

03068 3
201-



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y
DE POSGRADO UACP y P DEL CCH

CENTRO DE NEUROBIOLOGIA

“PURIFICACION Y CARACTERIZACION FISICOQUIMICA DE LA GLICOPROTEINA HN DEL PARAMIXOVIRUS PORCINO LPM”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :

MAESTRO EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

PRESENTA

MARIA BLANCA ESPINOSA MANCILLA

TUTOR: DR. EDGAR ZENTENO GALINDO

COTUTOR : DR. JULIO REYES LEYVA

MEXICO D.F. 1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

263938



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAGINACION

DISCONTINUA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO DEL CCH
UACP y P-CCH**

**PURIFICACION Y CARACTERIZACION FISICOQUIMICA DE LA
GLICOPROTEINA HN DEL PARAMIXOVIRUS PORCINO LPM**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE MAESTRO EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

PRESENTA :

MARIA BLANCA ESPINOSA MANCILLA

TUTOR : DR. EDGAR ZENTENO GALINDO

COTUTOR : DR. JULIO REYES LEYVA

México D.F. 1998

RECONOCIMIENTOS

Tutor académico: Dr. Edgar Zenteno Galindo

Cotutor: Dr. Julio Reyes Leyva

Este trabajo fue realizado en las siguientes Instituciones

Laboratorio de Inmunología, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, D.F.

Laboratorio de Virología, Centro de Investigación Biomédica de oriente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Puebla, Pue.

Departamento de Investigación en Bioquímica, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Secretaría de Salud, Tlapan, D.F.

Este trabajo contó con el apoyo financiero de :

Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIT), Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México. Proyecto No. IN 211396

Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Proyectos No. 2151PM y 3228PB9607.

La autora de este trabajo fue becaria de la Coordinación de Investigación Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social del 1o. de marzo de 1994 al 28 de febrero de 1997.

INDICE

Resumen.....	4
Introducción.....	5
Enfermedad del ojo azul.....	5
Figura 1.- Signología clínica de un lechón infectado con el virus LPM.....	7
Tabla 1.- Correlación histopatológica y presencia de azúcares de acuerdo a la edad del cerdo..	8
El Rubulavirus porcino LPM (RvpLPM).....	9
Tabla 2.- Clasificación del rubulavirus porcino.....	10
Tabla 3.- Proteínas estructurales del rubulavirus porcino.....	11
Tabla 4.- Pesos moleculares de la proteína HN en el género Rubulavirus.....	13
Figura 2.- Diagrama esquemático de un paramixovirus.....	15
Justificación.....	16
Objetivos.....	16
Material y métodos.....	17
Métodos generales	
Purificación de la proteína HN del virus LPM	
Caracterización de las propiedades fisicoquímicas de la proteína HN	
Papel de los carbohidratos en la infectividad viral. Ensayos de especificidad viral.....	24

Resultados.....	26
Figura 3.- Efecto citopático del virus LPM sobre células Vero.....	26
Actividad hemaglutinante del virus LPM sobre eritrocitos de diferentes especies.....	27
Tabla 5.- Actividad aglutinante del rubulavirus porcino LPM.....	27
Aislamiento de la proteína HN del virus LPM.....	28
Tabla 6.- Estandarización del proceso de sonicación.....	28
Gráfica 1.- Cinética del aislamiento de la proteína HN por sonicación.....	29
Tabla 7.- Título hemaglutinante de la proteína HN aislada por sonicación.....	30
Aislamiento de la proteína HN por gradientes de densidad.....	30
Gráfica 2.- Purificación de la proteína HN por gradientes de densidad.....	31
Rendimiento del aislamiento de la proteína HN por gradiente de densidad.....	32
Tabla 8.- Recuperación de la actividad hemaglutinante de la proteína HN durante su aislamiento en gradientes de densidad.....	33
Tabla 9.- Actividad específica de la proteína HN aislada por gradientes de densidad.....	34
Purificación de la proteína HN por cromatografía de intercambio iónico.....	35
Gráfica 3.- Perfil de elución de la proteína HN.....	36
Caracterización fisicoquímica de la proteína HN del virus LPM.....	37
Peso molecular	
Figura 4.- Patrón electroforético de la proteína HN.....	37
Punto isoelectrico teórico.....	38

Tabla 10.- Punto isoelectrico de las proteínas estructurales del virus LPM.....	38
Punto isoelectrico experimental de la proteína HN.....	39
Composición de aminoácidos.....	40
Tabla 11.- Composición de aminoácidos de la proteína HN del rubulavirus porcino LPM.....	41
Composición de carbohidratos de la proteína HN.....	43
Papel de los carbohidratos en la infectividad viral.....	44
Efecto de los inhibidores de la glicosilación en la infectividad viral	
Gráfica 4.- Efecto de los inhibidores de glicosilación sobre la infectividad viral.....	44
Efecto de dexametasona sobre la infectividad viral	
Gráfica 5.- Efecto de dexametasona en la infección viral.....	45
Citoquímica con lectinas.....	46
Tabla 13.- Efecto de los inhibidores de la glicosilación y dexametasona en el reconocimiento por lectinas.....	46
Discusión.....	47
Conclusiones.....	54
Bibliografía.....	55

RESUMEN

El Rubulavirus porcino La Piedad Michoacán (RvpLPMV) es el agente etiológico de la Enfermedad del ojo azul de los cerdos, el cual ocasiona desordenes neurológicos, reproductivos, respiratorios y ocasionalmente opacidad de la córnea. Este virus posee dos glicoproteínas en su membrana, la proteína hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y la proteína de fusión (F). En este trabajo se purificó y caracterizó a la proteína HN del Rvp LPM. La proteína HN fue obtenida de viriones de la cepa LPM replicados en la línea celular Vero. El virus se concentró por precipitación con polietilenglicol. La purificación parcial de la proteína HN se realizó por ultracentrifugación en gradientes de densidad. Las fracciones obtenidas con actividad aglutinante se utilizaron para la purificación total por cromatografía de intercambio iónico. Del gradiente de densidad se obtuvieron 4 fracciones con actividad aglutinante correspondientes a las fracciones 16 a 19. Para la cromatografía de intercambio iónico se utilizaron las fracciones 18 y 19 del gradiente de sacarosa. Aquí se obtuvieron 3 fracciones (I, II, III) eluidas en un gradiente de fuerza iónica. La fracción mayoritaria correspondió a la fracción I la cual presentó actividad aglutinante y fue utilizada en los ensayos de caracterización. La proteína HN presenta un peso molecular de 65 Kda y un punto isoeléctrico de 5.61 a 5.73. La composición de carbohidratos indicó que la proteína HN está constituida por Man: Gal: GalNAc: GlcNAc: NeuAc que corresponde al 1% de su peso y que la relación molar entre ellos es: 3: 3: 2: 1: trazas, respectivamente. La composición de aminoácidos mostró que existe homología en cuanto a los aminoácidos de tipo hidrofóbico entre la proteína HN purificada y la reportada previamente para el genoma; no así para el resto de los aminoácidos. Esta proteína aglutina eritrocitos de diferentes especies, aunque presenta mayor reactividad con eritrocitos humanos tipo A₂, pollo y conejo. En cuanto a la especificidad viral por azúcares el virus reconoce específicamente NeuAc α 2,3Gal, presente en la superficie de células Vero y tejidos de cerdos neonatos, no así, el anómero NeuAc α 2,6 que al parecer predomina en los tejidos de cerdos adultos, estas variaciones en las estructuras sacarídicas en función de la edad al parecer determinan el tropismo tisular del virus LPM en los cerdos de diferentes edades. La proteína HN es indispensable para el reconocimiento del virus por su célula blanco aunque al parecer la proteína HN y F son importantes además en el proceso de fusión del virus con la célula huésped.

INTRODUCCION

ENFERMEDAD DEL OJO AZUL

El virus porcino de La Piedad Michoacán (LPM) es un miembro de la familia Paramyxoviridae, recientemente clasificado junto con el virus de la Parotiditis humana en el género Rubulavirus (Rima y cols., 1995). Es el agente etiológico de la Enfermedad del ojo azul, que es una entidad patológica del ganado porcino en la que se presentan alteraciones neurológicas, respiratorias y reproductivas acompañadas por opacidad de la córnea, lo que dió origen al nombre de esta enfermedad (Stephano y cols. 1988). Los signos clínicos varían de acuerdo a la edad de los animales. En cerdos neonatos los signos que se presentan son: ataxia, rigidez de los miembros posteriores, temblor muscular y movimientos involuntarios; estos animales mueren generalmente 48 h después que se presentan los primeros signos nerviosos. La opacidad de la córnea se presenta sólo en 1-10 % de los animales afectados de cualquier edad. Los cerdos infectados mayores de 30 días de edad, algunas veces presentan signos de daño neurológico y pocos mueren por la infección (Stephano y cols. 1988).

A partir de 1983 se han identificado brotes de la enfermedad con signos de encefalitis y opacidad de la córnea en los cuales los principales afectados son cerdos de 3-4 meses de edad. Los machos infectados presentan orquitis, epididimitis y atrofia testicular (Stephano y cols., 1990 ; Campos y Carbajal, 1991). La sintomatología y las lesiones encontradas en cerdos adultos tiene patrones similares a los de otro paramixovirus, el de la Parotiditis humana (Pomeroy y Jordan, 1992). Las cerdas cuando son infectadas en periodos avanzados de la gestación presentan un número elevado de mortinatos y fetos momificados y cuando se infectan al inicio de la gestación regresan al estro, con una baja consecuente en los porcentajes de fertilidad (Stephano y Gay, 1985). Existen evidencias que indican que la ruta natural de infección del virus LPM es la nasofaringe ya que se ha logrado reproducir la infección experimentalmente mediante inoculación intranasal o intratraqueal del virus LPM en lechones de 1-17 días de edad, además se ha provocado el síndrome nervioso similar al observado en la infección natural (Stephano y Gay, 1983 ; Allan y cols. 1996).

Se piensa que el sitio inicial de replicación del virus es la mucosa de los cornetes nasales y las amígdalas y de ahí el virus se disemina hacia el sistema nervioso y pulmones (Stephano y

Gay, 1985; Allan y cols., 1996). En pulmón es frecuente observar zonas diseminadas de neumonía intersticial con engrosamiento del septo alveolar y la presencia de células mononucleares (Stephano y cols., 1988). El virus LPM se ha aislado de encéfalo con mayor abundancia que en ningún otro tejido y la inoculación intracerebral acorta el periodo de incubación ocasionando cuadros clínicos similares a los casos agudos de lechones infectados en forma natural. Existen datos histológicos donde se muestra encefalitis que afecta principalmente la sustancia gris del tálamo, cerebro medio y corteza cerebral; existe marcada gliosis focal e inflamación perivascular linfocitaria difusa, neuronofagia, necrosis neuronal y glial, meningitis y coroiditis, además no se observan cuerpos de inclusión (Stephano y cols., 1988).

El daño al Sistema nervioso central (SNC) es dependiente de la edad de los cerdos, ya que, los cerdos de 3 días de edad infectados experimentalmente con el virus LPM muestran signos neurológicos severos a los 5 días postinfección (p.i) y generalmente mueren a los 8 días de infección; mientras que, solo el 30% de los cerdos de 17 días de edad muestran signos de daño neurológico (Allan y cols., 1996). El aislamiento viral en el SNC de lechones de 17 días de edad infectados se limita al cerebro medio y bulbo olfatorio, así como, a grupos discretos de antígeno de LPM en el cordón espinal a nivel cervical a los 5 días postinoculación, además, se ha identificado antígeno viral en regiones cervical, torácica y lumbar del cordón espinal a los 7 días posteriores a la inoculación. Así mismo, se han logrado aislamientos virales a partir de nódulos linfáticos (bronquial, mesentérico y parótido), ovarios y testículos y se ha determinado que la mayoría de los aislamientos virales en infecciones experimentales se realizan entre 3 y 7 días después de la inoculación (Allan y cols., 1996).

Los estudios de excreción viral indican que el tracto respiratorio y urinario son las vías más importantes para la diseminación del virus LPM, ya que, ha sido posible el aislamiento viral utilizando isopos nasales y a partir de fluidos corporales como orina y heces (Allan y cols., 1996). La susceptibilidad de cerdos neonatos al rubulavirus LPM parece tener relación con la especificidad del virus por su receptor celular. Se ha demostrado una amplia distribución de sialil α 2,3lactosa en el SNC de cerdos de diferentes edades en comparación con otros órganos (Vallejo y cols., 1998, enviado), este residuo sialil α 2,3 lactosa es un componente importante del receptor viral, y al parecer esta molécula sacarídica es determinante en el tropismo celular (Reyes-Leyva y cols., 1997).

FIG. 1 Lechón inoculado con el virus LPM donde se muestra incorrdinación motora

TABLA 1.- CORRELACION HISTOPATOLOGICA Y PRESENCIA DE AZUCARES DE ACUERDO A LA EDAD DEL CERDO

LECTINA	ESPECIFICIDAD (n)	LECHON		LESIONES	ADULTO	
		MAA	SNA		MAA	SNA
TEJIDO	LESIONES	Neuα2,3Gal	Neuα2,6Gal		Neuα2,3Gal	Neuα2,6Gal
Tálamo	Encefalomiелitis; gliosis multifocal;	++	+		+	++
Corteza c.	inflamación perivascular linfocitaria;	+++	-		-	+
Cerebro m.	neuronofagia, necrosis neuronal y	+	++		+	++
Cerebelo	glial, cuerpos de inclusión intracito-	+++	++		+	+++
Puente	plasmicos en neuronas.	++	++		+	-
Médula o.		++	+		+++	+++
Meninges	Inflamación	++	+		++	+
Cordón						
espinal c.		-	-		+#	-
Riñón		++	+++		+++	++
Testículo		+++	+	Degeneración tubular; infiltrado inters. de células mn.	++	++
Epidídimo		+	-	Granulomas espermáticos, degeneración ductular y necrosis; fibroplastia intersticial; infiltrado inters. de células mn.	+++	+

Análisis de histoquímicas realizadas con las lectinas que reconocen Neuα2,3Gal y Neuα2,6Gal. Las cruces indican la intensidad en el reconocimiento. Tomado de Vallejo, 1998, enviado; Ramírez, 1997.

