



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas

Evaluación de la replicación viral en células BeWo infectadas con RSV mediante un ensayo de RT-qPCR

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

QUE COMO UNO DE LOS REQUISITOS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO BACTERIÓLOGO PARASITÓLOGO

P R E S E N T A:

TANIA ALLIN VARGAS PAVÍA

Directores:

Dr. en C. Moisés León Juárez

Dra. en C. Graciela Castro Escarpulli



CDMX. Marzo 2019



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

TITULACIÓN NIVEL LICENCIATURA

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 11 del mes de Marzo del año 2019 el que suscribe Tania Allin Vargas Pavía alumno(a) de la carrera de Químico Bacteriólogo Parasitólogo con número de boleta 2012321288 egresado de la **Escuela Nacional de Ciencias Biológicas**, manifiesta que es coautor intelectual del presente trabajo de Titulación bajo la Asesoría del(la) Dr. en C. Moisés León Juárez y como coasesor el(la) Dra. en C. Graciela Castro Escarpulli, quienes ceden **únicamente los derechos del título y del resumen** del trabajo intitulado Evaluación de la replicación viral en células BeWo infectadas con RSV mediante un ensayo de RT-qPCR

al Instituto Politécnico Nacional para su difusión con fines académicos.

El contenido textual, fotográfico, gráficas y resultados del trabajo se someterán para su publicación y/o patente, por lo que se reserva la información completa de este trabajo exclusivamente para la evaluación y consulta de los miembros del jurado académico del examen de Licenciatura de Tania Allin Vargas Pavía.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso de los autores. Éste puede ser solicitado por escrito al asesor y coasesor de este trabajo dirigiéndose a la ENCB. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Atentamente,

Tania Allin Vargas Pavía

ASESOR
Dr. en C. Moisés León Juárez
COASESOR
Dra. en C. Graciela Castro Escarpulli

“Evaluación de la replicación viral en células BeWo infectadas con RSV mediante un ensayo de RT-qPCR”

El presente trabajo se realizó en la Torre de investigación del Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes”, en el Departamento de Inmunobioquímica bajo la asesoría del Dr. en C. Moisés León Juárez y de la Dra. en C. Graciela Castro Escarpulli, en el Departamento de Microbiología del Laboratorio de Investigación Clínica y Ambiental de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.



Formó parte de los proyectos:

“Susceptibilidad de los trofoblastos de placenta humana a la infección con el virus sincitial respiratorio y el posible papel de AMPK en el ciclo de infección placentario”

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) Clave:CB-2015-01/0000255007

Fondos federales INPer
212250-3210-21007-03-15

Dr. en C. Moisés León Juárez



“Métodos de tipificación y molecular de agentes causantes de infección”

SIP: 20194936

Dra. en C. Graciela Castro Escarpulli

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

En primera instancia quiero a todos aquellos que de alguna forma contribuyeron a que este escrito fuera posible, y que a lo largo del mismo aprendiera como persona y profesional. De forma particular agradezco a mis asesores: Porque me reafirmaron lo increíble que es hacer ciencia, y que aunque puede hacerte llorar muchas veces, los pequeños grandes logros compensan cada mal momento. Dr. Moisés León Juárez, gracias por todo su apoyo, sus conocimientos proporcionados, a la paciencia que me tuvo durante el desarrollo de mi tesis, por la confianza que me brindó; pero sobre todo a su calidad humana. A la Dra. Graciela Castro Escarpulli quién no solo participo durante mi formación como Q.B.P. sino también en este último gran logro que fue mi tesis, por todo su conocimiento aportado, incluso los regaños, porque me enseñaron a trabajar correctamente, y también por apoyarme tanto tiempo hasta lograr este escrito. A mis sinodales la Dra. Alicia Jiménez, el Dr. Miguel Ángel Ibañez y el Dr. Ernesto Alarcón, quienes me han dado siempre buena atención y por haber aceptado a ser mis sinodales.

A todos mis compañeros de laboratorio, porque de no ser por ellos, no habría aprendido todo lo que aprendí, y no habría reído como lo hice, incluso tal vez los regaños no hubieran sido los mismos. Didi, gracias por todo lo que me enseñaste, como persona y profesional. Manu, gracias por todas las risas cuando más se necesitaban y el apoyo incondicional en el laboratorio, Luisito, que te digo, gracias por recordarme siempre que no todo son “papers”...Katia y Adri, aunque casi no conviví con ustedes, agradezco haberlas conocido, a la Dra. Cecy, que siempre con su increíble humor, hacía que olvidaras los problemas y por ayudarme con mis ensayo de tiempo real, al igual que Oscar. Al Dr. Macario, a quién conocí poco durante la tesis, pero sin embargo me enseñó que existe gente aún que ama de verdad la ciencia en sí, no como un negocio, y por prepararme emocionalmente para lo que venía en Cinvestav. A la Dra. Lety Cedillo de CINVESTAV y al Dr. Julio por recibirnos siempre tan cordiales, ayudarnos siempre que se pudiera y darnos ánimos, por hacernos sentir parte de su laboratorio, sin saber que así sería.

“Evaluación de la replicación viral en células BeWo infectadas con RSV mediante un ensayo de RT-qPCR”

Pero sobre todo, quiero agradecer a mi familia: Alfredo, Margarita, Cintia y Cesar. A ellos les dedico esta tesis y todos mis logros, porque de no ser por ellos en verdad, no estaría donde estoy, mejor que nadie ellos saben lo que ha sido lograr este momento, y muchos otros, les agradezco por aguantar mis arranques de enojo, frustración, y mucho más los de felicidad. Por ayudarme a ser la persona que soy, por impulsar todos mis sueños y enseñarme a trabajar duro, ser honesta, valorar las cosas y a las personas; a creer en mí, en esos veces en las que ni yo lo hacía. Gracias por siempre escucharme y estar para mí, por enseñarme día a día con el ejemplo. Sabemos que ha sido difícil, y que hemos tenido muchos tropiezos, pero juntos hemos logrado salir adelante, de nuevo gracias por todo, y más por todo su amor.

De igual manera, quiero agradecer a mis amigos durante la carrera, Frank y Alita, a quienes conocí en momentos distintos, pero a los cuales aprendí a querer, mucho, Franki, gracias por enseñar la nobleza de las personas y hacerme reír con tantas ocurrencias, por ayudarme siempre, y aunque no logramos terminar juntos fuiste y serás un gran amigo, fue increíble ser tu compañera. Alita, gracias por tantas risas y momentos tan increíbles, que pese a que te conocí en las últimas etapas de la carrera te convertiste en mi mejor amiga, gracias por ser una amiga fuera de lo común.

Finalmente quiero agradecer a mi abuelita Hilda, una segunda mamá para mí realmente, gracias por estar conmigo desde chica y enseñarme tantas cosas como persona, escribo esto para que si un día olvidas lo agradecida que estoy contigo y cuanto te quiero, lo puedas leer y lo recuerdes. A mi tía Lulú, por siempre estar para todos los sobrinos, impulsarnos y darnos tanto cariño. A mi otra tía Lulú y mis primos Pepé y Natalia, por enseñarme el valor del esfuerzo, el ímpetu, y del gran corazón de las personas, gracias a ustedes tres, porque cuando más lo necesitamos estuvieron para nosotros sin dudar, gracias por ser mi familia y ayudarme a cumplir una meta más.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE CUADROS.....	x
RESUMEN.....	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Epidemiología de la infección por el Virus Sincitial Respiratorio (RSV)	2
1.2 Virus Sincitial Respiratorio (RSV)	6
1.2.1 Clasificación.....	6
1.2.2 Estructura.....	6
1.2.3 Genoma viral	8
1.2.4 Proteínas Virales.....	9
1.2.5 Ciclo de replicación viral	11
1.2.6 Tropicismo celular.....	15
1.3 Infecciones virales durante el embarazo	15
1.4 Tejido placentario.....	16
1.4.1 Los sincitiotrofoblastos (SCTB´s) como una barrera a la transferencia vertical	19
1.4.2 Defensas de los sincitiotrofoblastos	19
2. ANTECEDENTES	21
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. HIPÓTESIS.....	23
5. OBJETIVOS.....	24
5.1 Objetivo general	24
5.2 Objetivos específicos.....	24
6. MATERIALES Y MÉTODOS	25
6.1 Diagrama general de trabajo	25
6.2 Líneas celulares	26
6.2.1 Propagación celular.....	26
6.3 Producción del <i>stock</i> viral del RSV	27
6.4 Cinética de infección con el RSV	28

“Evaluación de la replicación viral en células BeWo infectadas con RSV mediante un ensayo de RT-qPCR”

6.5 Extracción de RNA.....	29
6.6 Retro transcripción (RT-PCR)	30
6.7 Evaluación de la expresión de genes.....	31
6.7.1 PCR punto final para NS2	31
6.7.2 PCR punto final para β -actina	33
6.7.3 RT-qPCR polimerasa viral (L)	34
7. RESULTADOS	35
7.1 Producción del <i>stock</i> viral de RSV.....	35
7.2 Susceptibilidad de las células BeWo a la infección por RSV.....	36
7.3 Evaluación de eventos de replicación en células BeWo infectadas con el RSV.....	37
7.3.1 Evaluación de genes no estructurales NS2	38
7.3.2 Determinación de la expresión relativa del gen L	39
7.4 Evaluación de genes de inmunidad innata (RIG1 y TLR-3).....	40
8. DISCUSIÓN	42
9. CONCLUSIONES	47
10. PROSPECTIVAS	47
11. BIBLIOGRAFÍA	48
11.1 Referencias bibliográficas en línea.....	54

ABREVIATURAS

RSV	Virus Sincitial respiratorio
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con retro transcriptasa
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con retro-transcriptasa
LRT	Tracto respiratorio inferior
ORF	Marco abierto de lectura
ICAM-1	Molécula de adhesión intracelular
TLR	Receptor tipo Toll
IFN	Interferón
STAT	Transductor de señal y activador de la transcripción
TNF	Factor de necrosis tumoral
GAG'S	Glicosaminoglicanos
CTB	Citotrofoblastos
SCTB's	Sincitiotrofoblastos
IVS	Espacio intervelloso
EVT's	Trofoblastos extra vellosos
RIG	Gen inducible del ácido retinoico
IFN's	Interferones
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
MOI	Multiplicidad de infección
IF	Inmunofluorescencia

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Distribución geográfica de los datos de la secuencia genómica de diferentes virus de RNA.	3
2	Distribución demográfica de las muestras analizadas y la proporción de casos positivos a infección por RSV por grupo de edad.	5
3	Representación esquemática de la estructura del RSV.	7
4	Esquematación de la estructura del genoma viral del RSV.	8
5	Esquema general del ciclo prototipo del Virus Sincitial Respiratorio.	14
6	Estructura y composición celular de la placenta.	18
7	Replicación de RSV transmitido verticalmente en un modelo murino.	21
8	Diagrama general de trabajo.	25
9	Efecto citopático característico de RSV.	35
10	Ensayo de titulación por el método de placas líticas.	36
11	Inmunofluorescencia de la susceptibilidad de las células BeWo al RSV.	39
12	Electroferograma de genes no estructurales del RSV en una cinética de infección de células BeWo.	39
13	Expresión relativa del gen L del RSV en células BeWo.	40
14	Electroferograma de genes de inmunidad innata en una cinética de infección del RSV células BeWo.	41

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadros	Título	Página
1	Medios de cultivo para el mantenimiento de las líneas celulares empleadas en la evaluación de la replicación viral de RSV y establecimiento del <i>stock</i> viral.	27
2	Reactivos y concentraciones de la mezcla de reacción para la transcripción reversa.	31
3	Condiciones de reacción, para la síntesis de cDNA a partir del RNA total de células BeWo.	31
4	Reactivos y concentraciones de la mezcla de reacción para la amplificación del gen no estructural de NS2 de RSV por PCR punto final.	32
5	Condiciones de reacción, para la amplificación del gen no estructural NS2 del RSV.	32
6	Reactivos y concentraciones de la mezcla de reacción para la amplificación del gen de la β -Actina por PCR punto final.	33
7	Condiciones de reacción, para la amplificación del gen de la β -Actina.	33
8	Reactivos y concentraciones de la mezcla de reacción para la amplificación del gen L por RT-qPCR.	34
9	Condiciones de reacción, para la amplificación del gen L por RT-qPCR.	34
10	Valores de concentración, y relaciones de pureza del RNA obtenido de la cinética de infección en células BeWo infectadas con RSV.	38

RESUMEN

El Virus Sincitial Respiratorio (RSV) es uno de los principales agentes causales de infecciones agudas en el tracto respiratorio a nivel mundial. Causando infecciones agudas en el tracto superior en adultos y enfermedad respiratoria aguda baja, incluyendo bronquiolitis y neumonía en los lactantes y niños pequeños. Evidencias sugieren que una infección en la vida temprana causada por este virus, predispone a disfunciones crónicas respiratorias como el asma, posiblemente relacionados con la persistencia del virus en el tracto respiratorio y pulmón, logrando alcanzar sitios extrapulmonares. Tal como se detalla en datos más recientes de modelos animales, se sugiere que la placenta puede ser infectada por RSV proveniente de las vías respiratorias de la madre y así infectar al feto, y establecer una infección persistente. Con base en lo antes mencionado; el presente proyecto tuvo como objetivo establecer la permisividad de una línea celular de coriocarcinoma humano (BeWo) al RSV, empleando ensayos de RT-qPCR. Evaluamos la susceptibilidad de RSV o virus inactivado por calor (Mock) en dos líneas celulares HEp-2 y BeWo mediante la detección de la proteína viral F por inmunofluorescencia, mostrando que las células BeWo son susceptibles al RSV. La permisividad de las células BeWo, fue evaluada a través de genes no estructurales y estructurales (NS2 y L) del RSV en una cinética de 16, 24 y 36 h de mediante RT-PCR punto final y RT-qPCR respectivamente, encontrando que existe replicación viral, con una ligera diferencia en la expresión de NS2 y L a tiempos tardíos de la infección. Por otra parte, con el fin de establecer si la inmunidad juega un papel en la permisividad de la línea celular BeWo, evaluamos por PCR punto final la expresión de RIG-1 y TLR-3 encontrando que parecen tener una expresión diferencial durante la infección con RSV. Por lo tanto, lo anterior nos permite establecer que el modelo celular de placenta humana (BeWo) infectadas con RSV, son permisivas a la infección y ocurren eventos de replicación viral, lo cual nos permite asociar con los estudios realizados entre las infecciones en edades tempranas de la vida con el desarrollo de patologías crónicas (asma), durante la edad infantil. Así mismo que la línea celular BeWo es un buen modelo para el estudio de la transmisión vertical de la infección por RSV.

