Coyne C. (2013). Lipid Raft- and Src Family Kinase-Dependent Entry of Coxsackievirus B into Human Placental Trophoblasts. *Journal of Virology*. 87, 8569-8581.