MAA.- (*Maackia amurensis*); SNA.- (*Sambucus nigra*); Neuα2,3Gal.- Sialilα2,3Galactosa; Neuα2,6Gal.- Sialilα2,6Galactosa *- Pocas células; mn.- mononucleares

EL RUBULAVIRUS PORCINO LPM (Rvp LPM)

Los viriones del rubulavirus porcino LPM son pleomórficos, usualmente de forma esférica y algunas veces filamentosa, miden aproximadamente 150-300 nm de diámetro, poseen una densidad en sacarosa de 1.18-1.20 g/cm³ y son muy sensibles al calor, solventes de lípidos, detergentes no iónicos, formaldehído y agentes oxidantes (Lamb y Kolakofsky, 1996). Estos virus poseen una envoltura lipídica que se encuentra rodeando a la nucleocápside viral y constituye el 20-25% del peso del virión, además, se deriva de la membrana plasmática de la célula hospedero. En su superficie se expresan dos glicoproteínas denominadas hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y proteína de fusión (F) cuyos pesos moleculares son de 66 y 59 kDa respectivamente, se encuentran formando homo-oligómeros dispuestos en proyecciones parecidas a espículas que miden de 8-12 nm de largo (Lamb y Kolakofsky, 1996). Al igual que las hemaglutininas de otros virus envueltos, la proteína HN de este rubulavirus está anclada a la membrana viral a través de la porción amino terminal. Esta forma de anclaje ha sido sugerida por otros autores en el caso de otros paramixovirus (Thompson y cols., 1988). El Rvp LPM posee también una proteína de membrana no glicosilada denominada proteína de matriz (M) que tiene un peso molecular de 40 kDa que se encuentra asociada a la cara interior de la envoltura lipídica, donde contribuye en el ensamble de los viriones (Lamb y Kolakofsky, 1996).

La nucleocápside viral posee simetría helicoidal y consiste de una molécula sencilla de RNA de cadena negativa lineal no infecciosa y tres proteínas asociadas, denominadas nucleoproteína (NP), fosfoproteína (P) y una RNA polimerasa (L) mismas que, conforman la maquinaria replicativa del virus. Estas proteínas poseen un peso molecular de 68, 52 y 200 kDa respectivamente (Sundqvist y cols., 1991), de esta manera, el genoma constituye cerca del 0.5% del peso del virión. La identificación y comparación de las secuencias deducidas de las proteínas estructurales del virus LPM ha revelado una alta homología en la secuencia de aminoácidos con los virus Símico 5 y el virus de la Parotiditis humana (Sundqvist y cols., 1992). Estos datos han permitido reclasificar al virus LPM en un nuevo género de la familia Paramyxoviridae llamado Rubulavirus (Rima y cols., 1995).

TABLA 2.- CLASIFICACION DEL RUBULAVIRUS PORCINO

FAMILIA PARAMYXOVIRIDAE

Subfamilia Paramyxovirinae

Género

Paramixovirus	Virus parainfluenza bovino -3 (BPIV-3)	Virus parainfluenza humano-1(HPIV-1)
	Virus parainfluenza humano-3 (HPIV-3)	Virus Sendai (M PIV-1)
	Virus parainfluenza simico-10 (SPIV-10)	

Morbillivirus	Virus del moquillo canino (CDV)	Virus del moquillo del delfin (DMV)
	Virus del sarampión (MeV)	Virus de la peste de rumiantes pequeños (PPRV)
	Virus de la peste bovina (RPV)	
	Virus del moquillo de la foca (PDV)	Virus del moquillo de la marsopa (MMV)

Rubulavirus	Paramixovirus aviario 2-9, (APMV)	Virus de la Parotiditis
	Virus parainfluenza humano 2 (HPIV-2)	Rubulavirus porcino LPM
	Virus parainfluenza humano 4a (HPIV-4a)	Virus parainfluenza simico 5 (SV-5)
	Virus parainfluenza humano 4b (HPIV-4b)	Virus parainfluenza simico 41 (SV 41)
	Virus de la enfermedad de Newcastle paramixovirus aviario 1 (NDV) (APMV-1)	

Subfamilia Pneumovirinae

Pneumovirus	Virus sincitial respiratorio bovino (BRSV)	Virus pneumónico del ratón (PVM)
	Virus sincitial respiratorio humano (HRSV)	Virus de la rinotraqueitis del pavo (TRTV)

TABLA 3.- PROTEINAS ESTRUCTURALES DEL RUBULAVIRUS PORCINO

PROTEINA	PESO MOLECULAR (Kda)	FUNCION
Hemaglutinina-		
Neuranimindasa (HN)	66	Unión a receptores celulares
Proteína de fusión (F)	59	Participa en la fusión de las membranas viral y celular durante la penetración del virión
Proteína de matriz (M)	40	Involucrada en el ensamble viral y la liberación de viriones
Proteína de alto peso molecular (L)	200	Proteína con función de RNA polimerasa
Proteína pequeña (P)	52	Proteína que regula la transcripción
Proteína de la nucleocápside (NP)	68	Proteína estructural que conforma a la nucleocápside

Las glicoproteínas virales están involucradas en las interacciones primarias entre el virión y la célula blanco, es decir, la adsorción a la superficie celular (Marsch and Helenius, 1988) la cual es un requisito para la infección viral (Tardieu, 1982; Choppin and Scheid, 1980) y la penetración del virión o del genoma viral (Marsch and Helenius, 1988) mediante un proceso de endocitosis o de fusión con la membrana celular (Sharpe y Fields, 1985). Las interacciones entre proteínas virales de superficie y los receptores sobre las células blanco determinan el tropismo viral. Algunos constituyentes de la membrana celular como: carbohidratos, lípidos y proteínas pueden ser un receptor viral (Ubol and Griffin, 1991). En algunos virus existe más de una molécula que actúa como receptor, los receptores celulares también pueden consistir de más de un componente, por ejemplo, el receptor para el virus de la polio involucra un complejo de proteínas que interactúan en una vía de transducción de señales (Roizman and Palese, 1996). Otros estudios enfocados al reconocimiento del virus Sendai sobre la porción sacarídica del posible receptor han demostrado que los residuos de ácido siálico son esenciales para el papel como receptor tanto en glicolípidos como en glicoproteínas celulares (Wybenga y cols., 1996).

En el caso del virus LPM al igual que en otros paramixovirus el reconocimiento del virión a la célula hospedero también es mediado por la proteína HN a la cual se le han atribuido dos actividades biológicas diferentes que incluyen la unión del virus a receptores que contienen ácido siálico con enlace α -2,3lactosa en las células hospedero (Reyes Leyva y cols., 1993) y la actividad de neuraminidasa en la misma proteína; así como, la aglutinación de eritrocitos de diferentes especies y posiblemente un papel importante en la fusión celular (Stephano y cols., 1988; Moreno-López y cols., 1986). La actividad de sialidasa también juega un papel clave en el ciclo viral de los paramixovirus. Cuando la penetración no se lleva a cabo, el virus puede detectar y adsorberse a una célula diferente, eliminando los residuos de ácido siálico de las glicoproteínas de envoltura con ayuda de la neuraminidasa (Roizman y Palese, 1996) facilitando así la propagación en el hospedero (Villar y Cabezas, 1993).

Recientemente se ha demostrado mediante la expresión de proteínas HN quiméricas y recombinantes, que la actividad de fusión de la mayoría de los paramixovirus requiere coexpresión de una proteína F y de una HN derivada del mismo tipo viral (Wild y cols., 1991; Moscona y Peluso, 1992; Tanaka y cols., 1996; Tanabayashi y Compans, 1996). Al parecer se requiere de una región que incluye solo 82 aminoácidos en el dominio extracelular adyacente al dominio transmembranal de la proteína HN como parte importante para la interacción con la

proteína F para promover la fusión celular. (Tanabayashi y Compans, 1996). Por otro lado, se ha determinado que la glicoproteína HN interacciona con la proteína M y al parecer esta interacción promueve la gemación de partículas virales (Villar y Cabezas, 1993).

TABLA 4.- PESOS MOLECULARES RELATIVOS DE LA PROTEINA HN EN EL GENERO RUBULAVIRUS

VIRUS				
PROTEINA	RvpLPM	NDV	PAROTIDITIS	PI-5
HN	66	72	79	71

En esta tabla se comparan los pesos moleculares de la proteína HN de los miembros del género Rubulavirus. Los pesos moleculares están expresados en KDa. Tomado de Sundvist y cols., (1990).

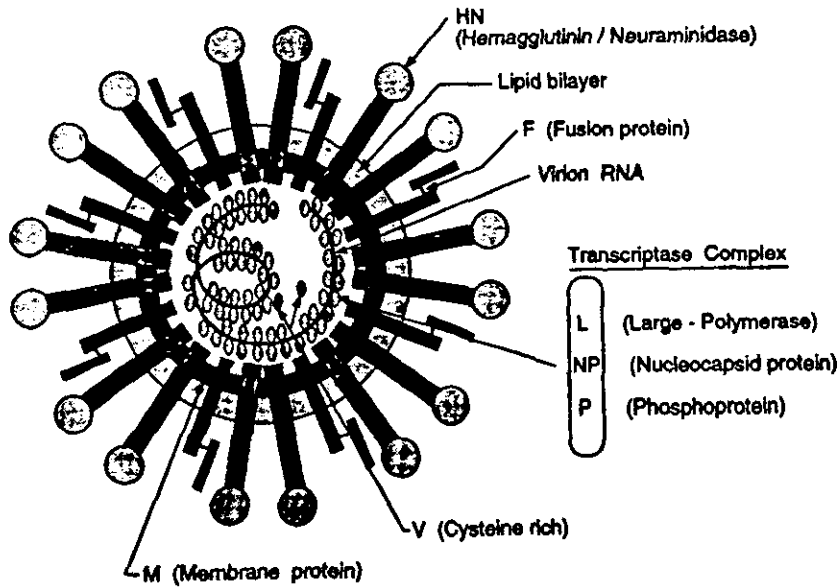
Después de la unión a los receptores celulares, los paramixovirus fusionan su envoltura con la membrana plasmática de la célula hospedero mediante la participación de la proteína F, este proceso ocurre a pH neutro. La proteína F es sintetizada como precursor (Fo) y se activa intracelularmente mediante su ruptura por proteasas celulares produciendo dos subunidades activas F1 y F2 unidas por un enlace disulfuro (aminoF2-S-S-F1 carboxilo), (Thompson y cols.,

1988). La participación de la proteína F del virus LPM en el proceso de penetración viral en la célula blanco conduce a otros procesos tales como la lisis de eritrocitos y la fusión celular que da origen a la formación de sincicios en tejidos y líneas celulares (Moreno-López y cols., 1986; Stephano y cols., 1988). Posteriormente se sintetizan nuevas glicoproteínas que se acumulan en la membrana celular resultando en fusión con las células vecinas y en la producción de sincicios. Así la infección puede pasar de una célula a otra sin necesidad de producir partículas virales completas (Wild y cols., 1991).

La replicación viral ocurre en el citoplasma de la célula y parece ser independiente de las funciones nucleares del hospedero. El genoma se transcribe progresivamente del extremo 3' mediante enzimas asociadas al virion (Thompson y cols., 1988), en el caso del virus LPM las proteínas participantes son la fosfoproteína (P) y una RNA polimerasa (L) dependientes de RNA (Sundqvist y cols., 1990). La transcripción del genoma viral es el primer evento después de que virus se disoció en proteínas que permanecen en el citoplasma de la célula, este proceso produce ARNs mensajeros monocistrónicos de cadena (+), los cuales dan lugar a proteínas específicas a excepción del gen P (Roizman y Palase, 1996) este último origina tres productos P, V y C (Berg y cols., 1992). La replicación inicia bajo la dirección de las proteínas recién sintetizadas; se forma un filamento completo que sirve como plantilla para la síntesis de filamentos de RNAs genómicos negativos por tanto, los RNAs funcionan alternativamente como plantillas para la transcripción y replicación (Roizman y Palase, 1996).

Las nucleocápsides se ensamblan independientemente en el citoplasma y obtienen su envoltura en la superficie de la célula en sitios que contienen glicoproteínas virales; donde por un proceso de gemación son liberados los viriones maduros (Avalos y cols., 1997).

FIG.-1 DIAGRAMA ESQUEMATICO DE UN PARAMIXOVIRUS



Aquí se muestra el esquema clásico de un paramixovirus. Insertadas en la membrana lipídica se encuentran las glicoproteínas virales. La proteína HN (proyecciones redondas) que incluye dos actividades biológicas, la de hemaglutinina y la de sialidasa y la proteína F (proyecciones intercaladas) encargada de la fusión viral con su célula blanco. La proteína M (circunferencia interior) interacciona con las glicoproteínas de envoltura. La maquinaria replicativa viral compuesta por las proteínas L, NP, P (óvalos) y V que es un producto del gen P (óvalos negros) se muestran asociadas al genoma helicoidal compuesto exclusivamente por RNA de cadena sencilla. Tomado de Lamb y Kolakofsky, (1996).

Se sabe que la proteína M de los paramixovirus participa mediando interacciones entre las glicoproteínas de la membrana plasmática, el complejo de ribonucleoproteína y el citoesqueleto de la célula hospedero durante el ensamble y gemación de los virus (Berg y cols., 1991; Avalos y cols., 1997) y la modificación de la función de la proteína F (Peeples and Brantt, 1984).

JUSTIFICACION

La Enfermedad del ojo azul provoca la muerte de cerdos neonatos y problemas de esterilidad en animales adultos, lo que representa pérdidas económicas para los porcicultores. Se han realizado muchos estudios sobre las actividades biológicas de las hemaglutininas virales, sin embargo, en el caso del Rvp LPM la parte estructural no es bien conocida y solo se hace referencia a las hemaglutininas virales reportadas. Consideramos que la proteína HN es el determinante de infección con la célula blanco y que mediante el conocimiento de sus características fisicoquímicas obtendremos datos acerca de su participación en el proceso de infección de su hospedero natural. Por tanto nos dimos a la tarea de purificar y caracterizar a la proteína HN del Rvp LPM ya que a través de la caracterización de dicha proteína se propondría a mediano plazo una vacuna que permita el control efectivo y la erradicación de la enfermedad.

OBJETIVO GENERAL

a) Determinar las propiedades fisicoquímicas de la proteína Hemaglutinina-Neuraminidasa del rubulavirus porcino, cepa La Piedad Michoacán (Rvp LPM)

Objetivos particulares :

- 1.- Establecer un método de purificación de la proteína HN que mantenga sus propiedades biológicas
- 2.- Identificar las propiedades fisicoquímicas de la proteína HN tales como : peso molecular, punto isoeléctrico, composición de azúcares, composición y secuencia de aminoácidos
- 3.- Determinar la especificidad de la glicoproteína HN por estructuras sacarídicas

MATERIAL Y METODOS

Métodos generales

Reactivos.- Neuraminidasa de *Vibrio cholerae*, Suero fetal bovino (SFB), lectinas de MAA (*Maackia amurensis*) y SNA (*Sambucus nigra*), isotiocianato de fluoresceína (FITC) y de rodamina (TRIC) se obtuvieron de Sigma Chemicals, U.S.A. Los antibióticos tunicamicina, deoxinojirimicina y deoximanojirimicina se obtuvieron de Boehringer-Mannheim Biochemica, Alemania. Medio esencial de mantenimiento de Eagle (MEM), tripsina de páncreas bovino fue obtenido de Gibco, BRL, USA.