1. INTRODUCCIÓN

El Virus Sincitial respiratorio (RSV), es un virus envuelto, su genoma es de RNA de una sola cadena de polaridad negativa, clasificado en la familia *Pneumoviridae* (Rima *et al.*, 2017). Contiene 10 genes que codifican 11 proteínas individuales, cada una con funciones distintas en la infección viral y la evasión inmunitaria (Vandini *et al.*, 2015). Es frecuentemente identificado como la causa más importante de enfermedades respiratorias, que usualmente causa síntomas similares al resfriado común, con un periodo máximo de evolución de 15 días para la mayoría de la población; sin embargo, puede ser serio en infantes durante los primeros años de vida, teniendo una importante incidencia en neonatos y niños menores de seis años, afectando principalmente el tracto respiratorio inferior (LRT) causando epiglotitis, laringitis, laringotraqueobronquitis (crup), bronquitis, bronquiolitis y neumonía principalmente (Fernades *et al.*, 2017) siendo así, uno de los principales causantes de hospitalización durante los primeros años de vida en infantes y un patógeno relevante en pacientes inmunodeprimidos (Rossi & Colin, 2014). Globalmente, la tasa estimada de mortalidad por RSV demostró ser nueve veces mayor que para influenza (Tang *et al.*, 2017). La creciente evidencia epidemiológica sugiere que las infecciones por el RSV en la vida temprana predisponen al desarrollo de disfunción respiratoria crónica, posiblemente relacionadas con la persistencia viral o de sus efectos sobre el desarrollo pulmonar (Piedimonte & Perez, 2014).

Por otra parte, el RSV causa un impacto económico significativo en los sistemas de salud pública. Un estudio que evaluó los costos asociados con la infección por RSV en pacientes pediátricos en Canadá, estimó el costo anual en el sistema de atención médica en 18 millones de dólares canadienses (1997). En los Estados Unidos, estos costos son mucho más altos con más de 600 millones de dólares por año en atención médica total, debido a infecciones por RSV en pacientes pediátricos y ancianos (1999 a 2004) (Griffiths *et al.*, 2017).

1.1 Epidemiología de la infección por el Virus Sincitial Respiratorio (RSV)

A nivel mundial, se estima que los agentes virales son los principales patógenos causales de afecciones respiratorias, provocando alrededor del 80% de los casos (Fernandes *et al.*, 2017), de los cuales los siete virus más citados como los principales son: Influenza A y B, Virus de la parainfluenza tipo 1-3, Adenovirus y Virus Sincitial Respiratorio (RSV) (Wong, 2017). Siendo considerado actualmente este último como un problema de salud global emergente, tal como lo describe un estudio realizado en el 2017 por Tang y colaboradores, para virus respiratorios de RNA, sin contar al virus de la influenza, y la iniciativa de la Organización Mundial de la Salud (OMS) frente a la lucha contra virus respiratorios, estima que el RSV es el agente viral que causa una predominante morbilidad y mortalidad respiratoria (Figura 1) (Tang *et al.*, 2017, URL1), con aproximadamente 60% de las infecciones respiratorias agudas en niños menores de 5 años (Piedimonte & Pérez, 2014).

“Evaluación de la replicación viral en células BeWo infectadas con RSV mediante un ensayo de RT-qPCR”

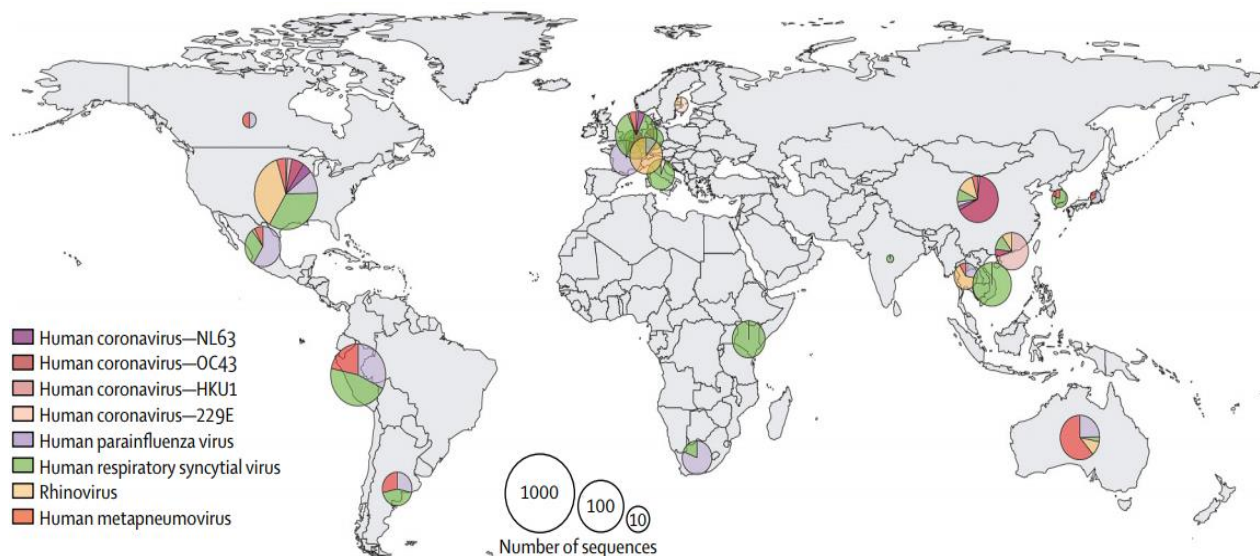


Figura 1. Distribución geográfica de los datos de la secuencia genómica de diferentes virus de RNA. Se esquematiza la distribución geográfica de diferentes virus de RNA, incluyendo al RSV, así como el \log_2 del número total de secuencias de la ciudad o región. Tomado de: Tang *et al.*, 2017.

Estimaciones realizadas en el 2005 indicaban que alrededor de 33.8 millones de nuevos episodios de infección respiratorias por RSV ocurrieron en todo el mundo en niños pequeños de entre 0 y 5 años de edad, de los cuales el 10% requirieron hospitalización. También se estimó que 55,000 a 199,000 muertes infantiles podrían ser atribuidas al RSV, teniendo una mayor mortalidad que las estimadas para el virus de la influenza (Shi *et al.*, 2017, Rodriguez *et al.*, 2012). Para el 2010 las estimaciones globales calculadas de mortalidad en niños menores de 5 años, han oscilado entre 23,400 a 36,400 (5% de todas las infecciones agudas respiratorias inferiores) en 2015 por bronquiolitis y/o neumonía (Shi *et al.*, 2017), siendo responsable de la mayoría de los casos de bronquiolitis y de aproximadamente el 50% de los casos de neumonía durante los primeros años de vida (Gamiño *et al.*, 2016).

En cuanto a las características epidemiológicas de la infección por RSV en México, se han descrito actualmente múltiples estudios, los cuales lo colocan como uno de los principales agentes causales de infecciones respiratorias agudas. Un estudio realizado en diferentes zonas de México (Norte, Centro y Sur) (Figura 2), ha determinado que después de Rinovirus el RSV fue el más frecuente (30.8%); y aproximadamente el 62.5% de todos los casos positivos fueron en niños menores de 9 años (Fernandes *et al.*, 2017); lo cual coincide con los datos reportados en otro estudio realizado en pacientes con infección por el RSV por grupo de edad, detectando con mayor frecuencia, que el grupo más afectado por RSV fueron niños de 0 a 5 años de edad en un 66.84%; tal como lo describe Wong-Chew en el 2017, mientras que 30% ocurrió en adultos y 3.16% en niños y adolescentes de 6 a 17 años de edad (Wong *et al.*, 2017).

De igual manera, se detectó que la mayoría de los casos de RSV (48.2%) se dan en el otoño (21 de septiembre al 20 de diciembre), aunque puede causar infecciones respiratorias agudas en todas las estaciones del año (Rodriguez *et al.*, 2012), consistente con otro estudio realizado entre 2010 y 2014 donde las infecciones causadas por este virus se detectaron durante todo el año, pero tuvieron una distribución estacional notable con gran circulación durante el otoño e invierno (Gamiño *et al.*, 2017).

“Evaluación de la replicación viral en células BeWo infectadas con RSV mediante un ensayo de RT-qPCR”

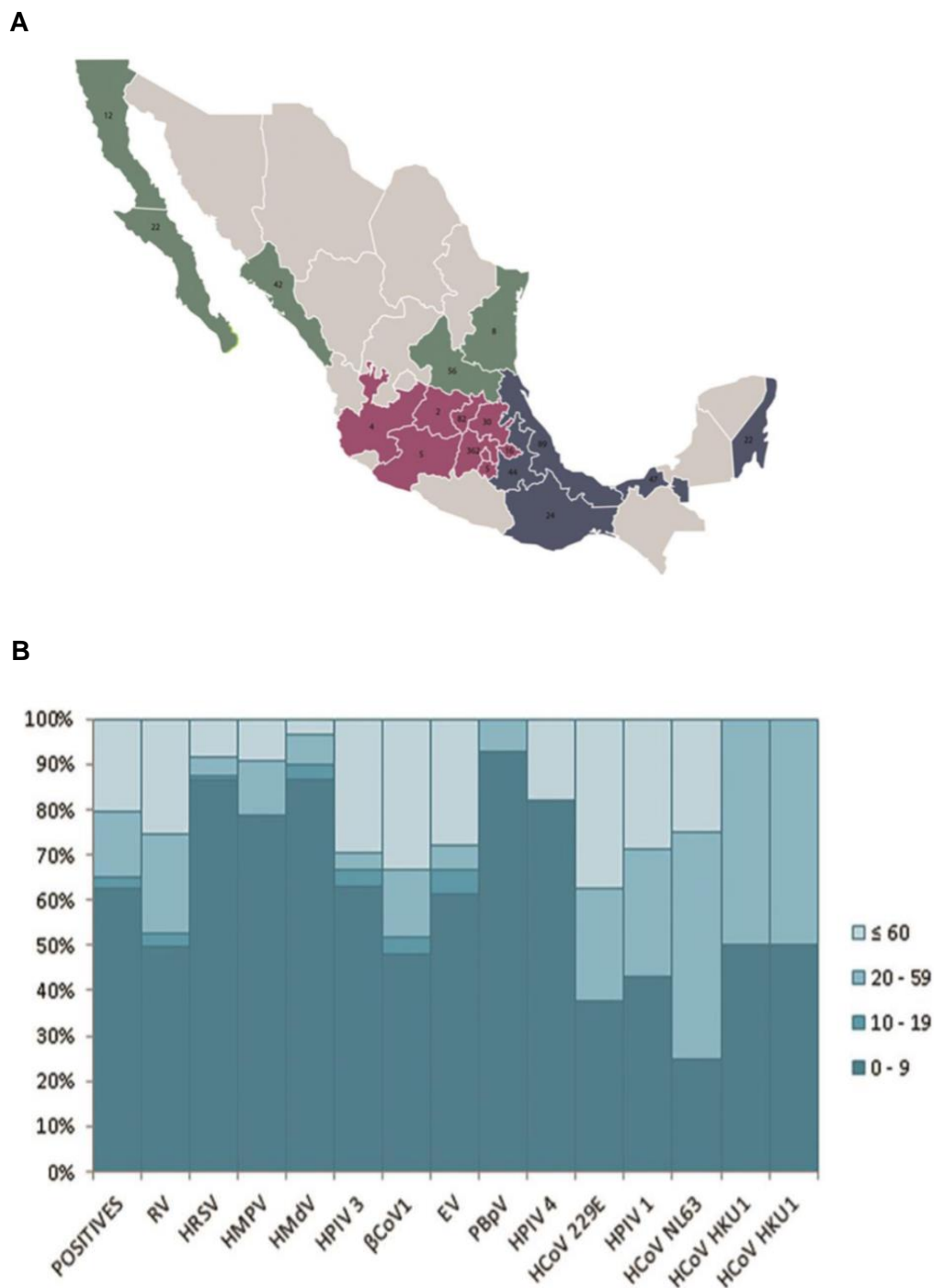


Figura 2. Distribución demográfica de las muestras analizadas y la proporción de casos positivos a infección por RSV por grupo de edad. La figura A) muestra la distribución de las muestras analizadas y se muestran de la siguiente forma: en verde la zona norte, en rojo la zona centro, y en azul la zona sur B) Porcentaje de detección de 13 virus respiratorios no influenza identificados y agrupados por edad. Tomado de: Fernandes *et al.*, 2017

1.2 Virus Sincitial Respiratorio (RSV)

Este virus fue descrito por primera vez como agente causal de rinitis en chimpancés en 1956. Y posteriormente en 1957 fue aislado de niños con enfermedad pulmonar (neumonía y laringitis estridulosa) en Baltimore, USA. En 1967 se le denominó RSV, debido al efecto citopático característico del virus, la formación de células gigantes multinucleadas en cultivo celular, denominadas sincitios (Simoes, 1999).

1.2.1 Clasificación

El RSV con base en la clasificación del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) pertenece al Orden *Mononegavirales*, Familia *Paramyxoviridae*, Subfamilia *Pneumovirinae*, Género *Pneumovirus*, Especie Virus Sincitial Respiratorio Humano. Del cual actualmente están descritos dos grupos antigénicos, A y B con base en la variabilidad de la glicoproteína G (Chu & Englund, 2013; 2 URL).

1.2.2 Estructura

El virión es una partícula esférica, de tamaño entre 120 y 300 nm, que también se puede encontrar predominantemente en forma de un largo filamento, con un diámetro de 60-200 nm y hasta 10 µm de longitud; es un virus envuelto, que contiene tres glicoproteínas transmembranales, la proteína de unión al receptor (glicoproteína G), la proteína de fusión (glicoproteína F) y una proteína pequeña hidrofóbica (la proteína SH), la cual se comportan como una viroporina que muestra actividad de canal iónico,

“Evaluación de la replicación viral en células BeWo infectadas con RSV mediante un ensayo de RT-qPCR”

dependiente del pH (Gan *et al.*, 2012). La organización de estas proteínas genera estructuras en forma de espículas entre 11-20 nm y poco separadas entre sí (6-10 nm) (Figura 3). La nucleocápside es una hélice simétrica en la que está el genoma viral, se encuentra asociado con la nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), un factor anti terminador de la transcripción (M2 o 22K) y la polimerasa (L). El genoma es una molécula de RNA monocatenario de polaridad negativa (ssRNA⁻) con un tamaño aproximado de 15.2 Kb, con 10 genes que codifican para 11 proteínas.

Adicionalmente, el virus codifica para la proteína de la matriz (M) que está involucrada con la morfogénesis del virión, la cual forma una cubierta proteica en la cara interna de la envoltura, dos proteínas no estructurales NS1 y NS2, que participan en la replicación del virus (Ávila & Castellanos, 2013).