Virus.- Se utilizó al rubulavirus porcino LPM (La Piedad Michoacán/1985), donado por el Dr. Jorge Moreno López de la Universidad de Uppsala, Suiza; adaptado a cultivos celulares Vero (pase-10). Las alícuotas del virus permanecieron en congelación a -70 °C hasta su uso.

Cultivo celular.- Se utilizaron cultivos celulares de riñón de mono verde africano (Vero) las cuales se cultivaron en botellas de 25 y 75 cm² en medio mínimo esencial (MEM) (Gibco) suplementado con suero fetal bovino (SFB) (Sigma Chem St. Louis MO., USA) al 10 % y una mezcla de penicilina-estreptomicina 100 UI y 100 µg/ml respectivamente. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en atmósfera de CO₂ 5% y ambiente húmedo.

Titulación viral.- El virus se tituló mediante la técnica de UFP/ml (Unidades formadoras de placa/ml) en cultivos celulares Vero. Se prepararon diluciones logarítmicas de un sobrenadante de cultivo celular infectado en pase ciego con el Rvp LPM (LPM/1985), con un título hemaglutinante de 16 UH/ml. En una placa de 96 pozos se sembraron 2X10⁵ células/ml en medio MEM con SFB al 10%. Transcurridas 24 h se lavaron con PBS (amortiguador de fosfatos) 0.15 M, pH 7.4 (Na₂HPO₄ 0.008 M, KH₂PO₄ 0.0015 M, NaCl 0.13 M, KCl 0.0027 M, pH 7.4) y se inocularon con 0.1 ml / pozo de cada dilución. Se utilizó como testigo negativo una serie de pozos sin inocular. Se realizaron ocho repeticiones por dilución. Luego la placa se incubó durante 30 min, a temperatura ambiente y en agitación suave. Transcurrido este tiempo se retiró el exceso de inóculo y los monoestratos se lavaron con PBS 3 veces, se adicionaron 300 µl de una solución estéril de MEM / dimetilcelulosa 1% y se incubaron a 37°C, en atmósfera de CO₂ al 5%, en

ambiente húmedo durante 72 h. Transcurrido este tiempo se realizaron lavados con PBS para retirar el medio de inmovilización y se contó el número de placas por pozo. El resultado se expresa como el inverso de la máxima dilución donde se halló una placa/ml.

Replicación viral.- Botellas de 25 cm² de cultivos confluentes de células Vero se lavaron con PBS dos veces y se inocularon con 0.5 ml de virus LPM con un título de 1.3×10^{-6} UFP/0.1 ml, se incubaron a temperatura ambiente, en agitación lenta durante 30 min. Transcurrido este tiempo se retiró el exceso de inóculo y se realizaron lavados con PBS, se adicionó medio de cultivo MEM/penicilina-estreptomicina 100 UI y 100 µg/ml sin SFB. El virus se cosechó en el momento de máximo efecto citopático (72 y 96 h) sometiénolo a choque térmico (-70°C a 37°C). Los sobrenadantes fueron clarificados por centrifugación a 3,200 rpm para eliminar detritos celulares y una vez clarificados fueron titulados mediante prueba de hemaglutinación y congelados a -70°C hasta su uso.

Actividad hemaglutinante.- Esta determinación se realizó de acuerdo al método de Osawa y Matsumoto, (1972). Se utilizaron eritrocitos humanos obtenidos del Banco de sangre, Centro Médico SIGLO XXI, IMSS. También se utilizaron eritrocitos de animales de diferentes especies los cuales fueron obtenidos del bioterio de la Unidad de Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). En una placa de 96 pozos de fondo en U se agregan 25 µl de amortiguador de fosfatos (PBS pH 7.4, 0.15 M), se adicionaron 25 µl de sobrenadante de células infectadas y se realizaron diluciones dobles seriadas. Posteriormente se agregan 50 µl de una solución de eritrocitos al 1% y se deja reposar a temperatura ambiente. Se incluye un testigo negativo que consta solo de PBS y eritrocitos al 1%. La placa se lee en el momento en que los eritrocitos en los pozos control hayan sedimentado. El resultado se reporta en unidades hemaglutinantes (UHA) que es el inverso de la máxima dilución donde se aprecia aglutinación.

Digestión enzimática de eritrocitos.- Se utilizaron eritrocitos humanos A₁,A₂, B,O los cuales fueron obtenidos del Banco de sangre, Centro Médico SIGLO XXI, IMSS. También se utilizaron eritrocitos de diferentes especies obtenidos del Instituto Nacional de enfermedades respiratorias. Los eritrocitos fueron tratados con neuraminidasa (0.1 U de neuraminidasa de *V. cholerae* / 0.5 ml de paquete de eritrocitos a 37°C durante 30 min). Así mismo, se utilizaron eritrocitos tratados con tripsina (100 µg / 0.5 ml de paquete eritrocitario e incubados a 37°C durante 30 min).

Concentración de proteína.- Esta prueba se realizó de acuerdo al método de Bradford, (1976) modificado para microvolúmenes. En una placa de ELISA se realizó una curva de calibración con un estándar de albúmina sérica bovina (BSA) de 500 $\mu\text{g/ml}$, colocando cantidades crecientes del estándar (0, 1, 2, 3, 4, 5 $\mu\text{g/ml}$), se adicionaron los volúmenes necesarios para ajustar a 10 μl /pozo con agua desionizada. En otro pozo se adicionaron 5 μl /pozo de la muestra problema y se ajustó a 10 μl /pozo con agua desionizada. Posteriormente se agregaron 200 μl de reactivo de Bradford (ácido ortofosfórico 8.5%, concentración final, azul de Coomassie G-250 1%, concentración final, etanol absoluto 5 % concentración final), por pozo. La lectura se realizó a los 10 min en un lector de ELISA a 620 nm.

Purificación de la proteína HN del virus LPM

Concentración viral.- Los sobrenadantes de cultivos celulares infectados con el virus LPM fueron clarificados por centrifugación a 3,200 rpm. El virus fue concentrado mediante precipitación de sobrenadantes con polietilenglicol (PEG, P.M., 8,000) al 10% p/v durante 3 h, en agitación lenta y constante a 4°C. Posteriormente se centrifugaron a 3,500 rpm durante 20 min, 4°C, el sobrenadante fue eliminado y el precipitado se resuspendió en 5 ml de buffer TEN (Tris-HCl 0.01 M, EDTA 0.001 M, NaCl 0.1M) pH 7.4 para ser dializado posteriormente durante 24 h a 4 °C

Estandarización del proceso de separación de la proteína HN por sonicación.- Se utilizaron alícuotas de 1 ml de virus LPM completo, purificado a través de gradientes de densidad con sacarosa de 30-60% con un título de 64 UH. La muestra fue dializada contra buffer TEN, pH 7.4. La muestra de virus fue colocada en un tubo de vidrio en baño de hielo y sonicada. Se utilizó una frecuencia de 14 Hz (amplitud micrones). Inicialmente se aplicaron dos pulsos con una duración de 15 seg. cada uno y un intervalo de descanso de 30 seg., entre cada pulso. Posteriormente se aplicaron otros 9 pulsos a la muestra bajo las mismas condiciones anteriormente descritas. Se tomaron alícuotas de 50 μl y se les determinó actividad aglutinante a los 2, 5, 7, 9 y 11 pulsos.

Separación de la proteína HN por sonicación.- Se utilizaron las alícuotas del virus LPM completo, purificado a través de gradientes de densidad con sacarosa de 30-60% con un título de 64 UH. La muestra fue dializada contra buffer TEN, pH 7.4. La muestra de virus fue colocada en un tubo de vidrio en baño de hielo y sonicada. Se utilizó una frecuencia de 14 Hz (amplitud micrones). Se aplicaron 5 pulsos de 15 seg. de duración cada uno y un intervalo de descanso de 30 segundos entre cada pulso. Se tomaron alícuotas de 50 µl y se les determinó actividad aglutinante.

Aislamiento de la proteína HN por ultracentrifugación en gradiente de densidad.- El precipitado obtenido durante la concentración viral se sometió a un proceso de sonicación como se describe arriba. Esta mezcla fue ultracentrifugada a 100,000 g durante 4 h a 4° C en un gradiente discontinuo de sacarosa de 30% a 60%, luego se colectaron fracciones de 1 ml y se les determinó actividad hemaglutinante (Osawa y Matsumoto, 1972), con eritrocitos humanos A₂ y concentración de proteína (Bradford, 1976). Las fracciones con actividad aglutinante se dializaron durante 24 h a 4°C en buffer TEN y luego contra agua desionizada. Una vez dializadas las fracciones se les determinó nuevamente actividad aglutinante y fueron liofilizadas para utilizarse en ensayos posteriores.

Purificación de la proteína HN mediante cromatografía de intercambio iónico.- Las fracciones con actividad aglutinante purificadas por gradiente de densidad fueron resuspendidas en buffer bis-tris/ácido imidoacético 0.025 M pH 7.1, se utilizó una columna de intercambio iónico (Mono P, Pharmacia) en un equipo de FPLC, la muestra fue eluida con un gradiente de NaCl 1 M a una presión de 2.5 ml / min. Se colectaron fracciones de 1 ml que se leyeron a 280 nm en un espectrofotómetro. Las fracciones purificadas fueron utilizadas en otros ensayos tales como composición de carbohidratos, composición y secuencia de aminoácidos.

Electroforesis en geles de poliacrilamida.- Esta determinación se realizó para evaluar el grado de pureza y para determinar el peso molecular de la proteína HN. Las fracciones con actividad aglutinante obtenidas del gradiente de densidad se utilizaron en este ensayo. Los geles fueron preparados para electroforesis en condiciones desnaturalizantes, de acuerdo al método de Laemli (1970). Se utilizaron geles de poliacrilamida al 10 % y 12.5 %, buffer separador (Tris - base 1 M pH 8.8), SDS 0.24 % vol. final, Temed (C₆H₁₆N₂, N,N,N,N - Tetrametiletildiamina 0.012 %, Persulfato de amonio (NH₃SO₄) 0.0018 %. Las muestras se diluyeron en proporción 1: 1 con

buffer de muestra (Tris - HCl, 100 mM, pH 6.8, SDS 2%, Glicerol 20% y B- mercaptoetanol 5% concentración final) y fueron calentadas a ebullición durante 5 minutos. El corrimiento electroforético se llevó a cabo durante 2 h a 150 V. Una vez finalizado el corrimiento, los geles fueron teñidos con solución de tinción de Coomasie (metanol al 50 %; ácido acético al 10 %; azul de Coomasie R-250 al 0.1 % concentración final) y tinción de plata en algunos casos.

Tinción de plata.- Los geles obtenidos en las electroforesis fueron fijados con una solución de ácido acético isopropanol al 10 %, durante 20 min., luego en una solución de isopropanol al 10 % 20 min y finalmente con una solución de glutaraldehído al 3.5 % durante 1 h. Transcurrido este tiempo se lavan los geles exhaustivamente con agua desionizada. Para teñir se utiliza una solución de NaOH 0.097 %, AgNO₃ 0.5 %, NH₃OH 1.5 % en agua desionizada. Esta solución se adiciona y se mantiene en agitación suave durante 30 min. El revelado se realiza con una solución de 500 µg /100 ml ácido cítrico/50 µl paraformaldehído al 37 % por cada 100 ml de solución de revelado. La reacción se detiene con una solución de ácido acético al 10% (Oakley y cols., 1980) o bien calentando en microondas a máxima potencia.

Caracterización de las propiedades fisicoquímicas de la glicoproteína HN

Peso molecular.- Esta característica se determinó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes y no desnaturizantes de acuerdo al método de Laemli (1972). Las fracciones con actividad aglutinante obtenidas del gradiente de densidad se utilizaron para este ensayo. Se utilizaron geles de poliacrilamida al 10 %, buffer separador (Tris-base 1 M pH 8.8), SDS 0.24 % vol. final, Temed (C₆H₁₆N₂, N,N,N,N-Tetrametiletilendiamina 0.012 %, Persulfato de amonio (NH₃SO₄) 0.0018 %. Las muestras se diluyen en proporción 1 : 1 con buffer de muestra (Tris - HCl, 100 mM, pH 6.8, SDS 2%, Glicerol 20% y β-mercaptoetanol 5% volumen final) y fueron calentadas a ebullición durante 5 minutos. Se utilizaron marcadores de alto y bajo peso molecular (Sigma Chem. St Louis MO, USA). El corrimiento electroforético se llevó a cabo durante 2 h a 150 V.

Determinación del punto isoelectrico teórico.- La determinación del pI se realizó a través de una base de datos en el programa ExPASy Server. Este programa se basa en la utilización de valores de pK de los aminoácidos descritos en Bjellqvist y cols., (1993, 1994), estos fueron definidos por la migración de polipéptidos en un gel en gradiente de pH de 4.5 a 7.3 con 9.2 M y 9.8 M de urea a 15° C ó 25° C.

Determinación del punto isoelectrico experimental.- Esta determinación se realizó en un equipo de isoelectroenfoque preparativo (Rotofor) (Bio-Rad IEF cell). Para la formación del gradiente de pH se utilizaron anfolinas de un rango de 3.5 - 10.5 y de 8 - 12 (Pharmacia). Se utilizó como buffer ácido fosfórico, este se mezcló con las anfolinas en una concentración final de 2% y glicerol al 10% para obtener un volumen de 60 ml. Esta mezcla se dejó focalizar durante 1 h para lograr la formación del gradiente de pH a 15 mA o bien 12 W. Una vez transcurrido este tiempo se inyectaron 5 ml de las fracciones purificadas por el gradiente de densidad cuya concentración de proteína fue de 460 µg/ml y se dejó correr durante 4 h. Al finalizar este tiempo se recuperaron fracciones de 3 ml cada una del gradiente de pH mediante succión con vacío. Se determinó el pH en cada una de las fracciones con un microelectrodo. Posteriormente, a cada fracción se le agregó NaCl y se dejó reposar toda la noche a 4°C para luego dializar exhaustivamente cada fracción contra una dilución 1:100 de buffer TEN pH 7.5. Una vez dializadas estas muestras se les determinó actividad aglutinante, concentración de proteína y se realizó electroforesis en condiciones desnaturalizantes según el método de Laemmli (1972).

Isoelectroenfoque de la proteína HN en gel.- Esta determinación se realizó en un equipo de isoelectroenfoque en gel (Mini IEF cell mod. 111; BioRad). Se utilizaron anfolinas den un rango de pH de 3 a 10 (Byo-Lyte 3/10; Sigma) y marcadores de punto isoelectrico conocido (Anhidrasa carbónica, α-lactoalbúmina, lisozima, albúmina). Se preparó un gel de 0.9 mm de grosor al 7.5 % de una mezcla de monómeros (acrilamina-bisacrilamida-glicerol 30 / 0.8 / 25 % respectivamente). Después de 30 min. de polimerizado el gel se colocaron 3 µl de cada muestra / pozo y se dejaron absorber otros 30 min. a temperatura ambiente en cámara húmeda (las muestras se colocan en la parte central del gel). Ya absorbidas las muestras el gel se puso en contacto directo con los electrodos de la cámara y se inició la corrida, aplicando 100 V durante 15 min; luego se incrementó el voltaje aplicado 200 V durante otros 15 min y finalmente 1h a 450 V. Al término de este tiempo se retiró el gel, se sumergió en una solución fijadora (ácido sulfosalicílico 4 % - ácido tricloacético 12.5 % - Metanol 30 %) de 30 a 45 min en agitación

suave. La tinción del gel se realizó con azul de Coomasie (Isopropanol 27 %- ácido acético 10 %, azul de Coomasie R-250 al 0.04 %-CuSO₄ 0.5 %) toda la noche en agitación suave. El exceso de colorante fue eliminado con tres cambios de una solución de isopropanol al 12 %-ácido acético al 7 %- CuSO₄ 0.5 % y otros 2 cambios de una solución de isopropanol al 25 %- ácido acético al 7 % en agitación suave.

Composición de carbohidratos.- Este ensayo se realizó mediante cromatografía de gases, de acuerdo al método de Montreuil y cols., (1986). Se utilizó la muestra purificada por cromatografía de intercambio iónico, la cual se sometió a un proceso de hidrólisis con metanol/HCl 5N durante 24 h a 100°C. La muestra se dejó enfriar y se neutralizó con AgNO₃ pH 6.0. Posteriormente se reacetiló la muestra con anhídrido acético en oscuridad absoluta durante toda la noche y se realizó una extracción de ácidos grasos con heptano. La muestra se secó con una corriente de N₂, posteriormente se resuspendió en piridina y se realizó la derivación de los alditoles liberados con ácido trifluoroacético. El análisis de los derivados trifluoro-acetil alditoles se realizó en un cromatógrafo de gases Mod. Varian 2100 (Orsay, France) equipado con un detector de flama y un inyector de vidrio sólido; utilizando meso-inositol (Sigma Chemical) como estándar interno en una columna (25 m x 0.32 mm; 0.5µm de diámetro interno) al 5 % de Silicona OV 210 (Applied Science Laboratories, Buffalo NY). Como gas transportador se utilizó Helio a una presión de 0.6 bar y la temperatura del horno se programó de 150° a 250 °C a 3°C/min. Esta determinación se realizó en la Universidad de Ciencias y Tecnologías de Lille, Francia.

Composición de aminoácidos.- La fracción purificada por cromatografía de intercambio iónico se dializó exhaustivamente contra agua desionizada y se sometió a hidrólisis en vacío con HCl 5 N a 110°C en tubos sellados herméticamente, durante 24, 48 y 72 h. Las muestras fueron examinadas en un analizador automático de aminoácidos Mod. Durrum 500 de acuerdo al método de Bidlingmeyer y cols., (1984), utilizando norleucina como estándar interno. Esta determinación se realizó en la Universidad de Ciencias y Tecnologías de Lille, Francia.

Secuencia de aminoácidos.- Para esta determinación se utilizó la fracción purificada por cromatografía de intercambio iónico y dializada exhaustivamente contra agua desionizada. Se determinó la porción amino terminal con una longitud de 8-10 residuos mediante la derivación de Edman en un secuenciador automático de aminoácidos Beckman LF 3000 (Beckman Manual de

procedimientos. Esta determinación se realizó en la Universidad de Ciencias y Tecnologías de Lille, Francia.

PAPEL DE LOS CARBOHIDRATOS EN LA INFECTIVIDAD VIRAL

Trabajos realizados en nuestro laboratorio han demostrado la capacidad de algunos azúcares como : ácido N-acetilneuramínico (Neu Ac), para disminuir la capacidad del virus LPM para formar sincicios y α 2,3 sialil lactosa que inhibe completamente la infectividad viral del virus sobre las células Vero. Esto indicó que 2,3 sialil lactosa forma parte de la molécula que actúa como receptor celular para el virus. En base a esto, decidimos determinar la relevancia en la expresión de azúcares sobre la superficie celular como determinante de infección.

Ensayos de especificidad viral

Determinación de infectividad viral.- Esta se realizó en células Vero, debido al efecto citopático inducido por el virus LPM que consiste en la formación de sincicios. Monoestratos celulares Vero fueron inoculados con virus LPM con un título de 1000 Unidades formadoras de sincicios/ml (UFS/ml). Transcurrida una hora las células fueron lavadas con PBS pH 7.2 para retirar el exceso de inóculo. Después de 96 h de incubación a 37°C en ambiente húmedo y atmósfera de CO₂, las células infectadas se fijaron con metanol al 70 % y fueron teñidas con colorante de May-Grünenwald-Giemsa (MGG) para cuantificar la formación de sincicios. La infectividad viral se determinó por el número de sincicios encontrados en 10 campos.

Efecto de los inhibidores de la glicosilación sobre la infectividad viral.- Para determinar que la expresión de azúcares es importante en el proceso de infección, los cultivos celulares Vero se sometieron al tratamiento con antibióticos inhibidores de la glicosilación. Los antibióticos utilizados fueron tunicamicina, desoxinójirimicina y desoximanojirimicina. Para este ensayo se utilizaron cultivos celulares Vero los cuales fueron tripsinizados y sembrados sobre cubreobjetos de vidrio de 12 mm de diámetro (Fisher Scientific) colocados en placas para cultivo celular de 24 pozos (NUNC). Las células se sembraron en una concentración de 5×10^4 células por pozo y fueron mantenidas en MEM suplementado con SFB al 10%. Transcurridas 24 h las células fueron tratadas con diluciones seriadas de Tunicamicina (TUN), Deoxinójirimicina (DNM),

Deoximanojirimicina (DMM) disueltos en MEM, en una concentración inicial de 5 µg/ml. Después de 8 h de incubación a 37°C, se lavaron las células con PBS pH 7.2 y se inocularon con el Rvp LPM en una concentración de 1000 UFS/ml durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente los monoestratos se lavaron con PBS pH 7.2 y se mantuvieron en incubación a 37°C en MEM suplementado con SFB al 2% durante 96 h. Transcurrido este tiempo se procesaron los monoestratos para determinar infectividad viral como se describe arriba.

Efecto de Dexametasona sobre la infectividad viral.- Cultivos celulares Vero fueron tripsinizados y sembrados en cubreobjetos de vidrio de 12 mm de diámetro (Fisher), colocados en placas para cultivo celular de 24 pozos (NUNC); se sembraron 5×10^4 células por pozo e inmediatamente se trataron con diluciones seriadas de dexametasona en una concentración inicial de 10 µM. Después de 12 h de incubación a 37°C en ambiente húmedo y atmósfera de CO₂, las células se lavaron con PBS pH 7.2 y se inocularon con 1000 UFS/ml de virus LPM durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente los monoestratos se lavaron con PBS pH 7.2 y se mantuvieron en incubación a 37°C en MEM suplementado con SFB al 2% durante 96 h. Transcurrido este tiempo se determinó infectividad viral.

Citoquímica con lectinas.- Las lectinas conjugadas a Isotiocianato de fluoresceína (FITC) se prepararon de acuerdo a los procedimientos de Pierce (Pierce Handbook). Los cubreobjetos con cultivos celulares Vero fueron removidos de las placas. Las células fueron fijadas en una mezcla de cloroformo/acetona fría durante 5 min. Posteriormente se bloqueó la fluorescencia inespecífica con una solución de albúmina sérica bovina al 0.1% en PBS pH 7.2 (PBS-BSA), durante 20 min. a 4°C. Luego, las células se incubaron con las lectinas de *Maackia amurensis* y *Sambucus nigra* conjugadas a FITC 10 µg/ml durante 30 min a 37°C, posteriormente se lavaron con una solución de Tween-20 al 0.001% / PBS-BSA. Los monoestratos celulares se montaron con PBS/glicerol (v/v) sobre portaobjetos para su observación en un microscopio de fluorescencia marca Olympus. La especificidad de los controles se determinó utilizando lectinas no conjugadas a la misma concentración de proteína.

RESULTADOS

El virus LPM con un título de 1.3×10^6 UFP/0.1 ml, fue multiplicado en monoestratos confluentes de células de riñón de mono verde africano (Vero), en las que se produjo efecto citopático consistente en la fusión de un gran número de células (sincicios), que dan aspecto de grandes células multinucleadas este proceso va acompañado de lisis celular después de 72 y 96 h de postinfección (Fig 1). En este momento se cosechó el virus.

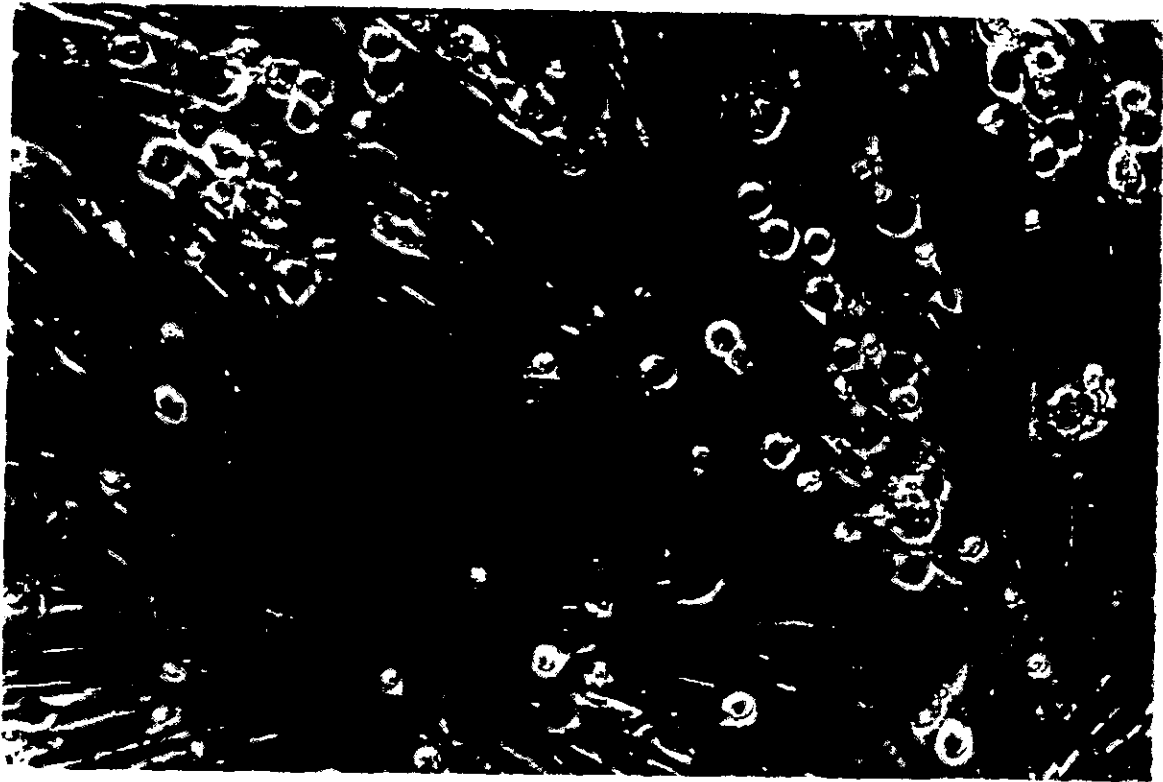


Fig. 3.- Efecto citopático consistente en la formación de numerosos sincicios y lisis celular producido por el virus LPM en cultivos celulares Vero después de 72 hr de infección.

ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DEL VIRUS LPM SOBRE ERITROCITOS DE DIFERENTES ESPECIES

Esta determinación indicó que el Rvp LPM es capaz de reconocer una gran variedad de eritrocitos de diferentes especies, aunque el mayor reconocimiento fue hacia eritrocitos humanos A₂, conejo y pollo como se muestra en la tabla 5. Por otro lado, el tratamiento de los eritrocitos con neuraminidasa inhibió totalmente la actividad aglutinante del virus; mientras que, el tratamiento con tripsina incrementó en forma general una dilución la actividad aglutinante del virus con los eritrocitos probados.

TABLA 5.- ACTIVIDAD AGLUTINANTE DEL RUBULAVIRUS PORCINO LPM

ERITROCITOS	TITULO HA	TRATAMIENTO NEURAMINIDASA	TRATAMIENTO TRIPSINA
Humano A ₁	32	(-)	ND
Humano A ₂	64	(-)	128
Humano B	16	(-)	ND
Humano O	16	(-)	ND
Cerdo	32	(-)	ND
Carnero	32	(-)	ND
Rata (wistar)	32	(-)	ND
Conejo	64	(-)	128
Cobayo	8	(-)	ND
Pollo	64	(-)	128

Solución de eritrocitos al 1%, a 25°C. Los eritrocitos fueron tratados previamente con 0.1 U de neuraminidasa de *V. cholerae* / 0.5 ml de paquete de eritrocitos. Para el tratamiento con tripsina pancreática bovina se utilizaron 100 µg / 0.5 ml de paquete a 37°C durante 30 min.