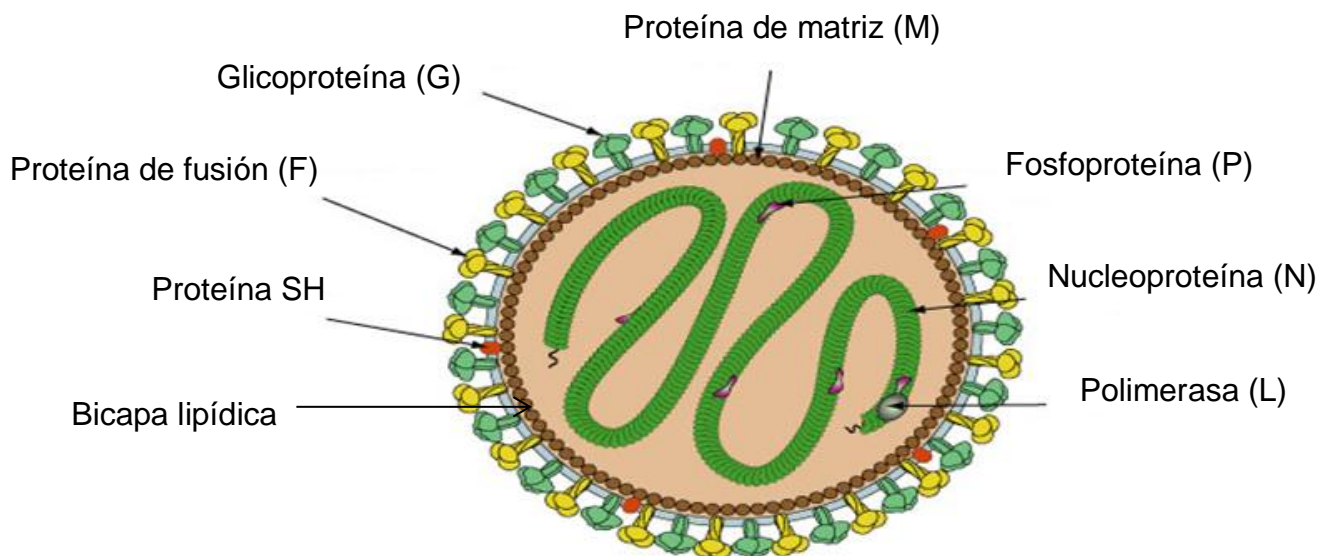


Figura 3: Representación esquemática de la estructura del RSV. El RSV es un virus envuelto, que se encuentra formada por un total de 10 proteínas, incluidas las estructurales y no estructurales, destacando dentro de las estructurales la Proteína de Matriz, (M), Fosfoproteína (P), Nucleoproteína, (N), Glicoproteína (G), Proteína de fusión (F) y la Proteína SH, las cuales juegan un papel en las diversas etapas del ciclo de replicación del virus Modificada de: 3 URL

1.2.3 Genoma viral

El genoma del RSV está constituido por una molécula de RNA monocatenario de polaridad negativa (ssRNA⁻), no segmentado con un tamaño aproximado de 15.2 Kb, que codifica para 10 mRNA independientes (Figura 4). Cada uno de ellos contiene un marco abierto de lectura (ORF), a excepción del gen M2 que contiene 2 marcos de lectura abiertos que codifican para las proteínas M2-1 y M2-2. Los mRNA presentan una modificación 5-metil guanosina (CAP) en el extremo 5' y están poliadenilados en el extremo 3'. Cada gen comienza con una secuencia de 10 nucleótidos (nt) muy conservada, a excepción del gen L, cuya función es controlar el inicio de la transcripción y la adición del CAP y acaba con una secuencia semi conservada de 12 a 13 nt, que dirige la terminación de la transcripción y la poliadenilación del mRNA. En cada extremo del RNA viral (vRNA) se encuentran dos regiones no codificantes, una hacia el extremo 3' de 44 nt, y otra de 159 nt en el extremo 5' (Figura 4) (Ashrafuzzaman, 2017; Cowton *et al.*, 2018; Corzo & Valdés, 2013)

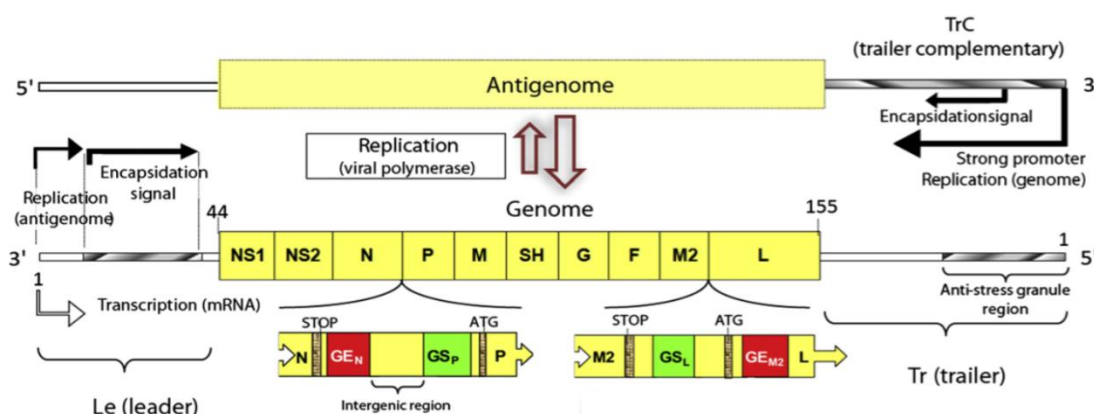


Figura 4: Esquemización de la estructura del genoma viral del RSV. Los genes indicados en la figura son los siguientes: NS1, proteína no estructural 1; NS2, proteína no estructural 2; N, nucleoproteína; P, fosfoproteína; M, proteína de matriz; SH, glicoproteína hidrofóbica pequeña; G, la glicoproteína; F, proteína de fusión; proteína M; L, polimerasa viral. Así mismo se indica las regiones flanqueantes al marco abierto de lectura, que regulan la expresión de las proteínas virales, así como los eventos de transcripción y replicación Tomado de: Cowton *et al.*, 2018

1.2.4 Proteínas Virales

De las 11 proteínas codificadas por el RSV, 9 son estructurales (Glicoproteína; G, Proteína de fusión; F, Fosfoproteína; P, Proteína SH, Proteína de Matriz; M, Nucleoproteína; N, Polimerasa viral; L, Proteína M2-1/2), y 2 no estructurales (NS1 y NS2).

De las cuales la proteína G, es responsable de la unión del virus al receptor celular en las primeras etapas del ciclo de infección (Collins *et al.*, 2013). La proteína F, es una proteína que participa en la entrada viral a la célula blanco al mediar la interacción con receptores específicos como Nucleolina, ICAM-1, Anexina, etc.; y en la fusión entre las células infectadas, provocando la formación de sincitios (Cowton *et al.*, 2006).

La proteína P o Fosfoproteína del RSV, es una proteína altamente fosforilada que interactúa con proteínas virales como N, actuando como chaperona durante la síntesis de RNA viral, para asegurar el ensamble correcto de la nucleocápside y el suministro a la cadena viral creciente del RNA durante la replicación del genoma con L, actuando como cofactor durante la transcripción (Collins *et al.*, 2013, Blondot *et al.*, 2012, Galloux *et al.*, 2015).

La proteína pequeña hidrófoba (SH) del RSV participa junto con las glicoproteínas F y G en la formación de sincitios en las células infectadas, en la modulación de la respuesta inmune del huésped, así como en la liberación de partículas infecciosas de la membrana (Gan *et al.*, 2012). La proteína de Matriz, es un monómero no glicosilado, que puede mediar la interacción electrostática con la membrana plasmática del huésped así como con las demás proteínas virales, durante la morfogénesis de la

“Evaluación de la replicación viral en células BeWo infectadas con RSV mediante un ensayo de RT-qPCR”

partícula viral, y puede ser responsable de una inhibición moderada de la transcripción del hospedero durante el proceso de infección. Incluso es encontrada en inclusiones citoplasmáticas IB's durante la infección tardía (Ghildyal *et al.*, 2008).

Nucleoproteína o Proteína N, es un componente principal de la nucleocápside viral, participa en la encapsidación del RNA genómico, se asocia con las proteínas P-L durante la transcripción y replicación del virión; y se piensa que interactúa con la proteína M durante el ensamblaje del virus (Ghildyal *et al.*, 2008). Presenta una estructura en forma de un anillo decamerico, con una larga horquilla β que se proyecta lejos del núcleo decamerico y que puede servir como un sitio de contacto con la polimerasa viral L. Además, se demostró que el extremo carboxilo (C) y amino (N) pueden servir como el sitio de interacción con la proteína P durante la síntesis de RNA (Tawar *et al.*, 2009). También participa en inhibir la fosforilación del factor de iniciación de la traducción (EIF-2A) y por consiguiente la inhibición de la síntesis de proteínas del hospedero (Collins *et al.*, 2013).

La polimerasa viral (L), es una proteína que sirve como RNA polimerasa dependiente del RNA viral y lleva a cabo la síntesis de RNA junto con las proteínas P y N. También realiza el “capping” de mRNA en el extremo 5' y la poliadenilación en el extremo 3' (Collins *et al.*, 2013). La Proteína M2 (M2-1/ M2-2) es codificada por un mismo gen que presentan 2 marcos de lectura abiertos (ORF) traslapados, dando lugar M2-1 y M2-2 (Cheng *et al.*, 2005). La proteína M2-1 es un homotetrámero antiterminador de la transcripción, y es esencial para la viabilidad del virus. Se ha demostrado que se une a la proteína P y al RNA viral de una manera competitiva, lo que sugiere que la proteína P interactúa con la proteína M2-1 soluble y la entrega al molde de RNA. Adicionalmente,

varios estudios también han demostrado que la transcripción viral termina prematuramente en ausencia de la proteína M2-1, lo que sugiere que la proteína M2-1 sirve como un factor de elongación de la transcripción para el complejo de polimerasa viral (Cheng *et al.*, 2005). La proteína M2-2, es una pequeña proteína de 11 kDa, que puede presentar 2 formas con un tamaño diferente ya que puede contener 88 o 90 aminoácidos, esto dependerá del sitio de inicio de la transcripción del ORF-2, ya que se ha determinado que este proceso tiene una baja regulación. Se ha sugerido que M2-2 juega un papel en la regulación de la síntesis de RNA; específicamente reduce la transcripción y promueve la síntesis del RNA, ya que actúa como un factor transcripcional regulador, que puede mediar un “cambio” en el equilibrio entre la replicación y la transcripción del RNA (Tanner *et al.*, 2013; Cheng *et al.*, 2005).

Finalmente las proteínas NS1 y NS2, se consideran no estructurales porque no se han encontrado en viriones maduros, aunque abundan en células infectadas. Para ambas proteínas han sido reportadas múltiples funciones. Sin embargo principalmente se ha descrito su participación en el bloqueo de los mecanismos de inmunidad innata, implicadas en la disminución de la expresión de interferones (IFNs) tipo I, entre otras (Spann *et al.*, 2005; Esteban, 2014; Valdés-Ramírez, 2013).

1.2.5 Ciclo de replicación viral

El ciclo de replicación del RSV inicia cuando ocurre la entrada del virus (Figura 5) a las células epiteliales del tracto respiratorio por las vías aéreas a través de la interacción con receptores de anclaje (glicosaminoglicanos GAG's) mediado por la proteína G, donde comienza su proceso de internalización empleando dos de los 7 tipos de GAG's,

sulfato de heparán (HS) y sulfato de condroitina B (CS-B o sulfato de dermatán) (Escribano *et al.*, 2004; Mastrangelo & Hegele, 2013).

Por otro lado, existe otro grupo de receptores de alta afinidad que participa activamente en la entrada del virus; los cuales interactúan con la proteína F; encontrándose a las moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1), heparina, Anexina II, receptor tipo toll (TLR) 4, receptor fractalina (CX3CL1) , CX3CR1 y nucleolina (Hallak *et al.*, 2000; Malhotra *et al.*, 2003; Mastrangelo & Hegele, 2013; Rudraraju *et al.*, 2013). Además, se identificó que los micro dominios lipídicos conocidos como balsas lipídicas, participan en el proceso de entrada viral, ya que se demostró que la unión entre la partícula viral y nucleolina es dependiente de estos micro dominios; y el reclutamiento de los mismos sirve como plataforma para la fusión de la membrana para la entrada de la nucleocápside (Chang *et al.*, 2012; Mastrangelo & Hegele, 2013).

Aunque la evidencia experimental indica que el RSV no utiliza de manera eficiente el sistema de endocitosis mediado por clatrininas para penetrar las células, es considerado el modelo más aceptado, ya que no está claro si el RSV puede utilizar otras vías endocíticas como aquellas mediadas por las balsas lipídicas o macropinocitosis (Chang & Dutch, 2012).

Una vez internalizada la nucleocápside se libera en el citoplasma el RNA viral, y se da inicio a los eventos de transcripción del genoma y la replicación. La transcripción inicia cuando el complejo de la polimerasa, fosfoproteína y la proteína L contacta al promotor Tr (Trailer) del genoma, promoviendo la transcripción secuencial de genes con la participación de la proteína M2-1, que ayuda al complejo de la polimerasa a pasar a través de las regiones intergénicas. A medida que la transcripción progresa a lo largo

“Evaluación de la replicación viral en células BeWo infectadas con RSV mediante un ensayo de RT-qPCR”

del genoma, algunos complejos se separan y la expresión de los genes que se encuentran distales se reduce, lo cual resulta en un gradiente de expresión desde los genes proximales a los distales (Collins *et al.*, 2011).

Una vez que los productos proteicos se acumulan, y dentro de estos la proteína M2-2 alcanza una determinada concentración, el complejo de la polimerasa cambia del modo transcripcional al modo de replicación asociándose con la proteína L en la región promotora conocida como Le (leader). En este evento, la copia antígenómica con orientación positiva, sirve como plantilla para generar el genoma del virión (Collins *et al.*, 2011).

La unión de la proteína N al RNA genómico o antígenómico asiste en el ensamblaje de la nucleocápside, la cual se complementa con la incorporación del resto de las proteínas (San *et al.*, 2006). Las células infectadas desarrollan cuerpos de inclusión citoplasmáticos (CI) que se hacen visibles a las 12 horas posteriores a la infección y que se sugiere que son lugares donde se sintetiza el mRNA, incluso se ha demostrado que contienen las proteínas virales N, P, M2-1 y L, así como RNA viral (Collins *et al.*, 2011).

Se ha descrito que los CI secuestran componentes clave de señalización celular y por lo tanto inhiben las respuestas celulares a la infección. Finalmente las nucleocápsides llegan a la membrana plasmática, donde contactan a la proteína M, que se encuentra localizada en la cara citoplasmática de las balsas lipídicas, donde las proteínas F, G y SH también se acumulan, ya que es el sitio donde ocurre el proceso final de ensamblaje y de gemación del RSV; dando origen a la liberación de la progenie viral 10-12 h

“Evaluación de la replicación viral en células BeWo infectadas con RSV mediante un ensayo de RT-qPCR”

después de la infección, con un pico máximo después de 24 h, y continúa hasta que las células se deterioran entre 30-48 h (Lindquist *et al.*, 2010, Lifland *et al.*, 2012,).