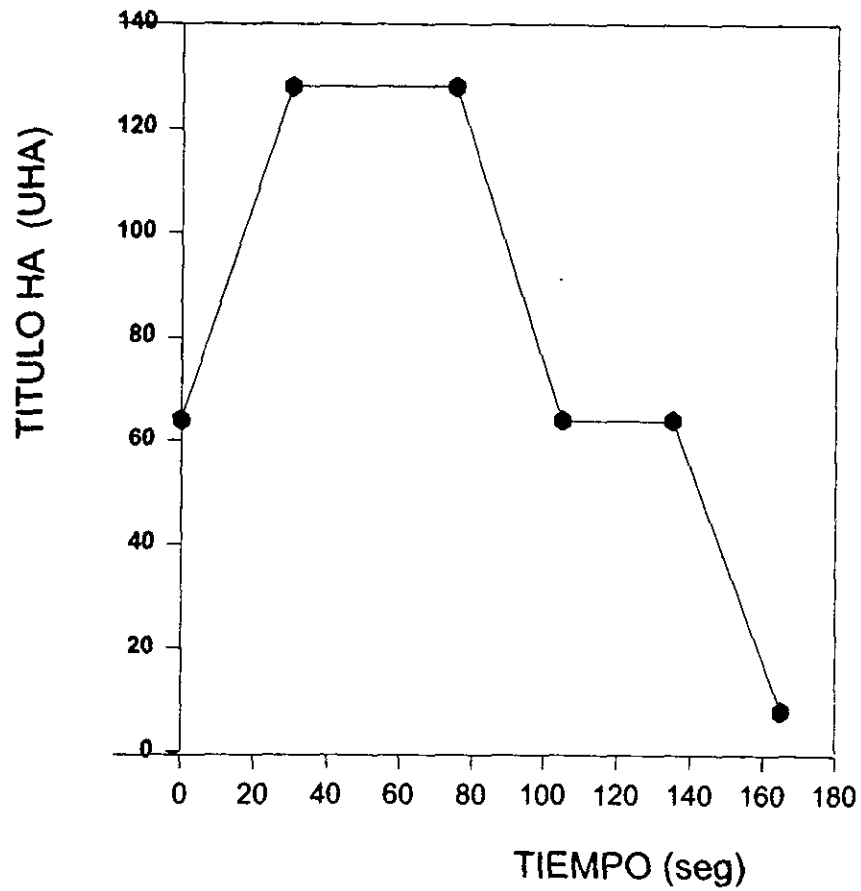
AISLAMIENTO DE LA PROTEINA HN DEL VIRUS LPM

Estandarización del proceso de sonicación.- Para la purificación de la proteína HN estandarizamos el aislamiento de dicha proteína mediante ruptura de la membrana viral por sonicación. Para esta determinación partimos de un concentrado viral con actividad aglutinante de 64 UHA/ml. Se realizó una cinética a diferentes tiempos utilizando la misma frecuencia de 14 Hz, para poder obtener el tiempo en el cual la proteína HN conserva su actividad aglutinante. Para la determinación de actividad aglutinante se utilizó una solución al 1% de eritrocitos humanos A₂ en PBS pH 7.2. Inicialmente se aplicaron 2 pulsos con una duración 15 seg. cada uno, la actividad aglutinante de la muestra se incrementó una dilución ya que fue de 128 UHA/ml. Después de la aplicación de 5 pulsos a la misma muestra con una duración de 75 seg, la muestra mantuvo su actividad aglutinante de 128 UHA/ml. Posteriormente se aplicaron 4 pulsos mas con la misma duración, la muestra tomada a los 105 seg (7 pulsos) disminuyó su actividad aglutinante a 64 UHA/ml y de la misma forma se mantuvo a los 135 seg (9 pulsos). La aplicación de dos pulsos más con la misma duración (165 seg) disminuyó la actividad aglutinante a 8 UHA/ml. De esta manera, decidimos utilizar durante purificaciones posteriores de la proteína HN las siguientes condiciones: una frecuencia de 14 Hz aplicando 5 pulsos con una duración de 75 seg, con un intervalo de descanso de 30 seg., entre cada pulso. Todo el proceso se realizó en baño de hielo.

TABLA 6. - ESTANDARIZACION DEL PROCESO DE SONICACION

Frecuencia:	14 Hz
Tiempo total de sonicado:	2.75 min.
Tiempo real del proceso:	7.75 min
Total de pulsos:	11 pulsos
Tiempo óptimo de sonicado:	30-75 seg

GRAFICA 1.- CINETICA DEL PROCESO DE SONICACION PARA EL AISLAMIENTO DE LA PROTEINA HN.



Este procedimiento nos ayudó a separar a la proteína HN de la membrana viral conservando su actividad hemaglutinante. La actividad aglutinante se determinó, con una solución de eritrocitos humanos A₂ al 1% a temperatura ambiente.

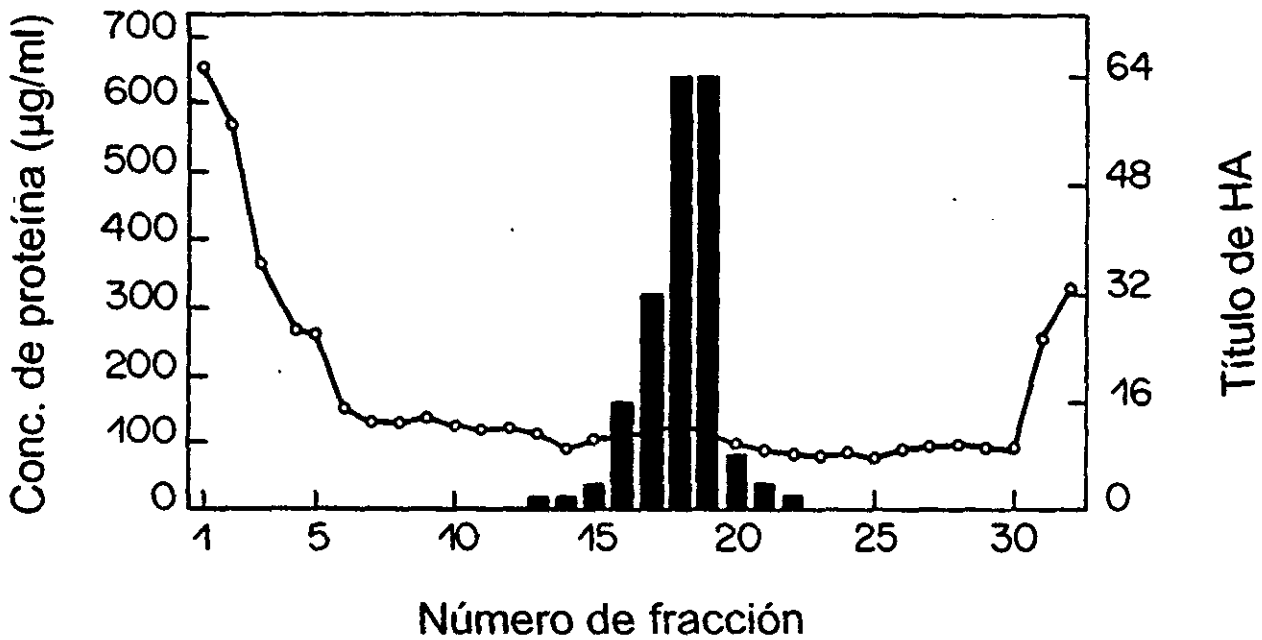
TABLA 7.- TITULO HEMAGLUTINANTE DE LA PROTEINA HN AISLADA POR SONICACION

TIEMPO (seg)	TITULO HA (UHA)	UHA/ml
BASAL	64	2560
30	128	5120
75	128	5120
105	64	2560
135	64	2560
165	8	320

UHA/ml.- Unidades hemaglutinantes/ml

Aislamiento de la proteína HN por gradientes de densidad en sacarosa.- Después de sonicar la muestra, esta fue dializada y ultracentrifugada a 100,000 g 4 h a 4°C en un gradiente de sacarosa de 30 a 60 %. De los gradientes de densidad se obtuvieron 2 fracciones con actividad aglutinante de 16 y 32 UHA y dos fracciones de 64 UHA correspondientes a las fracciones 16 a 19 respectivamente y una concentración de proteína de 108.6, 116.45, 124.3 y 116.45 µg/ml. También se hallaron otras fracciones con menor actividad aglutinante correspondientes a las fracciones 13, 14, 15, 20, 21, 22, estas se descartaron. Las fracciones con mayor actividad aglutinante (fracciones 18 y 19) fueron utilizadas para la purificación por cromatografía de intercambio iónico.

GRAFICA 2.- PURIFICACION DE LA PROTEINA HN POR GRADIENTES DE DENSIDAD



A cada fracción se le determinó actividad hemaglutinante (HA) y concentración de proteína (Bradford 1980) y posteriormente se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 12.5%. La proteína HN quedó en las fracciones 16-19. Los círculos indican concentración de proteína (---o---) ; las barras indican actividad aglutinante (HA) ()

RENDIMIENTO DEL AISLAMIENTO DE LA PROTEINA HN POR GRADIENTES DE DENSIDAD EN SACAROSA

La actividad hemaglutinante de la proteína HN durante su aislamiento a partir de viriones completos fue determinada por hemaglutinación con eritrocitos humanos A₂ al 1 %. Partimos de un sobrenadante de células Vero infectadas con el Rvp LPM (40 ml), cosechado a las 72 y 96 h con una actividad aglutinante de 16 HA (25600 UHA), el virus fue precipitado con PEG 8,000, durante 3 h a 4 °C, dializado en buffer TEN y resuspendido en 4 ml de buffer TEN pH 7.2 (10240 UHA, que corresponde al 40% de recuperación de la actividad aglutinante). El concentrado viral fue lisado mediante sonicación a 14 Hz aplicando 5 pulsos de 15 seg cada uno como se describió anteriormente, para separar la proteína HN del resto de las proteínas virales. Durante este proceso la actividad aglutinante fue de 20480 UHA que correspondió al 80 % de la actividad recuperada. La proteína HN fue aislada por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa. De este gradiente de densidad se obtuvieron 4 fracciones (16-19) con actividad aglutinante, correspondientes a la interfase de dicho gradiente (concentración aproximada de 30% de sacarosa). Dos de las fracciones obtenidas en el gradiente (18-19) presentaron mayor actividad aglutinante (64 HA), estas fracciones las consideramos como una sola (fracción de 2 ml), ya que el corrimiento electroforético mostró una banda. La actividad aglutinante de estas fracciones fue de 5120 UHA que correspondió al 20 % de la actividad recuperada (Ver tabla 6).

TABLA 8.- RECUPERACION DE LA ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DURANTE EL AISLAMIENTO DE LA PROTEINA HN EN GRADIENTES DE DENSIDAD

	Titulo	UHA/ml	UHA/vol. total	Actividad recuperada
	HA			
Sobrenadante	16	640	25600 / 40 ml	
Precipitado	64	2560	10240 / 4 ml	40 %
Sonicado	128	5120	20480 / 4 ml	80 %
Purificado	64	2560	5120 / 2 ml	20 %

La determinación de actividad aglutinante se realizó con una solución de eritrocitos humanos A₂ al 1 %, a 25 °C.

TABLA 9.- ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LA PROTEINA HN AISLADA POR GRADIENTES DE DENSIDAD

No. Fracción	UHA/ml	Concentración de proteína (mg/ml)	Actividad específica (UHA/mg)
13	80	0.113	708
14	80	0.088	909
15	160	0.105	1524
16	640	0.108	5926
17	1280	0.116	11034
18	2560	0.124	20645
19	2560	0.116	22069
20	320	0.096	3333
21	160	0.088	1818
22	80	0.084	952

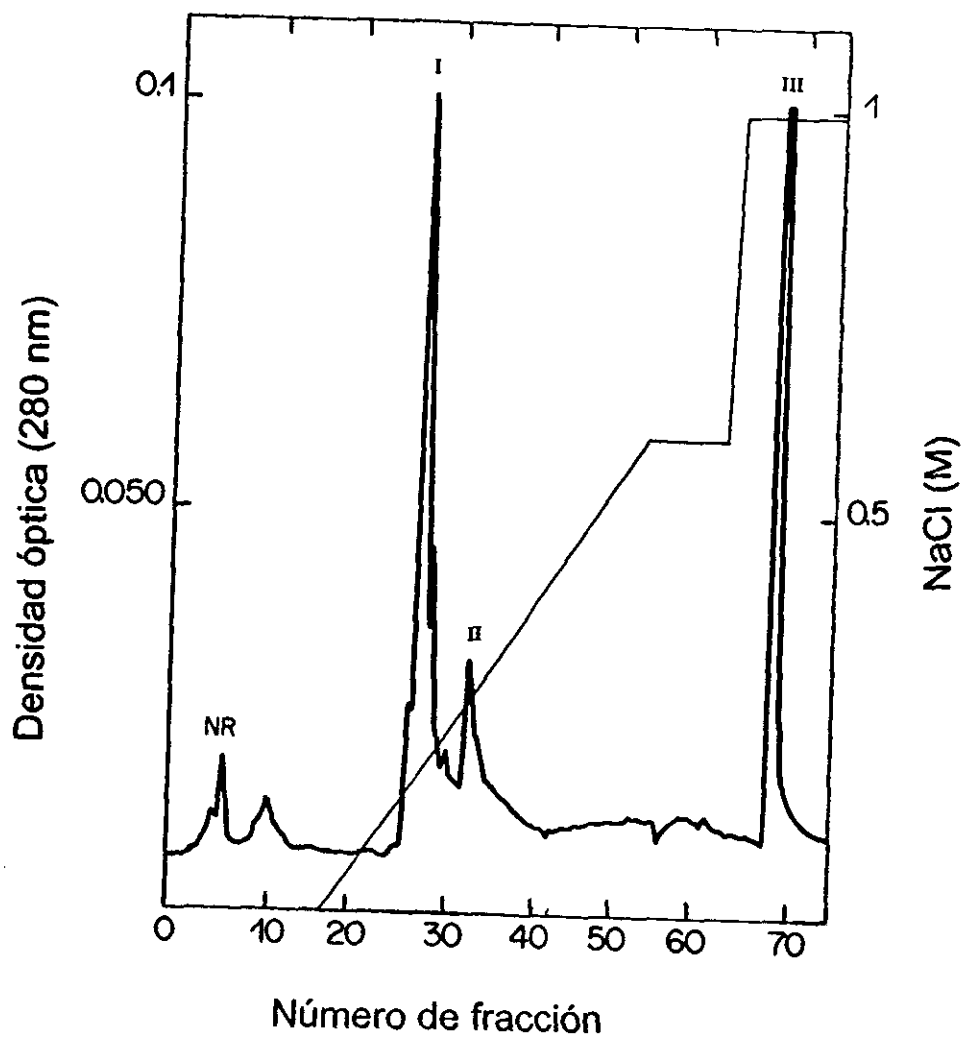
La actividad aglutinante se realizó con una solución de eritrocitos humanos A₂ al 1%, a 25°C.

PURIFICACION DE LA PROTEINA HN MEDIANTE CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO

Se utilizaron las fracciones 18 y 19 del gradiente de densidad cuyo título hemaglutinante fue de 64 HA y una concentración de proteína de 0.12 mg/ml. Las muestras fueron dializadas exhaustivamente contra agua desionizada y posteriormente liofilizadas. Para esta determinación, las muestras fueron resuspendidas en buffer bis-tris/ácido imidoacético 0.025 M pH 7.1 y aplicadas en un equipo de FPLC en una columna de intercambio ionico (Mono P, Pharmacia). La proteína HN fue eluída en un gradiente de NaCl 1 M a una presión de 2.5 ml/min. La detección se realizó a 280 nm.

En este proceso obtuvimos una fracción no retenida (NR) antes de iniciar el gradiente de NaCl. Posteriormente se obtuvieron 3 fracciones, una fracción mayoritaria (I) eluída en el momento en que el gradiente de NaCl alcanzó 0.15 M, dicha muestra alcanzó una absorbancia de 0.1, la fracción II se eluyó con una concentración de 0.27 M de NaCl y presentó una absorbancia 0.032; finalmente la fracción III fue eluída a una concentración de 1 M de NaCl y presentó una absorbancia por arriba de 1. Solo la fracción I presentó actividad aglutinante. Las fracciones II y III al parecer son contaminantes.

GRAFICA 3.- PERFIL DE ELUCION DE LA PROTEINA HN



Purificación de la proteína HN por cromatografía de intercambio iónico, en un equipo de FPLC. La elución de la muestra se realizó en un gradiente de NaCl 1 M. La gráfica muestra 3 fracciones eluidas a diferentes concentraciones de NaCl y una fracción no retenida. La fracción I presentó actividad aglutinante. La detección se realizó a 280 nm. NR.- No retenido; I).- Proteína HN; II).- Fracción minoritaria sin actividad aglutinante y III).- Fracción sin actividad aglutinante.

CARACTERIZACION FISICOQUIMICA DE LA PROTEINA HN DEL VIRUS LPM

PESO MOLECULAR RELATIVO.- Esta determinación se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (Laemli, 1970). El corrimiento electroforético duró 2 h a 150 V. Se utilizaron las fracciones 18-19 obtenidas del gradiente de densidad. Se realizó la comparación con proteínas de peso molecular conocido. Los resultados obtenidos mostraron una banda con un peso molecular relativo de 65 Kda y que corresponde a la proteína HN (Ver fig. 4). Esta determinación mostró la homogeneidad de la muestra.



FIGURA 4.- PATRON ELECTROFORETICO DE LA PROTEINA HN.

Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12.5 % en condiciones desnaturalizantes. (A).- Marcadores de bajo peso molecular (Albúmina, Ovoalbúmina, Gliceraldehído 3-fosfato, Anhidrasa carbónica) (B).- Sobrenadante de cultivo celular Vero, (C).- Virus LPM purificado por gradiente de densidad, (D).- Proteína HN aislada por gradiente de densidad. Tinción azul de Coomassie 0.1%.

DETERMINACION DEL PUNTO ISOELECTRICO (pI) TEORICO.- Este se realizó mediante el análisis de secuencias del amino y carboxilo terminal de cada proteína del virus LPM. Estas secuencias fueron obtenidas de un banco de datos EXPASy Server. La proteína HN de acuerdo a la secuencia de aminoácido predicha para su genoma presenta un pI de tipo básico que corresponde a 8.44. Esto indica una gran cantidad de aminoácidos como lisina (K), arginina (R) e histidina (H).

TABLA 10.- PUNTO ISOELECTRICO (pI) DE LAS PROTEINAS DEL VIRUS LPM CALCULADO EN BASE AL GENOMA

PROTEINA	Amino	Carboxilo	pI	P.M (Da)
C	MERLLNYWKQ	VLDQKFMRAI	9.98	14710.07
V	MASSSLSFSD	GPHDGAGNES	5.23	26139.92
P	MASSSLSFSD	LKNDVIRYAS	5.49	42468.00
L (RNA-pol)	MAGQQDVILP	VERDIAGDIL	6.26	255233.62
M	MAMHAKIPLN	KSTYWNPFK	9.45	41657.72
F	MPQQQVAHTC	YVMGDKFIRY	6.15	58311.66
HN	MSQLGTDQIM	LREIKIQSRY	8.44	63324.82

DETERMINACION DEL PUNTO ISOELECTRICO (pI) EXPERIMENTAL DE LA PROTEINA HN.- Esta determinación se realizó en gel de acrilamida. El corrimiento se realizó durante 1.5 h. Aquí se utilizó la fracción hemaglutinante del gradiente de densidad cuyo título fue de 64 HA. El punto isoeléctrico correspondió a dos componentes focalizados entre el pH 5.6 y 5.73. En el carril 5 también se aprecian aunque en forma muy tenue estos dos componentes.

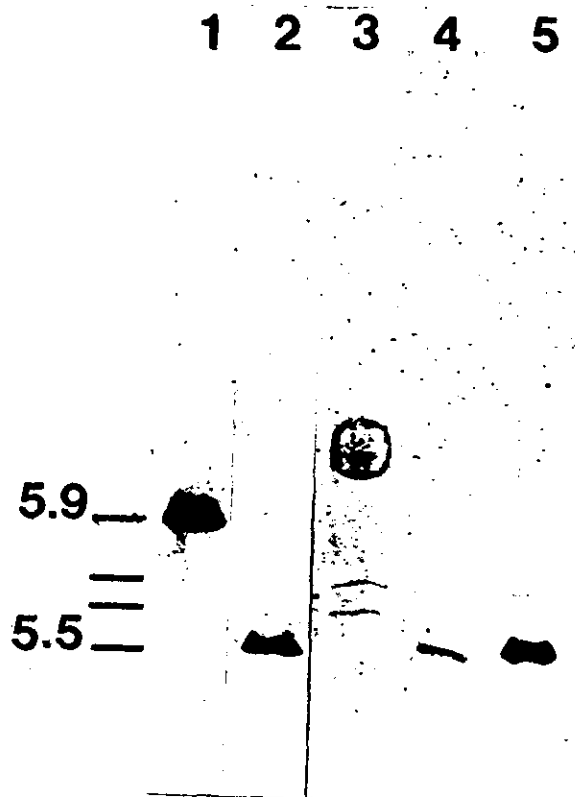


FIG. 5.- ISOELECTROENFOQUE DE LA PROTEINA HN

El corrimiento se realizó en gel de poliacrilamida al 7.5 %. La focalización se realizó con anfólinas con un pH de 3-10. El pH del gel se determinó con un microelectrodo. Carril 1.- Anhidrasa carbónica (5.9), Carril 2.- Albúmina sérica bovina (5.5), Carril 3.- Proteína HN (5.6 ; 5.73), Carril 4.- Virus Pac-1, Carril 5.- Virus LPM. Tinción con azul de Coomasie al 0.1%

COMPOSICION DE AMINOACIDOS.- A partir de la fracción pura obtenida por cromatografía de intercambio iónico se realizó esta determinación, la cual indicó que la proteína HN es rica en los siguientes aminoácidos: Ala, Gly, Leu, Pro, Val, Ser, Thr y Lys. Así mismo, presentó una gran cantidad de aminoácidos de tipo no polar, en mayor proporción leucina y alanina. En menor proporción se hallaron aminoácidos de tipo aromático como fenilalanina. También se observó una gran similitud en cuanto al porcentaje de aminoácidos de tipo hidrofóbico con lo reportado por Sundquist, (1992); a partir del cDNA predicho para esta proteína. No así, para el resto de los aminoácidos. Aminoácidos como metionina que son de baja ocurrencia en las proteínas se encuentra presente en la proteína HN. Mientras que, Alanina, un aminoácido de alta ocurrencia en proteínas también está presente. Debido a las características propias de la técnica de determinación de aminoácidos, los residuos de Cisteína y Triptófano fueron omitidos del análisis ya que se degradan. Por otro lado, el equipo no es capaz de discriminar entre ácido glutámico y/o aspártico y glutamina y/o asparagina.

TABLA 11.- COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LA PROTEINA HN DEL RUBULAVIRUS PORCINO LPM

AMINOACIDOS	SIMBOLO	cDNA	EXPERIMENTAL
No polares:		%	%
Ala	A	7.1	9.0
Gly	G	7.4	8.7
Ile	I	7.4	4.7
Leu	L	9.3	10.5
Phe	F	4.1	4.2
Pro	P	6.5	6.0
Trp	W	1.3	ND
Met	M		1.4
Val	V	4.3	6.0
Total		47.4	49.1
polares neutros:			
Asn	N	3.4	*
Cys	C	3.2	ND
Gln	Q	5.2	**
Ser	S	8.6	7.1

Thr	T	10.2	5.4
Tyr	Y	5.0	0.8
		36.6	13.3
polares carga (+)			
Arg	R	4.8	3.9
His	H	1.7	1.9
Lys	K	1.3	7.8
		7.8	13.6
polares carga (-)			
Asp	D	2.9	*
Glu	E	2.2	**
		5.1	ND

*Asx.- Asparagina / Acido aspártico 8.9 ; **Glx.-Glutamina / Acido glutámico 11.8

DETERMINACION DE LA COMPOSICION DE CARBOHIDRATOS DE LA PROTEINA HN.- Esta determinación se realizó para confirmar lo reportado por Sundvist (1990), quien determinó con glucosamina marcada radiactivamente que la proteína HN era una glicoproteína. Los resultados obtenidos confirman que la proteína HN es una glicoproteína y que está constituida mayoritariamente por Manosa (Man) y Galactosa (Gal), seguido de N-acetil-galactosamina (GalNAc) y en menor concentración de N-acetil-glucosamina (GlcNAc). Así mismo, se hallaron trazas de Acido siálico (NeuAc). La relación molar entre los azúcares encontrados en esta glicoproteína fue la siguiente: 3: 3: 2: 1: trazas respectivamente. Se determinó que la cantidad de azúcares presentes en esta glicoproteína corresponden al 1% de su peso.

TABLA 12.- COMPOSICION DE CARBOHIDRATOS DE LA PROTEINA HN

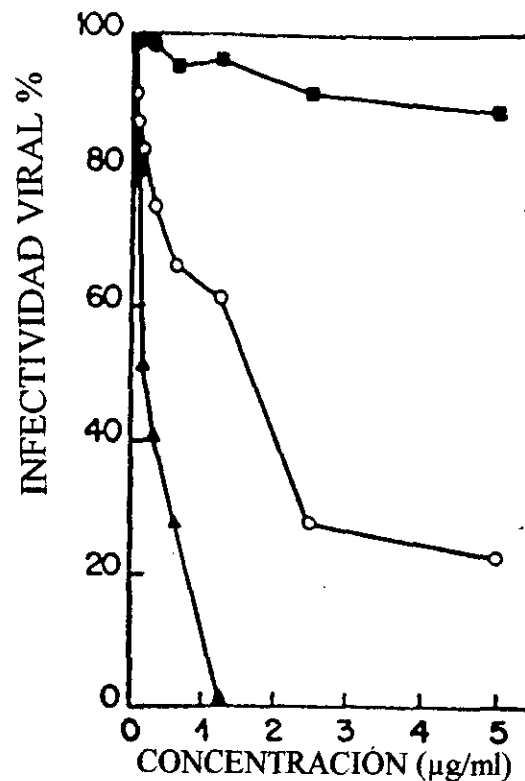
AZUCAR	Man	Gal	GalNAc	GlcNAc	NeuAc
MOLES	3 :	3 :	2 :	1 :	Trazas

Man.-Manosa; Gal.-Galactosa; GalNAc.-N-acetil galactosamina; GlcNAc.-N-acetilglucosamina y NeuAc.-Acido siálico

PAPEL DE LOS CARBOHIDRATOS EN LA INFECTIVIDAD VIRAL

Efecto de los inhibidores de glicosilación sobre la infectividad del virus LPM.- El tratamiento de las células con el antibiótico Tunicamicina (TUN) inhibió completamente la infectividad viral a concentraciones tan bajas como 1.3 $\mu\text{g/ml}$ después de una hora de incubación celular, mientras Deoxinojirimicina (DNM) en una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ disminuyó el 75 % de la infectividad del virus LPM. No se observó disminución significativa en la infectividad del virus por el tratamiento con Deoximanojirimicina (DMM) a la misma concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ después de 4 h de tratamiento.

GRAFICA 4.- EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE GLICOSILACION SOBRE LA INFECTIVIDAD VIRAL

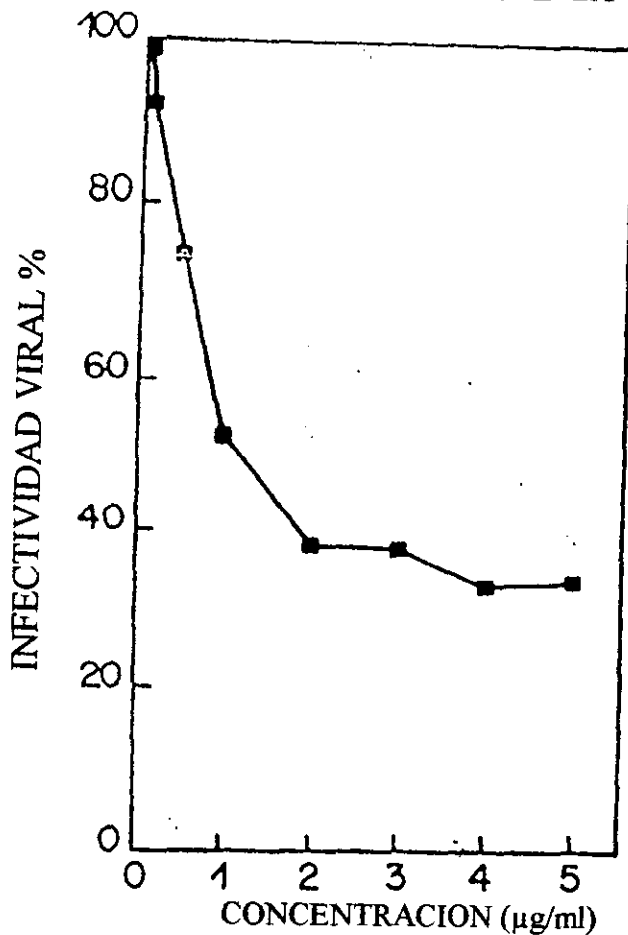


Efecto sobre la formación de sincicios por el virus LPM en cultivos celulares Vero tratados con inhibidores de la glicosilación. TUN.- Tunicamicina, DNM.- Deoxinojirimicina, DMM.- Deoximanojirimicina

EFFECTO DE DEXAMETASONA SOBRE LA INFECTIVIDAD DEL VIRUS LPM

Para el caso de Dexametasona se determinó que concentraciones de 1-5 μM de este glucocorticoide indujeron inhibición de la infectividad viral en un 60% en células Vero después de 12 h de tratamiento. Al parecer la Dexametasona a una concentración de 10 μg o por arriba de ella es tóxica, pues altera la morfología celular. Las células Vero adoptan forma esférica, se induce la formación de vacuolas y finalmente el desprendimiento del monoestrato celular.

GRAFICA 5.- EFECTO DE DEXAMETASONA SOBRE LA INFECTIVIDAD DEL VIRUS LPM



Efecto de Dexametasona sobre la infectividad del virus LPM

CITOQUIMICA CON LECTINAS

Este ensayo determinó que las células Vero poseen ácido siálico unido a Gal en las dos posiciones $\alpha 2,3$ y $\alpha 2,6$ y bajos niveles de Gal $\beta 1,3$ GalNAc y estructuras oligomanosídicas. Los ensayos de unión a lectinas con células tratadas con inhibidores de glicosilación mostraron inhibición de la expresión de azúcares con tunicamicina (TUN). Así mismo, la unión de las dos lectinas *Mackia amurensis* (MAA) y *Sambucus nigra* (SNA) disminuyó notablemente después de 4 h de tratamiento con TUN. El tratamiento con deoxinojirimicina (DNM) disminuyó en un 70 % la interacción positiva con MAA y una inhibición completa de la reacción con SNA. El tratamiento de las células Vero con deoximanojirimicina (DMM) afectó la interacción con ambas lectinas. El tratamiento con Dexametasona aumentó en un 100% la capacidad de las células para interactuar con SNA y produjo inhibición de la interacción con MAA en un 70 %.