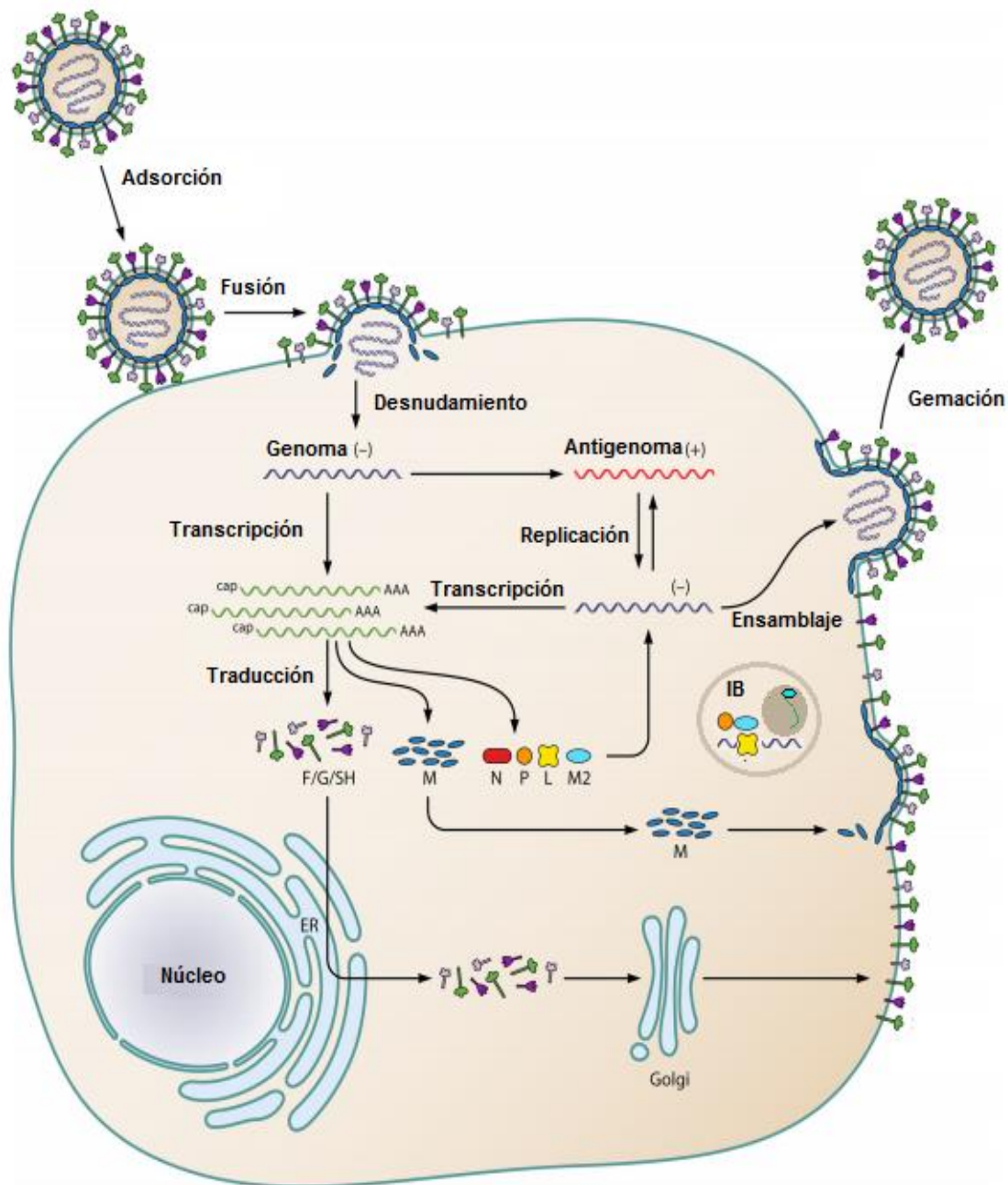


Figura 5: Esquema general del ciclo prototipo del Virus Sincitial Respiratorio. Una vez que la partícula viral ha reconocido a su receptor en la superficie de la célula (Anexina I, Nucleolina, etc.), la partícula viral es internalizada por endocitosis aunque no está completamente demostrado. Sucedió esto la nucleocápside viral se libera en el citoplasma, con la consecuente liberación del genoma del virus. El cual lleva a cabo ciertas rondas de transcripción que permiten la formación de mensajeros para la síntesis de proteínas tanto estructurales, como no estructurales, esenciales tanto para la replicación, como para el ensamblaje de partículas maduras, una vez alcanzados los niveles necesarios de determinadas proteínas (M2-2) se produce un switch, que da inicio a la replicación, la cual originará más moldes de mRNA, así como RNA viral que será empaquetado para la formación de nueva progenie viral y que se liberará por gemación en la membrana celular. Tomado de Mastrangelo & Hegele, 2013.

1.2.6 Tropicismo celular

Al igual que muchos otros virus el RSV infecta una amplia gama de células dentro de su huésped, inclusive recientes estudios han determinado que este es capaz de causar afecciones en el sistema nervioso central principalmente cuando existe un determinado inmunocompromiso (Chu & Englund, 2013; Valdés, 2013). Los grupos celulares más importantes que son blancos del RSV son: Células ciliadas, células epiteliales del traco respiratorio, macrófagos, monocitos, riñón, hígado, miocardio, tejido materno-fetal* (*Datos aún en estudio) (Valdés, 2013).

1.3 Infecciones virales durante el embarazo

Las infecciones virales en el embarazo son las principales causas de morbimortalidad materna y fetal. Durante el embarazo humano, la transmisión vertical de agentes infecciosos de una madre infectada a su feto puede conducir a consecuencias devastadoras en el feto en desarrollo y las manifestaciones clínicas de las infecciones neonatales varían dependiendo del agente viral y la edad gestacional en la exposición.

El riesgo de infección suele ser inversamente relacionado con la edad gestacional en la adquisición, algunos resultando en un síndrome de malformación congénita, afecciones crónicas, inclusive afecciones agudas al nacer, que pudiera causar complicaciones (Marino *et al.*, 2016). Presentándose la transmisión vertical de tres formas; prenatal (antes del nacimiento a través de secreciones vaginales o sangre), perinatal (semanas inmediatamente antes o después el nacimiento), o postnatal (después del nacimiento a través de la leche materna u otras fuentes) (Arora *et al.*, 2017; Marino *et al.*, 2016).

1.4 Tejido placentario

Para comprender los mecanismos de transmisión vertical, es fundamental definir la estructura de la placenta humana, que constituye la principal barrera entre los compartimentos materno y fetal durante el embarazo (Figura 6A). La placenta humana se compone básicamente de células fetales en contacto con células maternas, caracterizada por una estrecha asociación entre los trofoblastos derivados del feto y los tejidos maternos con los que entran en contacto. La interface materno-fetal consiste en células progenitoras trofoblásticas derivadas del feto, que se diferencian en citotrofoblastos (CTB) con capacidad proliferativa, y sincitiotrofoblastos, que son células diferenciadas terminalmente, fusionadas y multinucleadas. En los seres humanos, la placenta comienza a formarse dentro de 7-8 días después de la fertilización, cuando una capa de trofoblastos sincitiados rodea al blastocisto y se comienza a anclar en el endometrio materno (Arora *et al.*, 2017).

A las 10-12 semanas de gestación, la circulación materna se ha remodelado mediante la formación de arterias espirales, y la placenta humana se convierte en hemocorial, lo que indica contacto directo entre la sangre materna y la placenta. Juntos, los trofoblastos forman el vaso placentario y median el intercambio materno-fetal de gases, nutrientes y productos de desecho (Weisblum *et al.*, 2011). A partir de este conjunto de tejidos la placenta origina vellosidades, las flotantes y de anclaje (Figura 6B). Las vellosidades flotantes, están formadas por una capa de CTB's, cubierta por una capa de sincitiotrofoblastos, que son bañados en sangre materna y que fluye hacia el espacio

interveloso (IVS). El IVS puede contener hasta 500 mL de sangre materna, exponiendo las superficies de las vellosidades a los microorganismos que podrían estar presentes en la sangre materna (Arora *et al.*, 2017).

A diferencia de las vellosidades flotantes, las vellosidades de anclaje se unen al tejido decidual materno (denominado decidua basal) por CTB altamente invasivos, llamados trofoblastos extravelosos (EVTs) que forman columnas celulares en los extremos distales de las vellosidades de anclaje (Arora *et al.*, 2017). Los EVT que invaden directamente la decidua basal y el miometrio se denominan EVT intersticiales, mientras que aquellos que invaden la vasculatura materna (arterias espirales) se denominan EVT endovasculares. Tanto en las vellosidades flotantes como en las de anclaje, los sincitiotrofoblastos, que se forman mediante la fusión de los CTB subyacentes, forman la capa celular más externa y componen así la interface clave entre la sangre materna y fetal (Figura 9B). En el caso particular del núcleo de la vellosidad coriónica, consiste en macrófagos fetales (denominados células Hofbauer), fibroblastos placentarios y células endoteliales fetales que recubren los capilares vellosos y sus membranas basales asociadas, que por lo tanto están protegidas por las capas de células trofoblásticas de los microorganismos en la sangre materna (Arora *et al.*, 2017).

Dada su función como la única interface entre los ambientes maternos y fetales, la placenta protege al feto de los patógenos presentes en la sangre materna. Siendo finalmente los sincitiotrofoblastos la barrera más importante contra patógenos, tanto virales, como no virales (Arora *et al.*, 2017).

“Evaluación de la replicación viral en células BeWo infectadas con RSV mediante un ensayo de RT-qPCR”

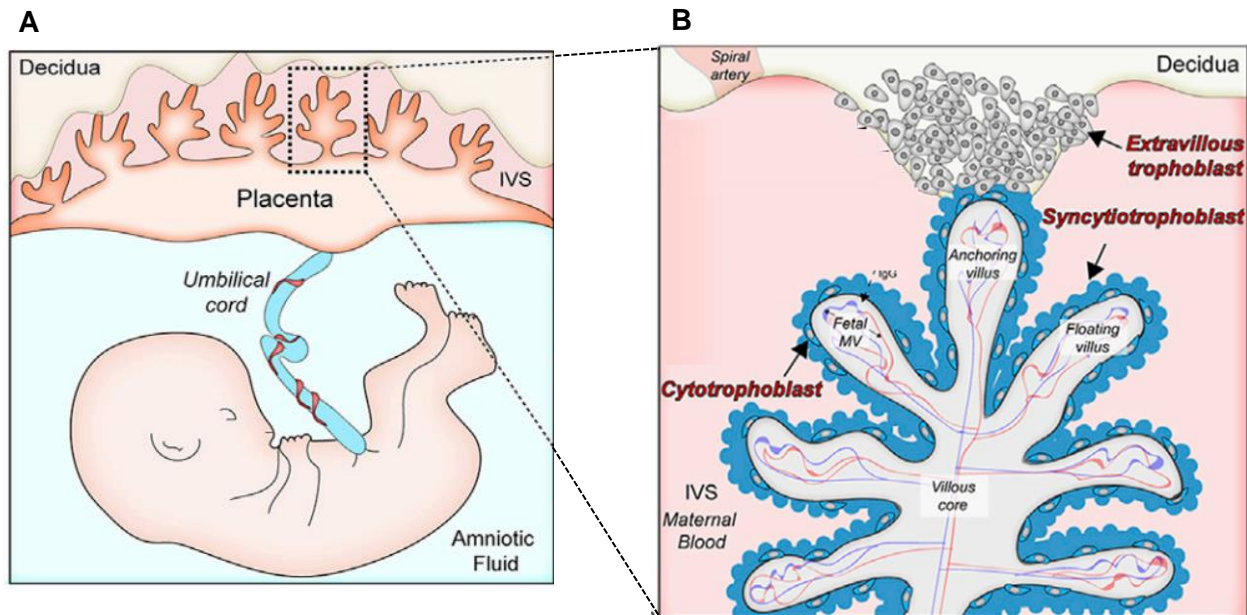


Figura 6. Estructura y composición celular de la placenta. A) La sangre materna llena el espacio interveloso (IVS) a través de arterias espirales que bañan las superficies de la placenta en sangre materna (una vez que se ha establecido la microvasculatura materna). B) La placenta hemocorial humana está formada por vellosidades compuestas de vellosidades flotantes y vellosidades de anclaje, que se unen directamente a la decidua basal mediante la invasión de trofoblastos extravilosos (EVTs). Los vellosidades de la placenta humana están cubiertos por sincitiotrofoblastos, con una capa de citotrofoblastos (que se convierten en discontinuos durante el embarazo) por debajo de esta capa. Tomado de: Arora *et al.*, 2017

Además, los CTB's también poseen mecanismos de defensa innatos contra patógenos intracelulares. Las estrategias utilizadas por los patógenos para evitar estas defensas intrínsecas al trofoblasto son variadas. Los seres humanos tienen una placenta vellosa con una sola capa de sincitiotrofoblastos bañados en sangre materna. Por el contrario, los ratones tienen una placenta laberíntica con dos capas de sincitiotrofoblastos y una capa completa de citotrofoblastos mononucleados, estando la capa de citotrofoblasto en contacto directo con la sangre materna (Arora *et al.*, 2017). Dadas las tres capas de células, la placenta del ratón se conoce como una placenta hemotricorial. Estas diferencias entre el ratón y las estructuras celulares placentarias humanas pueden dificultar los hallazgos realizados utilizando modelos de ratón para estudios de vías de transmisión vertical en el embarazo humano (Arora *et al.*, 2017).

1.4.1 Los sincitiotrofoblastos (SCTB´s) como una barrera a la transferencia vertical

Los sincitiotrofoblastos primarios; confiere una amplia resistencia antiviral a las células no trofoblásticas, a través de efectores que actúan de forma paracrina (Bayer *et al.*, 2016; Delorme *et al.*, 2014). En consecuencia, la capa de sincitiotrofoblastos del primer trimestre (vellosidades coriónicas) es en gran medida resistente a la infección por virus; mientras que los CTB y otras células del núcleo veloso son susceptibles. El epitelio amniótico y los CTB's de las vellosidades coriónicas aisladas de placentas de gestación media y tardía, así como explantes de las vellosidades coriónicas del primer trimestre son susceptibles a la infección, mientras que el sincitio se libera paracrina (Bayer *et al.*, 2016; Delorme *et al.*, 2014).

En estudios de otros virus como ZIKV, los títulos de ZIKV más altos se observan en células epiteliales amnióticas de la mitad de la gestación, en comparación con la placenta de gestación tardía, lo que indica una mayor susceptibilidad a la infección de la placenta temprana. En consonancia con esto, los trofoblastos primitivos, que representan las fases más tempranas del desarrollo, son sensibles a la infección viral, pero se vuelven cada vez más resistentes, lo que sugiere que aquellos que se forman a principios de la gestación son sensibles (Sheridan *et al.*, 2017).

1.4.2 Defensas de los sincitiotrofoblastos

En la mayoría de los casos, el mecanismo base no está claro, en gran medida dada la dificultad del trabajo con trofoblastos en diversas etapas de gestación y modelado de la placenta humana. En los experimentos con sincitiotrofoblastos primarios de placentas

“Evaluación de la replicación viral en células BeWo infectadas con RSV mediante un ensayo de RT-qPCR”

de largo plazo, se descubrió que estas células resisten infecciones virales, y transfieren esta resistencia a las células no placentarias de forma paracrina a través de vías que implican miRNA específicos de la placenta empaquetados en exosomas así como interferones de tipo III (IFN's) (Bayer *et al.*, 2016; Delorme *et al.*, 2014).

La superficie Sincitial tiene propiedades físicas únicas, como la presencia de microvellosidades densas y ramificadas en la superficie apical y una compleja red de actina cortical que podría limitar la invasión microbiana (Arora *et al.*, 2017; Cattle *et al.*, 1987). La placenta humana también expresa altos niveles de otros componentes de defensa antimicrobiana, tales como, las defensinas, los receptores tipo Toll (TLR) y proteínas de dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD). No obstante, no está claro si estos componentes desempeñan papeles activos en la defensa de la placenta humana *in vivo*. Es importante destacar que la expresión de estos componentes difiere entre los trofoblastos humanos primarios y las líneas celulares de trofoblasto, lo que puede limitar aún más la utilidad de estos modelos para el estudio de la transmisión vertical (Arora *et al.*, 2017; Pudney *et al.*, 2016).

En el caso particular de las vellosidades de anclaje, los CTB's se diferencian en EVT invasivos, que son células especializadas que invaden el sitio de implantación uterina. Los EVT's representan una vía posible de infección en la placenta y son usados por varios microorganismos para facilitar la transmisión vertical. Dado que la decidua materna tiene un fenotipo multicelular compuesto de EVT's, epitelio uterino, estroma, células endoteliales, células inmunes, etc. pueden servir como sitio de replicación (Arora *et al.*, 2017).

2. ANTECEDENTES

Piedimonte y colaboradores en el 2013 con sus estudios en un modelo murino han sugerido que el RSV puede cruzar la barrera placentaria e interactuar directamente con los pulmones en desarrollo del feto y establecer una infección persistente en los pulmones de la descendencia de ratas infectadas a mitad de período, así como en los tejidos fetales. Esto se demostró infectando rata gestante intratraquealmente con un virus recombinante que expresa la proteína verde fluorescente, amplificando RNA viral por RT-PCR (nucleoproteína) y confirmado por un análisis de citometría de flujo, que correlacionaban con la sugerida transferencia vertical (Figura 7) (Piedimonte *et al.*, 2013)

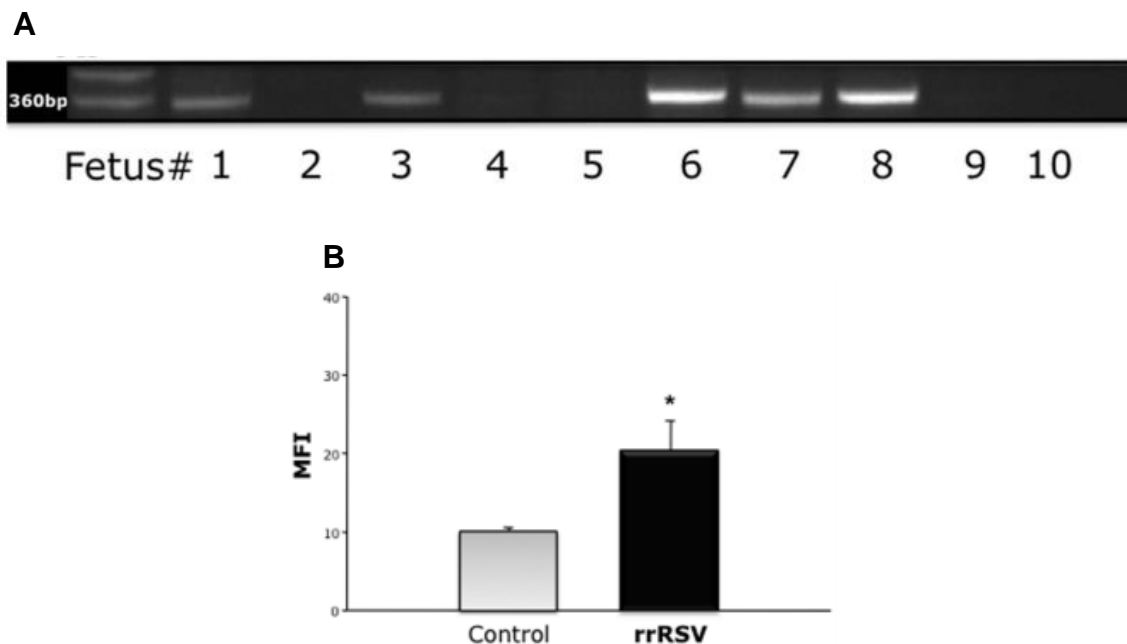


Figura 7. Replicación de RSV transmitido verticalmente en un modelo murino A) Amplificación del gen de la Nucleoproteína viral del RSV en un macerado de pulmón de fetos provenientes de ratas hembras infectadas con RSV. Las bandas en la primera línea del gel corresponden al marcador de peso molecular, cada una de las otras líneas muestra el RNA amplificado de los fetos identificados por número, B) Intensidad media de fluorescencia (MFI) del análisis por citometría de flujo del macerado de los fetos provenientes de ratas gestantes infectadas con rrRSV comparada con el control, que son fetos provenientes de hembras libres de patógenos. Tomado de: Piedimonte *et al.*, 2013

3. JUSTIFICACIÓN

Una serie de observaciones en modelos animales, sugieren que el RSV puede ser transmitido de la madre al feto a través de la placenta, y persistir en los pulmones durante el desarrollo, así como en la edad adulta. Datos más recientes en seres humanos apoyan la noción de que los tejidos extrapulmonares pueden estar siendo infectados por el RSV, promoviendo una infección latente, que se ha asociado con afecciones respiratorias a corto, mediano y largo plazo, como neumonitis, bronquiolitis y una mayor susceptibilidad al desarrollo de enfermedades crónicas como el asma. Por lo cual, el conocimiento de la capacidad del RSV de infectar un modelo celular de placenta de origen humano, permitirá determinar si existe replicación viral y con esto poder contribuir al diseño de estrategias que permitan disminuir la epidemiología de la infección por RSV y principalmente sus consecuencias en la población más susceptible.

4. HIPÓTESIS

Los modelos más recientes, así como datos clínicos, sugieren que la placenta puede ser infectada por RSV, por lo cual al infectar una línea celular de carcinoma humano con RSV será posible detectar eventos de replicación viral, que establecerán la permisividad del modelo de placenta humano al RSV.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Establecer si existen eventos de replicación viral en células BeWo infectadas con RSV.

5.2 Objetivos específicos

1. Generar un *stock* viral en células HEp-2.
2. Determinar la susceptibilidad de células BeWo a la infección por RSV.
3. Estandarizar, mediante la RT-PCR punto final, la amplificación de genes no estructurales NS2.
4. Evaluar mediante una cinética de infección a 5 MOI eventos de replicación viral empleando la técnica de la RT-qPCR.
5. Evaluar la expresión de genes de inmunidad innata (RIG-1 y TLR-3), mediante la RT-PCR punto final.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Diagrama general de trabajo

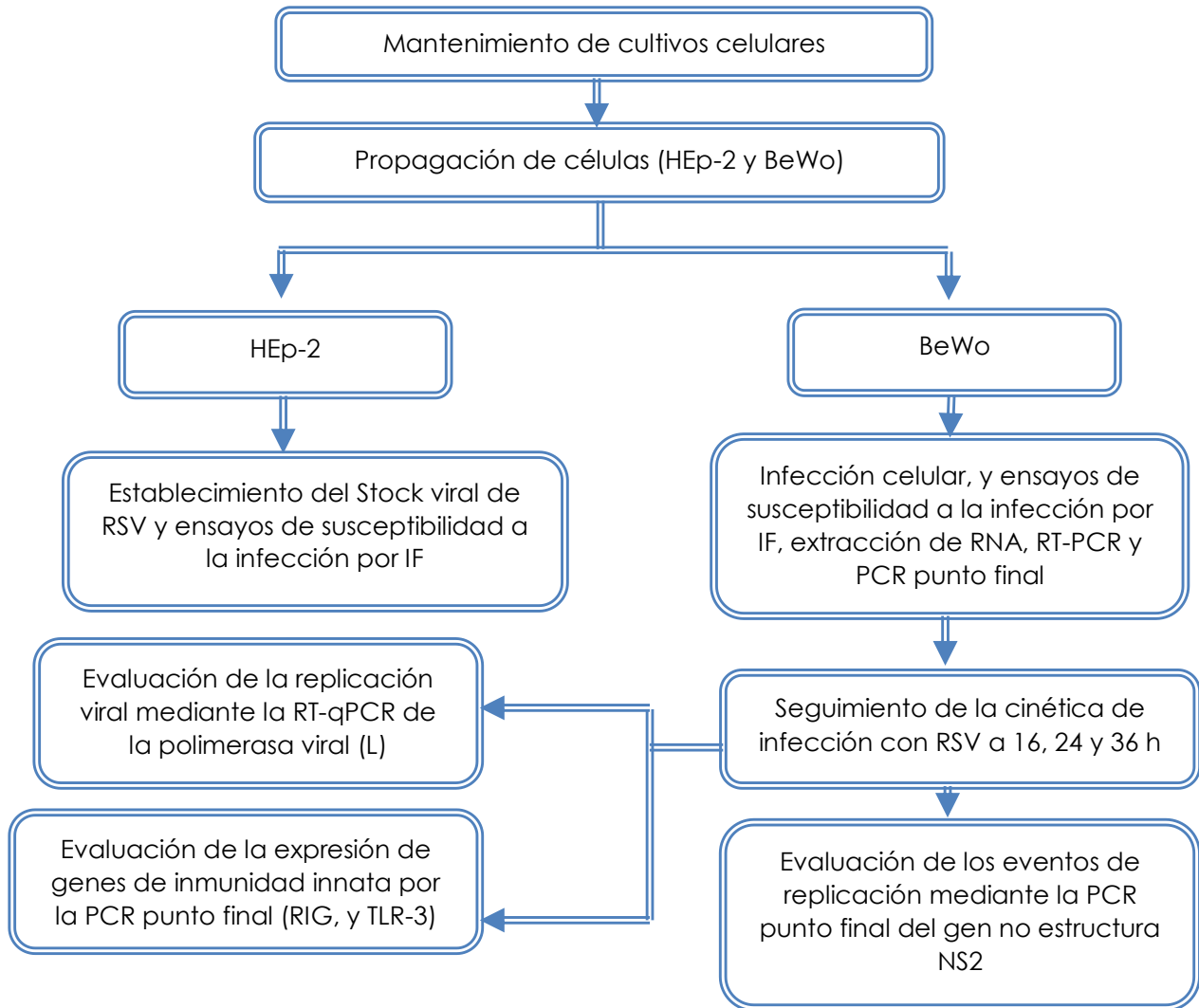


Figura 8. Diagrama general de trabajo. El esquema general de trabajo, consiste en el mantenimiento celular, propagación viral y determinación de la permisividad, empleando ensayo de extracción de RNA, RT-qPCR así como ensayos de PCR punto final.

Para el desarrollo de este proyecto fue necesario mantener el cultivo de células: Epitelioma humano (HEp-2) y Coriocarcinoma humano (BeWo). Para la propagación de los diferentes tipos celulares, se empleó la metodología que se describe a continuación.

6.2 Líneas celulares

6.2.1 Propagación celular

A partir de una botella de cultivo de 25 cm² se removió y eliminó el medio de cultivo. La monocapa de células fue lavada con 1 mL de solución de Tripsina- EDTA 0,25% (m/v), a continuación se retiró el volumen adicionado y se añadió nuevamente 1 mL de solución de Tripsina-EDTA y se incubó durante 3-4 min a 37° C, se observaron las células bajo un microscopio invertido hasta observar el desprendimiento de la monocapa celular; se retiró de la incubación y se le aplicó movimiento para desprender la monocapa. Una vez desprendida, se agregaron 3 mL de medio de cultivo suplementado para las diferentes líneas celulares (Cuadro 1). A continuación, se aspiraron las células por pipeteo suave homogeneizando la suspensión, para posteriormente colocarlas en tubos estériles de 15 mL. Inmediatamente el aspirado se llevó a centrifugar, durante 5 min a 225 × g. El contenido del tubo fue decantado y se resuspendió el botón adicionando 1 mL de medio suplementado, distribuyendo 500 µL en 2 botellas de cultivo. Finalmente se dejaron incubando los cultivos a 37° C, a una atmósfera de 5% CO₂ y 39% humedad relativa (RH). Todos estos pasos fueron lavados con medio base a las 24 h hasta el siguiente paso, con excepción de las células BeWo, a éstas una vez propagadas, se les realizó cambio de medio de cultivo cada tercer día después de propagarlas.

“Evaluación de la replicación viral en células BeWo infectadas con RSV mediante un ensayo de RT-qPCR”

Cuadro 1. Medios de cultivo para el mantenimiento de las líneas celulares empleadas en la evaluación de la replicación viral de RSV y establecimiento del stock viral.

LÍNEA CELULAR	MEDIO BASE	MEDIO SUPLEMENTADO
Células BeWo	Medio de cultivo de Kaigh´s modificado F12K (1x)	Medio F12K (1x), 10% SFB des complementado, 1% de antibiótico antimicótico
Células HEp-2	Medio mínimo esencial de Eagle (DMEM) (1X)	DMEM (1X), 10% SFB, 1% de antibiótico antimicótico

SFB: Suero fetal bovino

6.3 Producción del *stock* viral del RSV

Para el establecimiento del *stock* viral, se emplearon alícuotas de la cepa viral ATCC® RSV-26™, y un cultivo de células HEp-2.

A partir de una botella de cultivo de 125 cm² con una confluencia del 80% de células HEp-2 se le retiró el medio de crecimiento, y se le adicionaron 5 mL de medio DMEM base (1X) para lavar las células y retirar detritos celulares. Posteriormente se adicionaron 1.5 mL del *stock* viral de RSV y se completó con DMEM base a un volumen final de 5 mL para cubrir la monocapa de células y se dejó incubando a 37° C, con movimientos periódicos cada 15 min durante 2 h. Finalizado el período de incubación se retiró la alícuota de infección y se le agregó DMEM base adicionado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB), 1% de antibiótico antimicótico y se incubó a 37° C, con una atmósfera de 5% CO₂, y 39% HR, a las 24 h se re infectaron las células con 500 µL del virus y nuevamente se dejó incubando a las condiciones ya antes mencionadas,

“Evaluación de la replicación viral en células BeWo infectadas con RSV mediante un ensayo de RT-qPCR”

revisando cada 24 h a partir de la reinfección, observando al microscopio invertido la aparición de grandes sincitios (1-2 por cada campo observado), en un promedio de 24 a 72 h. Una vez que fueron observados un alto porcentaje de sincitios, se recuperó una fracción del sobrenadante en tubo de centrifuga de 50 mL y se procedió a raspar la monocapa de células con ayuda de un raspador de células, lavando continuamente las células con el mismo sobrenadante, la suspensión obtenida se recolectó en otro tubo de centrifuga de 50 mL y se colocó en un sonicador BRANSON modelo B1510MT con agua fría para liberar las partículas virales al sobrenadante. Se dieron 3 “*perops*” de sonicación, cada uno en intervalos de 5 segundos y se incubó el tubo en hielo en cada intervalo. Finalmente, los sobrenadantes se centrifugaron a $563 \times g$ durante 7 min a 4° C, una vez que se tuvo el sobrenadante se recuperó y distribuyó 500 μ L en microtubos de 1.5 mL y se almacenaron a -70° C.

6.4 Cinética de infección con el RSV

Para evaluar la replicación viral de RSV en células BeWo, se realizó una cinética de la infección. Desarrollando la metodología que a continuación se describe:

En botellas de cultivo de 25 cm^2 células BeWo fueron distribuidas a una densidad de 1.5×10^6 células, posteriormente fueron infectadas con el RSV a 5 MOI y como control negativo, las células fueron infectadas con un virus inactivo por calor. Finalmente, las células fueron incubadas a 16 h, 24 h y 36 h bajo las condiciones descritas anteriormente. Finalizado el tiempo de incubación las células fueron procesadas para la extracción del RNA total.

6.5 Extracción de RNA

La extracción de RNA, se realizó a partir de cultivos celulares infectados y cultivos control (Mock), empleando el método de extracción de RNA total con Trizol.

A monocapa celular se le adicionaron 1000 μL de Trizol y se homogeneizó pipeteando repetidamente, este homogeneizado se pasó a un microtubo de 1.5 mL incubándolo a temperatura ambiente durante 5 min, transcurrido este tiempo, se agregaron 200 μL de cloroformo para separar restos celulares y proteínas formando dos fases, las cuales fueron homogenizadas dando un “*spin*” en vórtex, posteriormente se incubó 3 min a temperatura ambiente y se centrifugaron a $225 \times g$ durante 5 min a 4°C . De esta etapa, se forma una solución heterogénea, de la cual se recuperó la fase acuosa y se transfirió a otro microtubo, al cual se le adicionaron 500 μL de isopropanol y se dejó incubando 10 min a temperatura ambiente para la precipitación del RNA. Una vez incubado se centrifugó a $225 \times g$ durante 10 min, terminada la centrifugación se decantó el sobrenadante y el botón se lavó con 1000 μL de Etanol al 75% y se centrifugó a $140 \times g$ durante 5 min a 4°C . Finalmente el sobrenadante se decantó y el botón se dejó secando a temperatura ambiente durante 30 min. Una vez seco, se resuspendió en 15 μL de agua con dietilpirocarbonato (DEPC).