Tabla 13.- EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE GLICOSILACION Y DEXAMETASONA EN EL RECONOCIMIENTO POR LECTINAS

		LECTINAS	
		MAA	SNA
Tunicamicina	2 μ g/ml	-	-
Deoxinojirimicina	5 μ g/ml	+	-
Deoximanojirimicina	5 μ g/ml	+	+
Dexametasona	5 μ g/ml	+	++++

Tinción con las lectinas de.- *Mackia amurensis* (MAA) y *Sambucus nigra* (SNA)

DISCUSION

El objetivo de este trabajo fue la purificación y caracterización de la glicoproteína HN del Rubulavirus porcino LPM (Rvp LPM). Las glicoproteínas virales juegan un papel importante en la patogénesis de infecciones virales. Se sabe que la adsorción viral a receptores específicos de la superficie de la célula hospedero es un requisito para la infección (Tardieu 1982), esta función en algunos miembros de la familia Paramixoviridae incluyendo al Rubulavirus porcino LPM está mediada por la proteína hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y en algunos otros paramixovirus esta actividad la desarrolla la proteína G y/o H. La proteína HN del Rvp LPM posee dos actividades biológicas en la misma proteína una actividad de hemaglutinina, cuya función es el reconocimiento y adhesión del virus a receptores sobre la superficie de la célula blanco y una actividad de neuraminidasa, la cual al parecer está implicada en la elución del virus de su receptor (Hanaoka 1989, Ryan Poirier and Kawaoka 1993). Al parecer la proteína HN también juega un papel importante interaccionando con la proteína M durante la liberación de la progenie viral (Schulze y cols 1992; García y cols. 1996).

En general se han descrito diversos métodos para la purificación virus y de sus proteínas que involucran la utilización de gradientes de percoll, renografin, metrizamida y sacarosa, así como, detergentes (Mbiguino y cols., 1991). En el caso de esta proteína HN probamos gradientes de sacarosa y extracción con detergentes y pudimos constatar que esta última metodología no rindió buenos resultados dada la dificultad para eliminar los residuos de detergente mediante diálisis, lo que nos impedía detectar actividad hemaglutinante e interfería con la determinación de proteína. Además la proteína HN disminuye su capacidad de aglutinar eritrocitos con periodos prolongados de diálisis. Por otro lado, en el laboratorio existían antecedentes de la utilización de los gradientes de sacarosa para la purificación viral y de la proteína HN (Reyes y cols., 1993) por lo que decidimos utilizarla.

En cuanto a la separación del proteína HN de la membrana viral probamos otra metodología. En experimentos anteriores provocábamos la ruptura de la membrana viral mediante choque térmico (-70 a 37°C); sin embargo, esta metodología disminuye los títulos hemaglutinantes por agregación de la proteína HN; esta agregación al parecer no sucede mediante sonicación y pudimos apreciarlo por el incremento en la actividad hemaglutinante de

dicha proteína, lo que nos indica mayor la liberación de proteína en condiciones tales que es capaz de aglutinar mayor cantidad de eritrocitos.

El método de aislamiento de la proteína HN por gradientes de densidad con sacarosa ofreció buenos resultados ya que se logró separar a la proteína en la interfase del gradiente de sacarosa (30 y 60 %), obteniendo 4 fracciones que conservan su actividad aglutinante. La relevancia del proceso de aislamiento de la proteína HN a través de gradientes de densidad en sacarosa radica en la homogeneidad de la proteína HN obtenida. Esto fue visualizado a través de geles de poliacrilamida, donde se muestra una banda ; mientras que, otros autores (Sundquist y cols., 1990) han reportado purificaciones de la proteína HN asociada con la proteína F (otra glicoproteína de superficie). Además, el rendimiento del proceso de aislamiento también fue bueno ya que obtuvimos un factor de 21.3 UHA/ μ g de actividad específica y una recuperación del 20% de la actividad aglutinante, tomando en cuenta que la proteína fue sometida a diferentes procedimientos para su aislamiento y a periodos prolongados de diálisis para su purificación y caracterización. Además del grado de purificación, pudimos obtener el peso molecular de esta proteína, mediante el corrimiento en geles de poliacrilamida al 12.5 %, donde se mostró una banda correspondiente a 65 KDa mismo que correlaciona con lo reportado por Sundquist y cols., (1990).

Por otro lado, uso de la metodología de cromatografía de intercambio iónico para la purificación de la proteína HN utilizando las fracciones 18 y 19 del gradiente de sacarosa, mismas que presentaron la mayor actividad aglutinante (64 UHA), nos permitió obtener 3 fracciones (I, II, III) eluidas en un gradiente de NaCl 1 M de las cuales solo la fracción mayoritaria (I) presentó actividad aglutinante. Además fue suficientemente pura para ser utilizada en los ensayos de caracterización como: composición y secuencia de aminoácidos, así como, composición de carbohidratos. Aún cuando encontramos dos fracciones mas eluidas a diferentes concentraciones de NaCl (fracciones II y III), podemos considerar a la fracción II como un contaminante y a la fracción III posiblemente como restos de sales. Otra posibilidad es que pudieran ser agregados de la proteína HN y por tanto presentaron otro perfil de elución y perdieron la capacidad de aglutinar eritrocitos.

En cuanto a las metodologías utilizadas para la caracterización de la proteína HN el isoelectroenfoque mostró la presencia de dos componentes de tipo ácido con un punto isoelectrico muy cercano que va de 5.61 a 5.73. La presencia de estos dos componentes puede indicar que la proteína posiblemente sufrió hidrólisis, al parecer todas las hemaglutininas virales se encuentran como dímeros y están ancladas a la membrana viral mediante interacción de la porción hidrofóbica de la proteína, por ello consideramos que la hemaglutinina del virus LPM pudo haber sufrido proteólisis y que esta no rompió en porciones simétricas a la proteína generando dos fragmentos con diferente carga y por tanto un punto isoelectrico diferente. Además, el p.I obtenido experimentalmente no correspondió al obtenido en forma teórica este último indicaba un p.I de tipo básico.

Mediante el análisis de predicción estructural se ha podido identificar que la proteína HN del virus LPM posee un dominio intracelular y transmembranal en la región amino, la secuencia peptídica transmembranal posee una región hidrofóbica de 22 aminoácidos. Esta región tiene características de alta rigidez e inaccesibilidad a solventes por tanto se ha propuesto que puede ser utilizado como sitio de anclaje a la membrana. Además posee un dominio extracelular con funciones de hemaglutinina y neuraminidasa en la región carboxilo, así mismo, su organización estructural parece ser de tipo hebra β -asa-hebra β alternada e interrumpido ocasionalmente por pocas α -hélices (Zenteno R., 1997. Tesis de Maestría; Zenteno R y cols., 1998) Esta propuesta es similar a la reportada por Colman y cols. (1993), quien ha comparado diferentes proteínas HN de varios paramixovirus con la neuraminidasa del virus Influenza.

Por otro lado, la proteína tiende a la agregación cuando es dializada contra agua desionizada, al parecer es importante mantener la fuerza iónica cuando la proteína HN pura está en solución. Pudimos constatar este fenómeno en el corrimiento de pI ya que, para la utilización de esta muestra fue necesario diálizar exhaustivamente contra agua desionizada porque la presencia de sales interfiere en el corrimiento de las proteínas en el gel. Además de ser necesario concentrar la muestra ya que, el volumen óptimo para esta determinación es de 3 μ l, estos dos procesos generaron agregados proteicos que pudieron ser visualizados al teñir el gel, donde

aparece una marca en la zona donde se absorbió la muestra, esto indica la presencia de algunos agregados proteicos.

En cuanto a la composición de aminoácidos de la proteína HN purificada por intercambio iónico pudimos observar que existe gran homología entre los aminoácidos de tipo hidrofóbico presentes en la proteína HN purificada y la reportada para el genoma por Sundquist (1992); no así para el resto de los aminoácidos. Por otro lado, habíamos considerado un margen de error debido a que el equipo no puede discriminar entre ácido glutámico y/o glutamina; ácido aspártico y/o asparagina, sin embargo, el isoelectroenfoque nos indicó que la proteína es de tipo ácida, esto indica que la proteína es rica en aminoácidos cargados negativamente. Se sabe que algunas secuencias de aminoácidos son altamente conservadas entre las hemagglutininas virales, tal es el caso de los paramixovirus. La secuencia deducida de aminoácidos de esta hemagglutinina ha mostrado homología del 43 % con el virus Símico 5 y un 41 % con el virus de la parotiditis humana (Sundqvist, 1992). Esta alta homología con el virus de la parotiditis al parecer también está relacionada con la patología que ambos virus generan, ya que, el virus LPM al igual que el virus de las paperas afectan el sistema reproductor en sus hospederos naturales. La secuencia de aminoácidos de la proteína HN no pudo realizarse ya que el amino terminal se encontró bloqueado, ya que se encuentra en la membrana.

La composición de carbohidratos confirmó que la proteína HN es una glicoproteína como se había reportado mediante marcaje con (^3H) glucosamina (Sundqvist y cols., 1990). Los carbohidratos modulan las propiedades físicas de la proteína a la cual están unidos, como el plegamiento completo de la cadena polipeptídica nascente y la protección contra la proteólisis así como determinantes de reconocimiento en una variedad de procesos fisiológicos y patológicos, (Lis y Sharon, 1993). Dicho análisis indicó que la glicoproteína HN está constituida por Man: Gal: GalNAc: GlcNAc: NeuAc que corresponde al 1% de su peso y que la relación molar entre ellos es: 3: 3: 2: 1: trazas respectivamente. En el caso de los virus se sabe que la glicosilación de la proteína G del virus de la estomatitis vesicular se inicia por la transferencia en bloque de un oligosacárido de alto peso molecular de un lípido transportador a un polipéptido recién sintetizado. El oligosacárido precursor es "procesado" por remoción de 2 a 3 residuos de glucosa, luego los últimos residuos de glucosa son removidos y el procesamiento continúa con la última remoción de 6 de los 9 residuos de manosa, finalmente los azúcares que constituyen las ramas exteriores del oligosacárido complejo se adicionan para dar el oligosacárido complejo maduro

(Li E y cols., 1978) constituido por 3 residuos de glucosa, 3 de manosa y 2 de N-acetilglucosamina, este último residuo se transfiere al residuo de manosa unido en enlace 1-3 al enlace beta del núcleo de manosa (Kornfeld y cols., 1978).

Una vía de procesamiento menor puede involucrar la conversión de Glc1,9 Man 2GlcNAc a Glc1,8 Man 2GlcNAc y Glc1,7 Man 2GlcNAc. En base a esto se sugiere que la transferencia de un residuo N-acetilglucosamina a un residuo de manosa unido en posición 1-3 al enlace beta del núcleo de manosa sirve como señal para una manosidasa que remueve los 2 residuos de manosa unidos a la manosa la cual está unida en posición 1-6 al núcleo de manosa. Siguiendo la remoción de los residuos de manosa, los 2 residuos externos de N-acetilglucosamina son transferidos a los oligosacáridos y la glicosilación se completa por la adición de residuos de galactosa, ácido siálico y fucosa. Este esquema indica que las dos manosidasas están involucradas en este proceso. La primera enzima podría romper manosas unidas en 1-2 y luego convertir la Man9,2GlcNAc a Man5,2GlcNAc. La segunda enzima puede romper residuos de manosa unidos en 1-3 y 1-6 (Li E y cols., 1978).

En cuanto a la relación estructural de la proteína HN con su especificidad por estructuras sacarídicas se ha reportado que al parecer el dominio hemaglutinina de la proteína HN del virus LPM contiene una de las pocas estructuras α -hélices definidas en toda su secuencia, esto sugiere que dicha estructura α -hélice puede participar en el reconocimiento de moléculas sacarídicas componentes del receptor celular (Zenteno y cols., 1998). Otros trabajos han demostrado este tipo de estructuras dentro del sitio de interacción con carbohidratos, sin embargo, esto solo puede confirmarse a través de la determinación de la estructura de la proteína HN mediante cristalografía de rayos X.

Por otro lado, trabajos recientes en el laboratorio han demostrado que la hemaglutinina HN es capaz de reconocer estructuras sacarídicas en la superficie celular que corresponden al anómero α del ácido siálico unido en posición α 2,3 a galactosa mismo que la línea celular Vero posee en su superficie. Recientemente este hecho fue reportado también para el caso de los virus Influenza A y B (Govorkova y cols., 1996), cuyas hemaglutininas virales reconocen el mismo tipo de ácido siálico que el virus LPM en la misma línea celular. Esto explica en parte la susceptibilidad y permisibilidad de dichas células a la infección y replicación viral, a pesar de que el origen de las células Vero no corresponde a la especie que estos virus infectan en forma

natural. Las modificaciones en la expresión de azúcares generado por el tratamiento con antibióticos inhibidores de la glicosilación y dexametasona sobre las células Vero demuestra que la expresión de ácido neuramínico es necesaria para el reconocimiento del virus LPM por su receptor celular y esto determina el grado de infectividad viral.

Esto podría estar relacionado con el cuadro clínico presentado en cerdos neonatos y adultos infectados con el Rvp LPM. Mientras para los animales jóvenes la infección afecta principalmente sistema respiratorio y el SNC y trae como consecuencia la muerte, para los cerdos adultos las alteraciones son a nivel reproductivo. Se sugiere que el sitio primario de replicación se localiza en el tracto respiratorio y tonsila donde al parecer existe sialil α 2,3lactosa. En cuanto a la distribución viral en el SNC de los cerdos neonatos; el virus se localiza en numerosas áreas del SNC, a partir del 4o día postinoculación. En los cerdos de 17 días de edad el virus se localiza principalmente en cerebro medio y bulbo olfatorio a partir del 3er y hasta el 11o día después de la inoculación (Allan y cols., 1996). En cerdos adultos la invasión por el Rvp LPM puede ocurrir de manera similar a las registradas para cepas poco o moderadamente virulentas del virus de Aujeszky (Kluge y cols., 1992). Estas diferencias reportadas en la distribución viral en el SNC de los cerdos pueden reflejar diferencias en la diseminación del virus del sitio primario de replicación hacia el SNC. La viremia es parte importante en la diseminación ya que el virus puede ser aislado de diferentes tejidos como riñón, bazo, hígado y ganglios mesentéricos. Sin embargo, en estos tejidos no se observan cambios macroscópicos o histológicos (Stephano, Gay y Ramírez, 1988) lo que indica que la viremia es transitoria o de muy bajo nivel durante la infección con este virus (Allan y cols., 1996).