Posteriormente, se procedió a evaluar la integridad del RNA mediante una electroforesis en gel de agarosa 1%, teñido con bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) aplicando una corriente de 100 volts en regulador TBE 10X durante 30 min y se visualizó en un Fotodocumentador MultiDoc-It™, el tamaño molecular se comparó con el marcador de talla molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (ThermoFisher Scientific,

“Evaluación de la replicación viral en células BeWo infectadas con RSV mediante un ensayo de RT-qPCR”

Massachusetts, USA). Una vez evaluada la integridad del RNA se realizó tratamiento con DNAsa adicionando 2 μ L de “Buffer” de DNAsa 10x y 2-3 μ L de DNAsa (10 U /mL) incubando 30 min a 37° C y posteriormente a 65° C por 10 min y finalmente se colocó a 4° C.

Una vez obtenido el RNA, se determinó su concentración y pureza, mediante espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro Thermo Scientific™ NanoDrop 2000. La concentración se determinó en el programa NanoDrop 2000/2000c midiendo la absorbancia (A) a 260 nm y comparando con un blanco de agua DEPC, así mismo a través del programa se determinó la pureza, midiendo las relaciones A 260 nm / A 280 nm y A 260 nm / A 230 nm, la primera dado que las proteínas absorben a 280 nm y éstas son consideradas contaminantes y la segunda porque que algunos reactivos empleados en la extracción absorben a 230 nm y pueden inhibir enzimas, siendo una pureza deseada para ambas relaciones entre 1.99-2.0.

6.6 Retro transcripción (RT-PCR)

Se realizó una transcripción reversa, para la síntesis de DNA complementario (cDNA). Usando el *Kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis* (Thermo Fisher, Massachusetts, USA), llevando a cabo la reacción en un termociclador Eppendorf 5331 Mastercycler® Gradient Thermal Cycler.

Para la transcripción inversa del RNA obtenido se siguieron las indicaciones sugeridas por el fabricante, así como las condiciones de reacción (Cuadro 2 y 3).

“Evaluación de la replicación viral en células BeWo infectadas con RSV mediante un ensayo de RT-qPCR”

Cuadro 2. Reactivos y concentraciones de la mezcla de reacción para la transcripción reversa.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (µL)
Agua libre de nucleasas	NA	NA	Variable
“Buffer” de reacción	5X	1X	4
Oligo (dt) Primer	100 µm	5 µm	1
Random Hexamer Primer	100 µM	5 µm	1
RiboLock RNAses Inhibitor	20 U/µL	20 U/µL	1
dNTP’s Mix	10 mM	1 mM	2
RevertAid RT	200 U/µL	200 U/µL	1
RNA	Extracto de RNA µg/µL	5 µg/mL	Variable

Nota: Variable para el agua; Va en función de cuanto RNA se adicione para tener una concentración equivalente a 5 µg/µl, Variable para el RNA; En función de la concentración de RNA inicial

Cuadro 3. Condiciones de reacción, para la síntesis de cDNA a partir del RNA total de células BeWo.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Incubación	25	30	1
Retrotranscripción	42	60	5
Extensión final	70	5	1

6.7 Evaluación de la expresión de genes

6.7.1 PCR punto final para NS2

Se utilizó una PCR punto final para la detección de la replicación viral, mediante la amplificación del gen no estructural NS2 del RSV en un Termociclador Eppendorf 5331 Mastercycler® Gradient Thermal Cycler. Para ello se utilizaron el siguiente par de iniciadores “Forward” NS2 5’CAAGGATCCCATGGACACAACC3’ “Reverse” NS2

“Evaluación de la replicación viral en células BeWo infectadas con RSV mediante un ensayo de RT-qPCR”

3´AGGCTCGAGATCATGGATTGAGA5´ los cuales amplifican la secuencia del gen viral NS2, obteniendo un amplicon de aproximadamente 372 pb. Usando una mezcla de reacción de 10 µL (Cuadro 4).

Cuadro 4. Reactivos y concentraciones de la mezcla de reacción para la amplificación del gen no estructural de NS2 de RSV por PCR punto final.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen µL
Agua	NA	NA	6.2
“Buffer” de reacción para PCR	10X	1X	0.2
FRSVf	20 pmol	0.4 pmol	0.2
FRSVr	20 pmol	0.4 pmol	0.2
dNTP´s Mix	10 mM	0.2 mM	0.2
Taq	200 U/µL	40 U/µl	0.2
cDNA	5 µg/µL	5 µg/µl	2

Las condiciones de reacción que fueron empleadas para la amplificación son las reportadas en el (Cuadro 5).

Cuadro 5. Condiciones de reacción, para la amplificación del gen no estructural NS2 del RSV.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	5	1
Desnaturalización	94	0.5	35
Alineamiento	50.9	0.5	
Extensión	68.0	1.5	
Extensión final	68	7	7

6.7.2 PCR punto final para β -actina

Finalmente, para evaluar la infección, fue necesario realizar PCR punto final de un gen constitutivo celular, en este caso se tomó al gen de la β -actina, para ello se usó el siguiente par de iniciadores 5'GCACCACACCTTCTACAATG3' "Forward" y 3'TGCTTGCTGATCCACATCTG5' "Reverse", diseñados y se preparó una mezcla de reacción de 10 μ L (Cuadro 6).

Cuadro 6. Reactivos y concentraciones de la mezcla de reacción para la amplificación del gen de la β -Actina por PCR punto final.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen μ L
Agua	NA	NA	1
"Buffer" de reacción para PCR	10X	1X	0.3
HF	20 pmoL	0.6 pmoL	0.3
HR	20 pmoL	0.6 pmoL	0.3
dNTP's Mix	10 Mm	0.2 Mm	0.3
Taq	200 U/ μ L	40 U/ μ L	0.3
cDNA	5 μ g/ μ L	5 μ g/ μ L	2

Se esperó un amplicon de aproximadamente 437 pb. En cuanto a las condiciones empleadas para la amplificación de la β -Actina se detallan en el (Cuadro 7).

Cuadro 7. Condiciones de reacción, para la amplificación del gen de la β -Actina.

Etapas	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	2	1
Desnaturalización	94	0.5	25
Alineamiento	45	0.5	
Extensión	72	0.5	
Extensión final	72	2	7

6.7.3 RT-qPCR polimerasa viral (L)

Una vez establecida la cinética de infección y evaluado los genes estructurales se procedió a evaluar mediante la RT-qPCR la expresión del gen viral L, por medio de la cuantificación relativa $\Delta\Delta C_t$, las condiciones empleadas para la determinación por tiempo real se describen en el (Cuadro 8 y 9) respectivamente.

Cuadro 8. Reactivos y concentraciones de la mezcla de reacción para la amplificación del gen L por RT-qPCR.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen μL
Agua	NA	NA	4.78
Mix	25 mM	1X	6.22
LRSVf-LRSVr	20 μM	2 μM	0.5
cDNA	NA	NA	1

Cuadro 9. Condiciones de reacción, para la amplificación del gen L por RT-qPCR.

Etapas	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo (s)	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	15	1
Desnaturalización	95	15	40
Alineamiento	56	15	
Extensión	72	15	
Curva de desnaturalización	95	(Ramp rate 0.05)	1

7. RESULTADOS

7.1 Producción del stock viral de RSV

La evaluación de la susceptibilidad del modelo celular de placenta humana a la infección por el RSV, se llevó a cabo determinando si existían eventos de replicación viral infectándola con RSV. Para esto, fue necesario partir de un *stock* con una carga viral conocida. Este se obtuvo propagando una semilla de RSV en una línea celular derivada de células HeLa (HEp-2), infectándolas durante 48-72 h. Las primeras horas de infección (12 h), se caracterizaron por no presentar cambios morfológicos aparentes (Figura 9A), sólo células en forma de huso, en una monocapa confluyente. Una vez transcurridas 24 h, la infección se evidenció por la aparición de sincitios de gran tamaño y abundantes sobre la superficie de la monocapa, estos sincitios consisten en un grupo de células fusionadas formando una masa celular multinucleada, generada por la fusión de la membrana de varias células (Figura 9B).

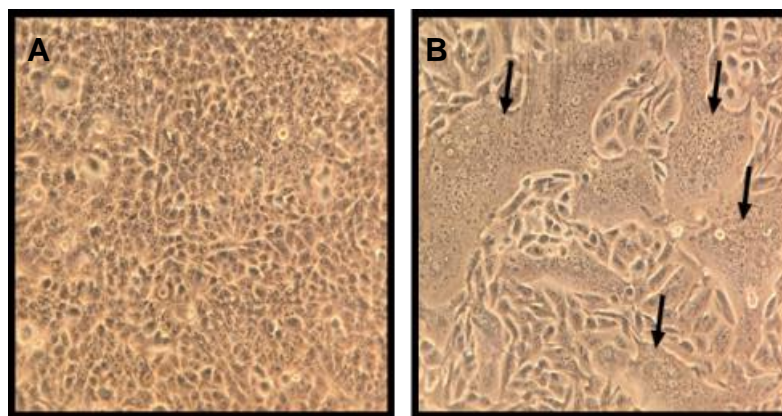


Figura 9. Efecto citopático característico de RSV. Se observan sincitios, formados por RSV en células HEp-2, producto de la fusión de múltiples células a través de la membrana plasmática A) células sin infectar B) 48 h post- reinfección observadas en microscopio invertido a 10X

“Evaluación de la replicación viral en células BeWo infectadas con RSV mediante un ensayo de RT-qPCR”

Finalmente, el virus fue cosechado como se describió anteriormente, para titularlo; empleando el método de titulación en placa, donde expresamos el título en número de unidades formadoras de placa por mililitro (PFU's/mL), la dilución seleccionadas para la titulación fue aquella en la que las placas líticas estuvieran definidas, delimitadas y distinguibles una de otra, para el *stock* obtenido en las células HEP-2 el título calculado fue de 412 PFU's/mL, (Figura 10). Esto se determinó contando el número de placas líticas que produjo la dilución del *stock*, y haciendo las correcciones en función del volumen de infección y las diluciones necesarias para llegar a la cantidad de virus del *stock* concentrado.

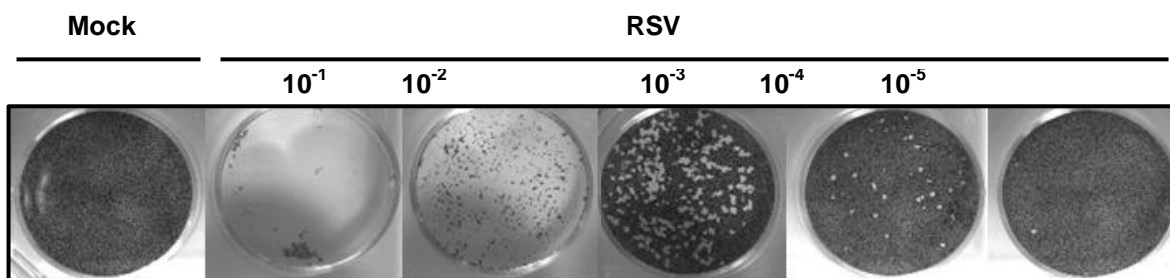


Figura 10. Ensayo de titulación por el método de placas líticas. Placa de la titulación del stock viral del RSV en células HEP-2 que se evidencia por la presencia de pequeños huecos en las placas que representan una partícula viral y se presentan expresan como Unidades Formadoras de Placas líticas por mililitro (PFU's/ml).

7.2 Susceptibilidad de las células BeWo a la infección por RSV

Para establecer el modelo de permisividad de la línea celular de origen placentario fue necesario iniciar con la determinación de la susceptibilidad, la cual se determinó mediante una inmunofluorescencia dirigida a la proteína F del RSV (Figura 11) en la cual se pudo observar un patrón semejante de punteado en la región citoplásmica tanto para las células control como el modelo celular de placenta.

“Evaluación de la replicación viral en células BeWo infectadas con RSV mediante un ensayo de RT-qPCR”

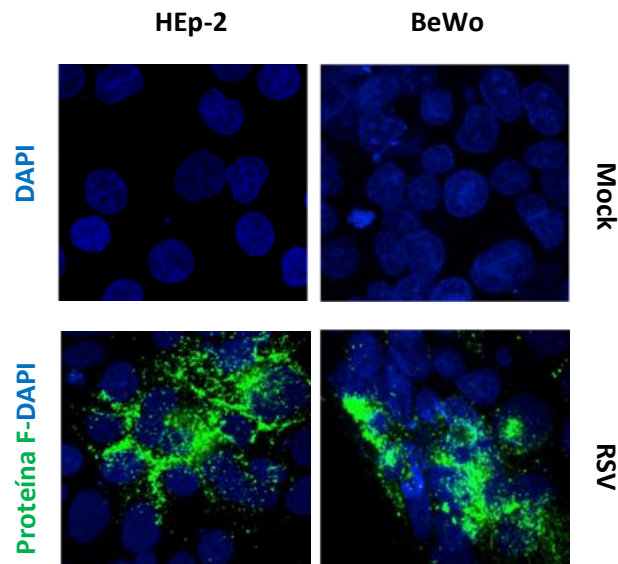


Figura 11. Inmunofluorescencia de la susceptibilidad de las células BeWo al RSV. Imagen microscópica de una inmunofluorescencia dirigida contra la proteína F del RSV en células, BeWo y HEp-2 infectadas con RSV 24 y células falsamente infectadas (Mock) 24 h con el virus inactivado por calor.

7.3 Evaluación de eventos de replicación en células BeWo infectadas con el RSV

La evaluación de las rondas de replicación se realizó observando el aumento en la expresión del gen no estructural NS2, para esto, primero se obtuvo el RNA total; se evaluó la integridad del mismo (dato no mostrado), y la concentración de RNA obtenido, (Cuadro 10), para cada uno de los extractos; así como la pureza de los mismos. Lo que respecta a los extractos, fue necesario obtener concentraciones mayores a 1000 ng/ μ L, dado que para realizar la retro transcripción la concentración de RNA, se ajustó a 5 μ g/ μ L. La extracción y cuantificación del RNA se realizó en los tres tiempos de infección y en las células falsamente infectadas (Mock) mediante las técnicas antes mencionadas respectivamente, así como la retro transcripción para la obtención del cDNA.

“Evaluación de la replicación viral en células BeWo infectadas con RSV mediante un ensayo de RT-qPCR”

Cuadro 10. Valores de concentración y relaciones de pureza del RNA obtenido de la cinética de infección en células BeWo infectadas con RSV.

Tiempo de infección (h)	Concentración (ng/μL)	Relación 260/280	Relación 260/230
Mock	2561.8	1.97	1.98
16	1916.3	1.97	1.81
24	2719.0	1.99	1.84
36	3238.3	1.95	1.92

Nota: La relación A 260 nm / A 280 nm va expresada en función de la cantidad de DNA presente y la relación A 260 nm / A 230 nm va en función de la cantidad de alcoholes que se encuentra remanentes de la extracción. Y el valor esperado para los tres parámetros, el óptimo corresponde a 2.

7.3.1 Evaluación de genes no estructurales NS2

A partir del cDNA obtenido, para los diferentes extractos, se realizó una PCR dirigida a una región del gen no estructural NS2 que tiene un tamaño de amplicon correspondiente a 372 pb (Figura 12), dónde se observó, que tanto a tiempos tempranos como tardíos de la infección se obtuvo el amplicon esperado, y que existió una acumulación considerable del gen N del RSV en las células BeWo a tiempos tardíos, lo cual no sucede en las células tratadas con el Mock. En cuanto el gen de la β -Actina, que se utilizó como gen constitutivo, se pudo observar que el amplicon (437 pb) es constante a lo largo del tiempo, tanto para las células Mock como para las no infectadas, lo que podría estar sugiriendo que las células BeWo son permisivas dado que refleja que el aumento observado en la expresión de NS2 no está dado por

“Evaluación de la replicación viral en células BeWo infectadas con RSV mediante un ensayo de RT-qPCR”

diferentes concentraciones ya que se observó una expresión constante en las células Mock como a tiempos tardíos.

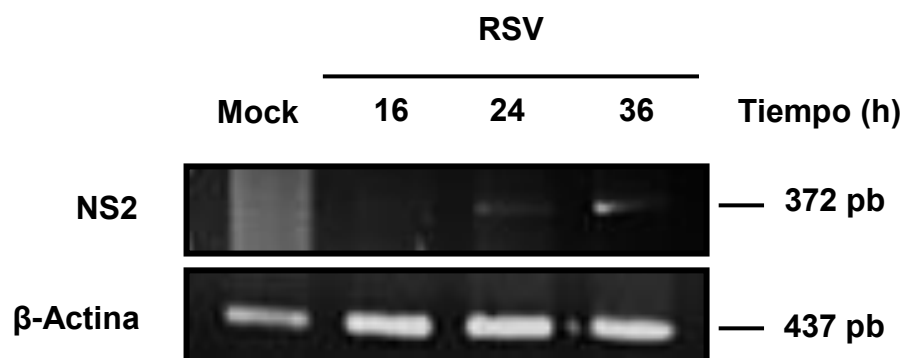


Figura 12. Electroferograma de genes no estructurales del RSV en una cinética de infección de células BeWo. Electroferograma en gel de agarosa al 1% de la cinética de infección en células BeWo que demuestra los productos de amplificación para el gen no estructural NS2 y el gen housekeeping de β - Actina.

7.3.2 Determinación de la expresión relativa del gen L

Dado que se evidenció que desde tiempos tempranos de la infección las células BeWo expresaban genes virales no estructurales, se procedió a confirmar por RT-qPCR, la expresión relativa usando el gen de la polimerasa viral (L), empleando el método de $\Delta\Delta C_t$ comparativo, donde se constató que a tiempos tempranos existe un aumento en la expresión de aproximadamente el 20% respecto al basal (16 h) (Figura 13), a diferencia de lo que se observó a 36 h donde fue evidente que la expresión se vio abatida, respecto al nuestro (16 h) caso contrario de lo observado mediante la PCR punto final (Figura 12), confirmándose, que a tiempos tempranos las células BeWo son permisivas a la infección, a expensas de lo que pudiera significar el abatimiento en tiempos tardíos.

Para esto, se realizó una curva tipo con concentraciones del gen L y un gen constitutivo, la cual reflejó que las variaciones en la expresión fueron dadas por la

“Evaluación de la replicación viral en células BeWo infectadas con RSV mediante un ensayo de RT-qPCR”

infección viral. La normalización de la polimerasa viral se realizó tomando como condición de referencia o basal la expresión del gen L a 16 h y no respecto al Mock, puesto que la expresión estaría sobreestimada, dado que el porcentaje de expresión para este fue de 0% y aunado a esto, entre las 12-16 h inicia la liberación de partículas virales maduras, lo cual puedo constatar mejor si realmente existió un aumento de la expresión de genes virales, que sobrevino por los eventos de replicación viral.

Todo esto se realizó usando los mismos extractos de cDNA empleados para evaluar NS2.

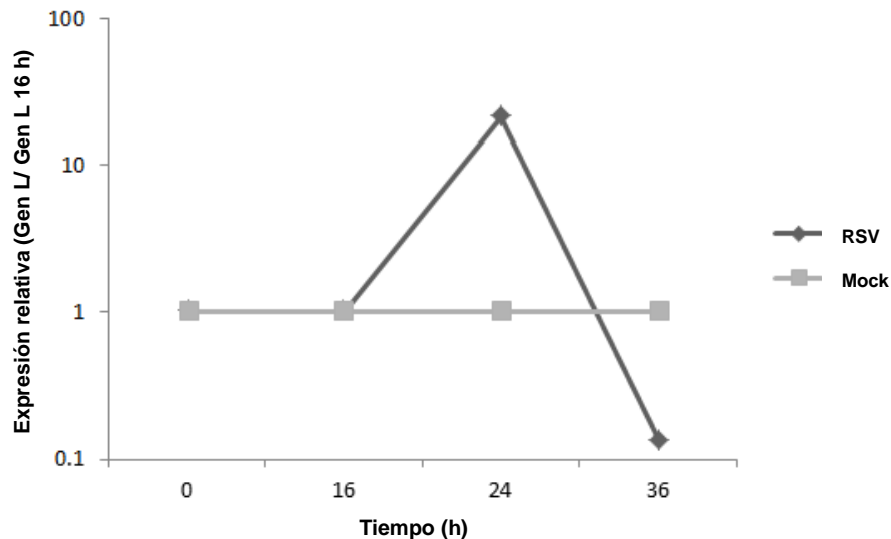


Figura 13. Expresión relativa del gen L del RSV en células BeWo La expresión se determinó a partir del cálculo de $\Delta\Delta Ct$ del cDNA obtenido a partir de la cinética de infección en células BeWo infectadas con el RSV, donde se graficó la expresión relativa del Gen L, respecto al mismo gen L, pero en la infección de 16h tomando como referencia que un ciclo de replicación viral es completado a las 16h.

7.4 Evaluación de genes de inmunidad innata (RIG1 y TLR-3)

Acorde con los resultados anteriores, son sugerentes a que la línea celular BeWo es un modelo permisivo a la replicación del RSV, adicional a esto, se evaluaron algunas

“Evaluación de la replicación viral en células BeWo infectadas con RSV mediante un ensayo de RT-qPCR”

moléculas de inmunidad innata para establecer bases sobre los mecanismos que pudiesen estar involucrados en la susceptibilidad de las células. Para esto determinamos a partir de una cinética de infección el gen que codifica para el receptor RIG-1 (Figura 14), donde se puede observar que el amplicon esperado para este gen (644 pb) solo fue evidente a las 36 h en nuestro Mock, lo cual podría ser sugestivo de que en etapas tempranas existió algún mecanismo viral que suprimió la expresión. Así mismo se evaluó el TLR-3 (Figura 14), para el cual fue evidente que a tiempos tempranos (16 h) aparentemente existió una supresión de este gen, lo cual no permitió detectarlo, sin embargo a tiempos tardíos (24 y 36 h), se logró detectar el gen de TLR3.

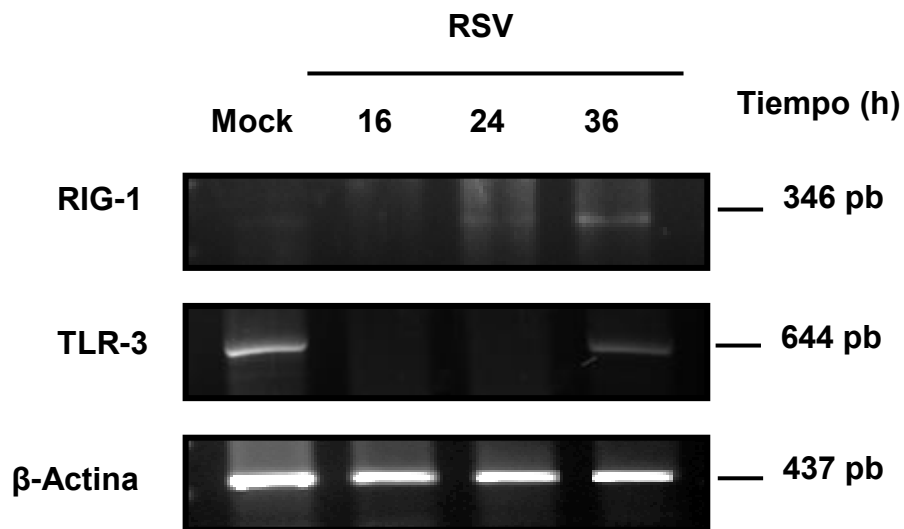


Figura 14. Electroferograma de genes de inmunidad innata en una cinética de infección del RSV en células BeWo. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación para el gen de la β - Actina, RIG-1 y el gen TLR-3 de la cinética de infección del RSV en células BeWo.

8. DISCUSIÓN

Las infecciones durante el embarazo son una de las causas principales de morbimortalidad fetal y neonatal, ya que el embarazo conduce a un periodo de inmunosupresión transitorio donde muchas de las infecciones virales en él tienen repercusiones tanto maternas como fetales (Arora *et al.*, 2017). Siendo las infecciones asintomáticas las de mayor relevancia al nacer, puesto que pueden tener manifestaciones clínicas tardías que se hacen evidentes sólo en etapas posteriores de la vida. En los primeros años de niñez el feto puede ser afectado no solo por transmisión directa, sino también indirecta producto de la infección materna. Al ser las afecciones variables según el agente infeccioso, la edad gestacional en el momento de transmisión y el estado inmune de la madre, las infecciones primarias durante el embarazo son sustancialmente más perjudiciales que las reinfecciones o reactivaciones de infección. Asimismo, las infecciones contraídas a una edad gestacional menor tienden a conducir a afecciones más graves (Paschale *et al.*, 2009, Jamieson *et al.*, 2014).

Por lo cual en este trabajo se realizó un estudio en el que se determinó eventos de replicación viral del RSV en la línea celular de placenta humana (BeWo), como un posible modelo que permita el estudio de los mecanismos de transmisión vertical. De esta manera, el hallazgo más interesante que se pudo extraer del presente trabajo, fue que el RSV infecta eficazmente la línea celular derivada de placenta humana. Esto se evidenció al observar patrones característicos en la disposición de la señal en la

“Evaluación de la replicación viral en células BeWo infectadas con RSV mediante un ensayo de RT-qPCR”

inmunofluorescencia, que coinciden con lo reportado por Kim y colaboradores en 1983, y pese a que hay evidencia limitada en tejido placentario en cuanto a patrones característicos por inmunofluorescencia de la infección por RSV, los resultados coinciden con el análisis microscópico de la acumulación de la proteína F en el citoplasma celular, así como dentro de los cuerpos de inclusión vírica (IB's), lo cual sugeriría que la interacción de la proteína F con IB's es un paso importante en el proceso de montaje del virión (Kim *et al.*, 1983, Meshram *et al.*, 2016).

Otro hallazgo importante en este modelo celular fue al evaluar la permisividad viral identificando la presencia del gen no estructural NS2 del RSV y la expresión de un gen estructural, gen L o polimerasa viral.

Con base en lo reportado en la bibliografía, se consideran genes no estructurales, aquellos que dan origen a una proteína que no se ha encontrado en viriones maduros, sin embargo, abundan en células infectadas. Viegas en el 2011, demostró que la expresión temprana de estas proteínas aumenta la replicación viral, mediante el retraso de la apoptosis. Por lo cual la acumulación observada de este gen en la cinética de infección, podría atribuirse a que las células BeWo están siendo susceptibles desde etapas tempranas de la infección, incluso este hallazgo se confirma al asociar el patrón observado en el gen *housekeeping*, el cual refleja que la acumulación del gen NS2, es producto de la infección viral y no por el empleo de diferentes concentraciones de cDNA. Aunado a esto, los resultados apoyan aún más la idea de la permisividad viral dado que las proteínas no estructurales de RSV, están codificadas por las dos unidades

“Evaluación de la replicación viral en células BeWo infectadas con RSV mediante un ensayo de RT-qPCR”

de transcripción proximales del promotor, haciéndolos los genes más tempranos y más abundantemente transcritos iniciada la replicación viral, esto mismo correlaciona con un estudio realizado por Jin y colaboradores en el 200 en células que carecían de NS2, se observó que las mutantes por delección mostraron un mayor defecto en la replicación de en células HEp-2 (Jin *et al.*, 2000). Por lo tanto, los genes NS probablemente tienen funciones requeridas para la replicación óptima de RSV, ya que codifican funciones múltiples, que son esenciales para la replicación óptima de RSV (Tran *et al.*, 2007).

Dado que los datos sugerían que el RSV estaba replicando en las células BeWo desde tiempos tempranos, se procedió a evaluar mediante un ensayo de PCR tiempo real la expresión del gen viral L. Donde se obtuvo que los resultados obtenidos para la RT-qPCR, no son del todo consistentes con los resultados encontrados por RT-PCR punto final, ya que se observó que a tiempos tardíos de infección hubo una mayor acumulación del gen NS2, y por RT-qPCR, hubo un abatimiento en la expresión de L respecto a la condición normalizadora, que en este caso fue el valor obtenido a 16h, debido a que RSV cumple un ciclo de replicación viral a las 16h; sin embargo, es importante tener en cuenta que esta disparidad entre los resultados podría deberse desde un inicio al efecto directo ejercido en la viabilidad celular como lo describe Lifland y colaboradores en el 2012, que la liberación de la progenie viral continúa hasta que las células se deterioran entre 30-48 h; lo cual estaría influyendo directamente en la viabilidad de la partículas virales debido a la extravasación de todo el contenido celular y la falta de disponibilidad de células para que se mantenga el virus replicándose y pese a que este podría ser uno de los principales factores por no decir que el más

importante, no es el único que pueda tener implicaciones en este hallazgo, ya que los genes empleados para evaluar la susceptibilidad son distintos, para RT-PCR punto final (NS2 gen no estructural) y para RT-qPCR (gen estructural L).

Adicionalmente a esto es bien sabido que la transcripción de los diferentes genes del RSV ocurre a medida que la transcripción progresa a lo largo del genoma, por lo que algunos complejos se separan y la expresión de los genes que se encuentran distales se reduce, lo cual resulta en un gradiente de expresión desde los genes proximales a los distales. Lo cual podría justificar de alguna forma que al ser L el gen más distal, su expresión se abata (San *et al.*, 2006).

Por otro lado, a manera de establecer las bases sobre los mecanismos implicados en la susceptibilidad de este modelo celular, se obtuvieron algunos datos preliminares acerca de genes de inmunidad innata (RIG-1 y TLR-3), que deben ser interpretados con cautela. Puesto que los hallazgos de este estudio no coinciden con los resultados obtenidas en anteriores investigaciones en modelos celulares de epitelio respiratorio, donde demuestran que en células de carcinoma bronquioalveolar se produce un aumento del mRNA y la proteína de TLR-3 a 16 h, a diferencia de lo que se observó en este estudio, donde a 16 h no se apreció la banda correspondiente al gen de TLR-3 y no es claro por qué suceda este fenómeno sin embargo, es posible que de alguna forma existe un mecanismo que pudiese estar bloqueando la transcripción a tiempos tempranos de la infección, aunado al hecho de que la respuesta entre una línea celular y otra puede ser variable (Mcclure & Massari, 2014, Groskreutz *et al.*, 2017), sin embargo a pesar de que estos resultados difieren con los estudios publicados por

“Evaluación de la replicación viral en células BeWo infectadas con RSV mediante un ensayo de RT-qPCR”

McClure & Massari en el 2014 son consistentes con que en etapas tardías (36 h) el gen que codifica para TLR-3 es detectable (McClure & Massari, 2014).