En nuestro grupo hemos observado la relevancia de la participación de estructuras sacarídicas en el reconocimiento de la proteína HN del virus por los tejidos blanco. El rubulavirus reconoce específicamente NeuAc α 2,3lactosa, en la superficie de células Vero y en tejidos de cerdos neonatos, no así, el anómero NeuAc α 2,6 que al parecer predomina en los tejidos de cerdos adultos, estas variaciones en las estructuras sacarídicas en función de la edad, al parecer, determinan el tropismo tisular del virus LPM en los cerdos de diferentes edades (Vallejo y cols., 1998, enviado). Los virus influenza A se une a los oligosacáridos de la superficie celular, pero poseen especificidades que varían de acuerdo al origen de la especie del hospedero. Los virus preferentemente se unen a oligosacáridos que contienen ácido N-acetil neuramínico α 2,6-galactosa (NeuAc α 2,6Gal), aunque algunas cepas de virus influenza aviario y equino se unen a

NeuAc α 2,3 Gal. El cambio en un solo aminoácido en la hemaglutinina, seleccionado con un unhibidor de suero de caballo, 2-macroglobulina, alteró la especificidad del receptor de un virus influenza humano de NeuAc α 2,6Gal a NeuAc α 3,2Gal.(Toshihiro y cols., 1997)

Las variaciones en la secuencia de aminoácidos de glicoproteínas de envoltura de virus RNA pueden causar cambios en su antigenicidad y alterar el tropismo hacia la célula hospedero y el grado de virulencia. Así, estos cambios pueden alterar el rumbo y el resultado de las enfermedades virales. Por consiguiente, la plasticidad del genoma viral y la maquinaria de glicosilación codificada por el hospedero se combinan para crear poblaciones virales muy diversas. Al parecer esta diversidad es la responsable de la supervivencia de los virus en una variedad de nichos biológicos y de su habilidad para vencer los efectos inhibitorios de anticuerpos neutralizantes y agentes antivirales (Shulze y cols., 1992).

Todas estas características de glicosilación determinan la interacción del virus con la célula blanco, así vemos que la glicoproteína HN es capaz de aglutinar eritrocitos de diferentes especies, aunque presenta mayor reactividad con eritrocitos humanos tipo A₂, pollo y conejo. Las pruebas de aglutinación realizadas utilizando glóbulos rojos tratados con neuraminidasa de *Vibrio cholerae* muestran la eliminación de la actividad hemaglutinante, esto demuestra la importancia de los residuos de ácido siálico en el reconocimiento de la proteína. Por otro lado, el tratamiento de eritrocitos con tripsina incrementó el título hemaglutinante, lo que nos indica que existen otras moléculas capaces de ser reconocidas posiblemente como receptores secundarios de la proteína HN. Esto es de gran relevancia ya que al parecer después de proceso de reconocimiento y adhesión a la célula blanco existe una interacción con algún dominio de la proteína F que también es una glicoproteína para que se lleve a cabo la infección. La proteína HN es indispensable para el reconocimiento del virus por su célula blanco, pero al parecer la proteína HN y F son importantes en el proceso de fusión del virus con la célula huésped.

CONCLUSIONES

1.- Se ha diseñado un método de purificación de la glicoproteína HN que ofrece buen rendimiento y la obtención de la proteína pura con actividad hemaglutinante.

2.- Las técnicas de cromatografía de intercambio iónico permiten obtener una proteína libre de contaminante utilizable en ensayos de caracterización.

3.- Se determinaron las características fisicoquímicas de la proteína HN tales como:

Peso molecular de 65 KDa,

Punto isoeléctrico, con posibles isoformas

Composición de aminoácidos y carbohidratos

4.- La modificación en la expresión de carbohidratos sobre las células Vero realizada con antibióticos inhibidores de la glicosilación y dexametasona demostraron que la expresión de ácido neuramínico es necesaria para el reconocimiento de la célula.

5.- Se probó la especificidad viral y se determinó la relevancia de NeuAc α 2,3 en el reconocimiento de la proteína HN hacia su célula blanco.

BIBLIOGRAFIA

- Allan GM, F McNeilly, I Walker, T Linné J Moreno López, P Hernández, S Kennedy, BP Carrol, B Herron, JC Foster, B Adair. (1996) A sequential study of experimental porcine paramyxovirus (LPMV) infection of pigs: immunostainin of cryostat sections and virus isolation. *J Vet Diag Invest* 8:405-413.
- Avalos TR, Yu Z. and Nayak PD. (1997). Association of influenza virus NP and M1 proteins with cellular cytoskeletal ejements in influenza virus-infected cells. *Journal of Virology*, Vol. 71, No. 4, pp. 2947-2958.
- Berg M, Sundqvist A, Moreno López J and Linné T. (1991). Identification of the Porcine Paramyxovirus LPMV Matrix Protein Gene: Comparative Sequence Analysis with other paramyxovirus. *J Gen Virol*; 72: 1045- 1050.
- Berg M, Hjertner B, Moreno-López J y Linné T. (1992). The P gene of the porcine paramyxovirus LPMV encodes three possible polypeptides P, V and C: the P protein mRNA is edited. *J Gen Virol*; 73: 1195.
- Bidlingmeyer, BA ; Cohen, SA, Tarvin TL. (1984). Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. *J. Chromatogr.*, 33, 93-104.
- Bjellqvist B., Highes GJ., Pasquali Ch., Paquet N., Ravier F., Sánchez J Ch., Frutiger S and Hochstrasser DF. (1993). The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis*, 14, 1023-1031.
- Bjellqvist B., Basse B., Olsen E and Celis JE. (1994). Reference points for comparisons of two-dimensional maps of proteins from different human cell types defined in a pH scale where isoelectric points correlate with polypeptide compositions. *Electrophoresis*, 15, 529-539.
- Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt Biochem* 1976; 72: 248.

- Campos R, Carbajal M. Trastornos reproductivos en los sementales de una granja porcina de ciclo completo ante un brote de ojo azul. En Morilla A, Correa O, Stephano HA, Eds. Avances en producción porcina. Vol. 1, México D.F. AMVEC-UNAM, 1994 : 243.
- Choppin W. P. and Scheid A. (1980). The role of viral glycoproteins in adsorption, penetration and pathogenicity of virus. *Reviews of infectious diseases*. 2 (1) : 40-56.
- Colman PM, Hoyne PA and Lawrence MC. (1993). Sequence and structure alignment of paramyxovirus Hemagglutinin-Neuraminidase with influenza virus Neuraminidase. *J. Virol.* 67 : 2972-2980.
- García Beato R, Martínez Y, Franci C, Real FX, García Barreno B, Melero JA. (1996). Host cell effect upon glycosylation and antigenicity of human respiratory syncytial virus G glycoprotein. *Virology* 221:301-309
- Govorkova EA, Murti G, Meignier B, de Taisne C, Webster RG. (1996). African green monkey kidney (Vero) cells provide an alternative host cell system for influenza A and B viruses. *J. Virol.* 70 (8) : 5519-5524.
- Kornfeld S, Li E and Tabas I. (1978). The synthesis of complex-type oligosaccharides. II. Characterization of the processing intermediates in the synthesis of the complex oligosaccharide units of the vesicular stomatitis virus G protein. *The journal of Biological Chemistry* vol. 253 : 21 pp. 7771-7778.
- Kluge JP, Beran GW, Hill HT, Platt KB. (1992). Pseudorabies (Aujeszky's disease). In : *Diseases of swine*, de Leman AD, Straw BE, Mengling WL et al pp 313 -323. Iowa State University Press, Ames, IA.
- Laemmli U k. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 227: 680.
- Lamb AR, and Kolakofsky D. (1996). Paramyxoviridae: The viruses and their replication. En: *Virology*. Eds. Fields BN, Knipe DM, Howley PM. et al., Third edition. Chapter 40. pp. 1177-1204. Lippincott- Raven publishers, Philadelphia.

Li Ellen Tabas Ira and Stuart Kornfeld, (1978). The synthesis of the complex-type oligosaccharides. 1. Structure of the lipid-linked oligosaccharide precursor of the complex-type oligosaccharides of the vesicular stomatitis virus G protein. *The journal of biological chemistry* vol 253 :21 November, pp 7762-7770.

Lis H and Sharon N. (1993). Protein glycosilation : structural and functional aspects. Review. *Eur. J. Biochem.* 218 : 1-27.

Marsh M and Helenius A (1988). Virus entry into animal cells. *Advances in Virus Research* 36, 107-149

Mbiguino A and Menezes J. (1991). Purification of human respiratory syncytial virus : superiority of sucrose gradient over percoll, renografin and metrizamide gradients. *Journal of Virological methods*, 31 : 161-170.

Montreuil J. (1984). Spatial structures of glycan chains of glycoproteins in relation to metabolism and function. Survey of a decade of research. *Pure Appl. Chem.* 56 : 859-877.

Moreno-López J, Correa-Girón P, Martínez A y Ericsson A. (1986). Characterization of a paramyxovirus isolated from the brain of a piglet in Mexico. *Arch Virol*; 91: 221.

Moscona A and Peluso R (1992). Fusion properties of cells infected with human parainfluenza virus type 3 : receptors requirements for viral spread and virus-mediated membrane fusion. *J. Virol.* 66 : 6280-6287.

Oakley BR., Kirsch DR. and Morris NR. (1980). A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem.* 105: 361-363.

Osawa T and Matsumoto Y. (1972). Corse (*Ulex europeus*) phytohemagglutin. *Methods Enzymol* 28: 323 - 327.

Peeples MF and Bratt MA (1984), Mutation in the matrix protein of Newcastle disease virus can result in decreased infectivity. *Journal of Virology* 51, 81-90.

Pomeroy C and Jordan MC. (1992). Mumps. En : Hoeprich PD and Jordan MC (Eds.) Infectious diseases 4th de. Raven press, New York. 798-804.

Ramírez MH, Hernández JP., Reyes LJ, Zenteno E., Moreno LJ, and Kennedy S. (1997). Lesions in the reproductive tract of boars experimentally infected with porcine rubulavirus. J. Comp. Path. 117, 237-252.

Reyes LJ, Hernández JP., Momntaño LF and Zenteno E. (1993). The porcine paramyxovirus LPM specifically recognizes sialyl (α 2,3) lactose-containing structures. Arch. Virol. 133 : 195-200.

Reyes LJ, Espinosa B., Hernández J, Zenteno R., Vallejo V., Hernández P and Zenteno E. (1997). NeuA α 2,3Gal-Glycoconjugate expression determines cell susceptibility to the porcine rubulavirus LPMV. Comp. Biochem. Physiol. 118B, (2) : 327-332.

Rima B., Alexander DJ., Billeter NA., Collins PL., Kingsbury DW., Lipkind MA., Nagay Y., Orwell C., Pringle CR., Meulen V., Family Paramyxoviridae. En Murphy FA., Fauquet CM., Bishop DHL et al. Eds. Virus Taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Viena. Nueva York : Springer-Verlang, 1995 : 268.

Roizman B and Palase Multiplication of viruses: An Overview, Chapter 4, (1996) Fields Virology. Third Edition,

Sharpe AH y Fields BN. (1985). Pathogenesis of viral infections. Basic concepts derived from the reovirus model. N. Engl. J. Med. 312 : 486-497.

Stephano HA y Gay M. (1983). El síndrome del ojo azul , estudio experimental. Memorias Reunión Nacional de Investigación Pecuaria en México, México D.F., p. 523-526.

Stephano HA y Gay M. (1985). Síndrome del ojo azul. En : Morilla A, Correa P y Stephano A (Eds.) Avances en las enfermedades del cerdo. De. AMVEC, México, D.F., p. 299-311.

Stephano HA, Gay M y Ramírez TC. (1988). Encephalomyelitis, reproductive failure and corneal opacity (blue eye) in pigs, associated with a paramyxovirus infection. Vet Rec; 122: 6-10.

- Stephano HA., Hernández D., Pérez C., González CT., Ramírez MH and Cervantes A. (1990). Boar infertility and testicular atrophy associated with blue eye paramyxovirus infection. Proc. 11th Congress, International pigs veterinary society, Lausanne, Suiza, p. 99.
- Schulze IT and Manger ID. (1992). Viral glycoprotein heterogeneity-enhancement of functional diversity. *Glycoconjugate Journal* 9 : 63 - 66.
- Sundquist A, Berg M, Hernández Jáuregui P, Linné T and Moreno-López J. (1990). The structural proteins of a porcine paramyxovirus (LPMV). *J. Gen. Virol.* 71 : 609-613.
- Sundqvist A, Berg M, Moreno-López J and Linné T. The haemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of the porcine paramyxovirus LPMV: comparison with other paramyxovirus revealed the closest relationship to simian virus 5 and mumps virus. *Arch Virol* 1992; 132:331.
- Tanabayashi K. and Compans WR. (1996). Functional interaction of Paramyxovirus glycoproteins: Identification of a domain in Sendai virus HN which promotes cell fusion. *Journal of Virology*, Vol. 70, No.9, pp. 6112-6118.
- Tanaka Y., Heminway RB. and Galinski SM. (1996). Down-regulation of paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein surface expression by a mutant fusion protein containing a retention signal for the endoplasmic reticulum. *Journal of Virology*. Vol. 70, No. 8 pp. 5005-5015.
- Tardieu M, Epstein RL and Weiner HL. (1982). Interaction of viruses with cell surface receptors. *Int. Rev. Cytol.* 80 : 27-61.
- Toshihiro Ito, Yasuo Suzuki, Lyndon Mitnaul, Angela Vines, Hiroshi Kida and Yoshihiro Kawaoka. (1997). Receptor specificity of Influenza A viruses correlates with the agglutination of erythrocytes from different animal species. *Virology.* 227, 493-499
- Thompson SD, Laver WG, Murti KG and Portner A. (1988). Isolation of a biologically active soluble form of the hemagglutinin-neuraminidase protein of Sendai virus. *J. Virol.*, (62) 12 4653-4660).

Ubol Sukathida and Griffin E Diane (1991). Identification of a putative alphavirus receptor on mouse neural cells. *Journal of Virology*. Vol. 65, No. 12, pp. 6913-6921.

Villar Enrique and Cabezas A José. (1993). Some comments on the importance of myxoviral glycoproteins. *Glycoconjugate Journal*, 10: 195.

Wild TF, Malvoisin E and Buckland R. (1991). Measles virus : both the haemagglutinin and fusion glycoproteins are required for fusion. *J. Gen. Virol.* 72 : 439-442.

Wybenga LE, Epand RF, Nir S, Chu JW, Sarom FJ, Flanagan TD, Epand RM. (1996). Glycophorin as a receptor for Sendai virus. *Biochemistry* 35 (29) : 9513-9518.

Zenteno R. Predicción de la estructura secundaria de la hemagglutinina-neuraminidasa del rubulavirus porcino LPM. Tesis de Maestría 1997.

Zenteno CR, Hernández J., Espinosa B., Reyes J. and Zenteno E. (1998). Secondary structure prediction of the hemagglutinin-neuraminidase from a porcine rubulavirus. *Arch. Virol.* 143 : 333-352.