Así mismo de manera sorprendente se encontró un fenómeno muy particular al evaluar RIG-1 donde se encontró que a tiempos muy tempranos (16 h) no es detectable la presencia del gen que codifica para RIG-1, si no hasta las 24 y 36 h, lo cual concuerda con el modelo celular de carcinoma bronquioalveolar, donde se demuestra que existe RIG-1 se ve incrementado desde tiempos tempranos (Loo *et al.*, 2008). Sin embargo, es importante no perder de vista que son datos preliminares o sugerentes dado que no existe evidencia científica disponible que permita confirmar lo antes mencionado y por consiguiente será necesario realizar más determinaciones para dilucidar los eventos que preceden a estos fenómenos.

9. CONCLUSIONES

1. En el modelo celular de placenta humana, las células (BeWo) infectadas con RSV, son permisivas a la infección, y durante la misma ocurren eventos de replicación viral.
2. La línea celular BeWo es un buen modelo para el estudio de la transferencia vertical de la infección por RSV.
3. Los mecanismos de inmunidad innata podrían ser posibles vías que estén involucradas en la permisividad de la línea celular BeWo al RSV

10. PROSPECTIVAS

1. Evaluar en un cultivo primario de citotrofoblastos, la permisividad a la infección por RSV.
2. Determinar el mecanismo por el cual, estas células son permisivas a la infección por RSV.
3. Establecer si la respuesta inmune, juega un papel en la permisividad en citotrofoblastos humanos.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Arora, N., Sadovsky, Y., Dermody, T. S., & Coyne, C. B. (2017). Review Microbial Vertical Transmission during Human Pregnancy. *Cell Host and Microbe*, 21(5):561–567.
2. Ashrafuzzaman M., Naim Z., Mustahsan B., Masud R. (2017). Replication and Transcriptional Regulation Review of Respiratory Syncytial Virus (RSV), *EC Microbiology*, 7.2:58–66.
3. Ávila A. V, & Castellanos, J. E. (2013). Diagnóstico virológico de la infección por virus. *Revista Salud Bosque*, 3(1): 23–36.
4. Bayer, A., Lennemann, N. J., Ouyang, Y., Cherry, S., Sadovsky, Y., Coyne, C. B., ... Morosky, S. (2016). Short Article Type III Interferons Produced by Human Placental Trophoblasts Confer Protection against Zika Virus Short Article Type III Interferons Produced by Human Placental Trophoblasts Confer Protection against Zika Virus Infection. *Cell Host and Microbe, PLoS pathogens*, 19:1–8.
5. Blondot, M., Dubosclard, V., Fix, J., Lassoued, S., & Aumont-nicaise, M. (2012). Structure and Functional Analysis of the RNA- and Viral Phosphoprotein-Binding Domain of Respiratory Syncytial Virus M2-1 Protein, *8(5):1-13*.
6. Caly, L., Ghildyal, R., Jans, D. A., & Plemper, R. K. (2015). Respiratory virus modulation of host nucleocytoplasmic transport; target for therapeutic intervention ?, *Frontiers in Microbiology*, 6:1–12.
7. Cantle, S. J., & Kaufmannbe, P. (1987). Interpretation of Syncytial Sprouts and Bridges in the Human Placenta, *Placenta*, 8:221–234.
8. Cheng X, Park H, Zhou H, Jin H. Overexpression of the M2-2 protein of respiratory syncytial virus inhibits viral replication, *Journal of Virology*, 79(22):13943–13952.
9. Chang, A., & Dutch, R. E. (2012). Paramyxovirus Fusion and Entry: Multiple Paths to a Common End, *Viruses*, 4:613–636.
10. Chu, H. Y., & Englund, J. A. (2013). Challenges and Opportunities for Respiratory

- Syncytial Virus Vaccines. *Current topics in microbiology and immunology*, 372:3-38.
11. Collins, P. L., Fearn, R., & Graham, B. S. (2013). Respiratory Syncytial Virus : Virology , Reverse Genetics , and Pathogenesis of Disease, *Current Topics in Immunology and Microbiology*, 372:8-38.
 12. Cowton, V. M., Mcgovern, D. R., & Fearn, R. (2018). Unravelling the complexities of respiratory syncytial virus RNA synthesis, *Journal of General Virology*, 87:1805–1821.
 13. Delorme-Axford, E., Sadovsky, Y., & Coyne, C. B. (2014). The Placenta as a Barrier to Viral Infections. *Annual Review of Virology*, 1(1):133–146.
 14. Escribano-Romero, E., Rawling, J., García-barreno, B., & Melero, A. (2004). The Soluble Form of Human Respiratory Syncytial Virus Attachment Protein Differs from the Membrane-Bound Form in Its Oligomeric State but Is Still Capable of Binding to Cell Surface Proteoglycans, *Journal of Virology*, 78(7):3524–3532.
 15. Esteban, M. (2014). La proteína no-estructural NS1 exclusiva del virus respiratorio sincicial: mecanismo de plegamiento y ensamblado quasi-espontáneo de oligómeros esféricos estables, *FCEN-UBA*, 15-156.
 16. Fernandes-Matano, L., Eloi, I., Angeles-Martínez, J., Pardave, H. D., Sarquiz-martinez, B., Donaji, I., Rau, C. (2017). Prevalence of non-influenza respiratory viruses in acute respiratory infection cases in Mexico, *PLoS ONE*, 12(5):1-18.
 17. Galloux, M., Loney, C., Bakker, S. E., Rey, A., Bhella, D., & Conner, E. (2013). The respiratory syncytial virus nucleoprotein – RNA complex forms a left-handed helical nucleocapsid, *Journal of General Virology*, 94:1734–1738.
 18. Gamiño A. E, Moreno E. S, Llamasa G. B, Ortiz H.. A, Guerrero L. M, Arturo, G., Francisco, J. F. G., Beigel, J. P. J. H., Daniel, G. M. R., & Noyola, E. (2017). Epidemiology and clinical characteristics of respiratory syncytial virus infections among children and adults in Mexico, *Influenza and Other Respiratory Viruses Published*, 11:48-56.
 19. Gan, S. W., Tan, E., Lin, X., Yu, D., Wang, J., Tan, G. M. Y., Torres, J. (2012). The small hydrophobic protein of the human respiratory syncytial virus forms

- pentameric ion channels. *Journal of Biological Chemistry*, 287(29).
20. Ghildyal, R., Ho, A., & Jans, D. A. (2006). Central role of the respiratory syncytial virus matrix protein in infection, *FEMS Microbiology*, 30: 692–705.
21. Gould, P. S., & Easton, A. J. (2007). Coupled Translation of the Second Open Reading Frame of M2 mRNA Is Sequence Dependent and Differs Significantly within the Subfamily Pneumovirinae, *Journal of Virology*, 81(16): 8488–8496.
22. Griffiths, C., Drews, S. J., & Marchant, D. J. (2017). Respiratory Syncytial Virus : Infection , Detection , and New Options for Prevention and Treatment, *Clinical Microbiology*, 30(1):277–319.
23. Hallak, L. K., Spillmann, D., Collins, P. L., & Peeples, M. E. (2000). Glycosaminoglycan Sulfation Requirements for Respiratory Syncytial Virus Infection, *Journal of Virology*, 74(22):10508–10513.
24. Hurk, S. V. D. L. Den, & Watkiss, E. R. (2012). Pathogenesis of respiratory syncytial virus. *Current Opinion in Virology*, 2(3):300–305.
25. Jamieson, D. J. (2014). Pregnancy and Infection, *The New England Journal of Medicine*, 370(23):2211–2218.
26. Jin, H., Zhou, H., Cheng, X., Tang, R., Munoz, M., & Nguyen, N. (2000). Recombinant Respiratory Syncytial Viruses with Deletions in the NS1 , NS2 , SH , and M2-2 Genes Are Attenuated *in Vitro* and *in Vivo*, *Virology*, 218:210–218.
27. Lifland, A. W., Jung, J., Alonas, E., Zurla, C., Crowe, J. E., & Santangelo, P. J. (2012). Human Respiratory Syncytial Virus Nucleoprotein and Inclusion Bodies Antagonize the Innate Immune Response Mediated by MDA5 and MAVS, *Journal of Virology*, 86(15):8245–8258.
28. Lindquist, M. E., Lifland, A. W., Utley, T. J., Santangelo, P. J., & Crowe, J. E. (2010). Respiratory Syncytial Virus Induces Host RNA Stress Granules To Facilitate Viral Replication, *Journal of Virology*, 84(23):12274–12284.
29. Lo, M. S., Brazas, R. M., & Holtzman, M. J. (2005). Respiratory Syncytial Virus Nonstructural Proteins NS1 and NS2 Mediate Inhibition of Stat2 Expression and Alpha / Beta Interferon Responsiveness, *Journal of Virology*, 79(14): 9315–9319.
30. Loo, Y., Fornek, J., Crochet, N., Bajwa, G., Perwitasari, O., Martinez-sobrido, L.,

- Gale, M. (2008). Distinct RIG-I and MDA5 Signaling by RNA Viruses in Innate Immunity, *Journal of Virology*, 82(1): 335–345.
31. Malhotra, R., Ward, M., Bright, H., Priest, R., Foster, M. R., Hurle, M., ... Bird, M. (2003). Isolation and characterisation of potential respiratory syncytial virus receptor (s) on epithelial cells, *Microbes and Infection*, 5:123–133.
32. Marino, T., Editor, C., & Isaacs, C. (2016). *Viral Infections and Pregnancy*, Medscape, 1–28.
33. Mastrangelo, P., & Hegele, R. G. (2013). RSV Fusion: Time for a New Model, , *Viruses* 5:873–885.
34. Mcnamara, P. S., & Smyth, R. L. (2002). The pathogenesis of respiratory syncytial virus disease in childhood, *British Medical Bulletin*, 61:13–28.
35. Meshram, C. D., Baviskar, P. S., Ognibene, C. M., & Oomens, G. P. (2016). The Respiratory Syncytial Virus Phosphoprotein , Matrix Protein , and Fusion Protein Carboxy-Terminal Domain Drive Efficient Filamentous, *Journal of Virology*, 90(23):10612–10628.
36. Piedimonte, G., & Perez, M. K. (2014). ScienceDirect 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.
37. Piedimonte, G., & Perez, M. K. (2016). Respiratory Syncytial Virus Infection and Bronchiolitis, *Pediatrics in Review* 35(2):519-530.
38. Pudney, J., He, X., Masheeb, Z., Kindelberger, D. W., Kuohung, W., & Ingalls, R. R. (2016). Differential expression of toll-like receptors in the human placenta across early gestation. *Placenta*, 46: 1–10.
39. 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, *344*, 328–339.
40. Rima, B., Collins, P., Easton, A., Fouchier, R., Kurath, G., Lamb, R. A., ... Consortium, I. R. (2017). ICTV ICTV Virus Taxonomy Profile : Pneumoviridae, 2912–2913.

41. Rincheval, V., Lelek, M., Gault, E., Bouillier, C., Sitterlin, D., Blouquit-laye, S., Eleouet, J. (2017.). Functional organization of cytoplasmic inclusion bodies in cells infected by respiratory syncytial virus. *Nature Communications*, 1–11.
42. Rossi, G. A., & Colin, A. A. (2014). Infantile respiratory syncytial virus and human rhinovirus infections: respective role in inception and persistence of wheezing, *European Respiratory Journal*, 45:774–789.
43. Rudraraju, R., Jones, B., Sealy, R., Surman, S., & Hurwitz, J. (2013). Respiratory Syncytial Virus: Current Progress in Vaccine Development. *Viruses*, 5(2):577–594.
44. San, H., Vergara, J., Gutiérrez, M. A., & Mohapatra, S. S. (2006). Molecular biology of syncytial respiratory virus and development of prophylactic strategies, *Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal* 22(2):135–153.
45. Sheridan, M. A., Yunusov, D., Balaraman, V., Alexenko, A. P., & Yabe, S. (2017). Vulnerability of primitive human placental trophoblast to Zika virus, *PNAS*, 1587–1596.
46. Shi, T., Mcallister, D. A., Brien, K. L. O., Simoes, E. A. F., Madhi, S. A., Gessner, B. D., ... Wang, J. (2017). Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study, *Lancet*, 390: 946–958.
47. Simoes EA. (1999). Respiratory syncytial virus infection. *Lancet*, 354(12) 847–52.
48. Spann, K. M., Tran, K. C., Collins, P. L., & Irol, J. V. (2005). Effects of Nonstructural Proteins NS1 and NS2 of Human Respiratory Syncytial Virus on Interferon Regulatory Factor 3, NFκ-B, and Proinflammatory Cytokines, *Journal of Virology*, 79(9):5353–5362.
49. Tang, J. W., Lam, T. T., Zaraket, H., Lipkin, W. I., Drews, S. J., Hatchette, T. F., Koopmans, M. P. (2017). Personal View Global epidemiology of non-influenza RNA respiratory viruses: data gaps and a growing need for surveillance, *Lancet infectious disease*, 3099(17):30238-30248.

50. Tanner, S. J., Ariza, A., Richard, C., Kyle, H. F., Dods, R. L., & Blondot, M. (2013). Crystal structure of the essential transcription antiterminator M2-1 protein of human respiratory syncytial virus and implications of its phosphorylation, *PNAS*, 11(4):1580-1585.
51. Tran, K. C., He, B., & Teng, M. N. (2007). Replacement of the respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 by the V protein of parainfluenza virus 5, *Virology* 368: 73–82.
52. Valdés, R. O., & Corzo, L. M., (2013). El virus sincicial respiratorio humano : una panorámica, *Revistas Cien.tíficas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*, 44(2):1-20
53. Vandini, S., Bottau, P., Faldella, G., & Lanari, M. (2015). Factors Modulating Lung Immune Response to Respiratory Syncytial Virus, *Biomedical Reserch International*, 1-7.
54. Viegas, M. (2011). Epidemiología molecular del virus sincicial respiratorio en pacientes pediátricos en un período de seis años *. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 45(1):3–45.
55. Viviana, L., Adarme, Á., & Castellanos, J. E. (2013). Diagnóstico virológico de la infección por virus. *Revista Salud Bosque*, 3(1):23–36.
56. Wong-chew, R. M., García-león, M. L., Noyola, D. E., Perez, L. F., Gaitan, J., Vilaseñor-sierra, A., ... Santos-preciado, J. I. (2017). International Journal of Infectious Diseases Respiratory viruses detected in Mexican children younger than 5 years old with community-acquired pneumonia : a national multicenter. *International Journal of Infectious Diseases*, 62:32–38.

11.1 Referencias bibliográficas en línea

1. URL WHO Global Respiratory Syncytial Virus Surveillance Extraído el 11 de Agosto del 2017 <https://www.who.int/influenza/rsv/en/>
2. URL International Committee on Taxonomy of Viruses Extraído el 10 de Septiembre del 2016 <http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>
3. URL Hulo, Chantal; de Castro Edouard; Masson Patrick (Jan 2011). "ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity". *Nucleic Acids Res.* England.