

## Estructura, función e implicaciones patológicas de las proteínas del *Rubulavirus porcino*

Proteins of *Porcine rubulavirus*: Structure, function and pathological implications

G. SANTOS-LOPEZ<sup>1</sup>, Q.F.B., M. en C. Microbiol.; J. HERNANDEZ<sup>3</sup>, M.V.Z., M. en C. Fisiol., Dr. en C. Vet.; M. T. BORRAZ-ARGÜELLO<sup>1</sup>, Biol.; H. RAMIREZ-MENDOZA,<sup>2</sup> M.V.Z., M. en Prod. Animal, Dr. en C. Vet.; V. VALLEJO<sup>1</sup>, Biol., M. en C. Bioméd., PhD; J. REYES-LEYVA<sup>1\*</sup>, M.V.Z., M. en C. Bioméd., Dr. en C. Bioméd.

<sup>1</sup> Laboratorio de Virología, Centro de Investigación Biomédica de Oriente, Instituto Mexicano del Seguro Social; Hospital General de Zona No. 5, Km. 4.5 Carretera Federal Atlixco-Metepec; 74360 Metepec, Puebla, México.

<sup>2</sup> Dept. de Nutrición Animal, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Hermosillo, Son, México.

<sup>3</sup> Dept. Producción Animal Cerdos, Fac. de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

### SUMMARY

Viral infections constitute serious concerns for breeders and veterinarians world wide, so the knowledge of the virus structure and biological properties is of primary importance in the design of prophylactic and control strategies to combat viral diseases. The *Porcine rubulavirus* (PoRV) is the causal agent of "blue eye" disease of swine, an endemic disease in Mexico, that is characterized by fatal meningoencephalitis in piglets and reproductive failures with loss of fertility in adult pigs. PoRV is an enveloped virus with a negative single stranded RNA genome belonging to the *Paramyxoviridae* family. This virus possesses six structural and three non-structural proteins. Structural proteins play an important role in the virus infectious cycle, promoting both virus dissemination and damage to infected tissues, while some non-structural proteins play a regulatory role, inducing viral persistence and preserving the tissues integrity to assure the survival of virus progeny. The objectives of this review are 1) to analyze the structure and function of paramyxoviral proteins and 2) to illustrate their role on the pathological features of PRV infection.

*Palabras clave:* *Rubulavirus porcino*, virus LPM, síndrome del ojo azul, virus emergentes, meningoencefalitis, esterilidad.

*Key words:* *Porcine rubulavirus*, LPMV, blue eye disease, emerging viruses, meningoencephalitis, sterility.

### INTRODUCCION

La enfermedad del ojo azul de los cerdos es causada por el *Rubulavirus porcino* (RVP), también denominado virus del síndrome del ojo azul (VSOA) o virus de La Piedad Michoacán (VLPM). Esta enfermedad consiste en un complejo formado por alteraciones neurológicas, reproductivas y respiratorias acompañadas por

opacidad de la córnea (Moreno-López y col., 1986; Stephano y col., 1988).

La enfermedad del ojo azul se identificó inicialmente en granjas de La Piedad Michoacán, en 1980 (Stephano y col., 1981, citado en Stephano y col., 1988), de ahí se diseminó en pocos años a 16 estados del centro y noreste de la República Mexicana (Fuentes y col., 1992); actualmente, el mayor impacto económico se registra en los estados de Michoacán, Guanajuato y Jalisco, zona considerada endémica (Stephano, 1999). La detección de anticuerpos antivirales en bancos de sueros permitió identificar que el vi-

---

Aceptado: 23.03.2004.

\* correspondencia.

rus estaba presente en la zona de La Piedad Michoacán por lo menos desde 1972, aunque no hay registros de infecciones similares ocurridas en esas fechas (Rosales y col., 1988). El origen del virus es incierto; análisis filogenéticos muestran que el *Rubulavirus porcino* tiene un ancestro común a todos los paramixovirus, pero excluyen la posibilidad de que este virus sea una variante de algún otro rubulavirus (Berg y col., 1997; Svenda y col., 1997, 2002).

Los signos clínicos varían de acuerdo con la edad de los animales. En cerdos lactantes las manifestaciones nerviosas se presentan en forma progresiva, aguda y generalmente son fatales (Stephano y col., 1988). En los cerdos de 3 a 4 meses de edad las manifestaciones neurológicas son escasas y la tasa de mortalidad es baja. En cerdos adultos las lesiones se limitan al aparato reproductor: en las hembras se presentan abortos, aumento de mortinatos y reducción de la fertilidad; en machos se observa epididimitis, orquitis, atrofia testicular y una sensible pérdida de fertilidad (Stephano y col., 1988; Campos y Carvajal, 1989; Stephano, 1999; Ramírez-Mendoza y col., 1997). La opacidad corneal se presenta solamente en 1 a 10% de los animales infectados de cualquier edad (Stephano y col., 1988). En general, los parámetros productivos se ven gravemente afectados y las pérdidas económicas son cuantiosas.

Infecciones experimentales en cerdos machos adultos mostraron que el virus produce una inflamación severa en la cabeza del epidídimo, destrucción del epitelio tubular y formación de granulomas a partir del día 15 post-infección (p.i.). También se observó reducción en la motilidad y concentración de espermatozoides. Entre los días 30-45 p.i. se identificó la degeneración de túbulos seminíferos con infiltración linfocitaria que condujo a atrofia testicular (Ramírez-Mendoza y col., 1997).

En otro estudio se infectaron 9 hembras a las 6 y 10 semanas de gestación. Ninguna de las hembras infectadas mostró cambios clínicos a lo largo del experimento; sin embargo, todas desarrollaron anticuerpos contra el virus a los 16 días p.i. Congestión local y hemorragias de la placenta y endometrio fueron observadas en 2 hembras

inoculadas a las 10 semanas de gestación. Los fetos disminuyeron de tamaño y presentaron hemorragias difusas en la piel, deshidratación y autólisis. Fetos momificados fueron encontrados en 6 de las 9 hembras infectadas. No se encontraron momias en las cerdas no infectadas. El virus fue aislado del pulmón, tonsila y ovario de las hembras infectadas, así como del cerebro, pulmón e hígado de los fetos (Hernández-Jáuregui, 2003).

## ESTRUCTURA VIRAL

Con base en sus características biológicas y estructurales (Moreno-López y col., 1986; Stephano y col., 1988) y por su similitud genómica con los virus de la parotiditis humana (VPH), los virus de parainfluenza humana 2 y 4 y el virus 5 de simio (Sundqvist y col., 1991; Berg y col., 1991, 1992) el virus de la enfermedad del ojo azul se clasificó en el orden *Mononegavirales*, familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Paramyxovirinae*, género *Rubulavirus*, especie *Rubulavirus porcino* (cuadro 1) (Rima y col., 1995; Mayo, 2002). Este virus no presenta reacción antigénica cruzada con los virus parainfluenza 1, 2, 3 y 4, con los virus de la enfermedad de Newcastle, del sarampión, el sincicial respiratorio ni con el virus de la parotiditis (Moreno-López y col., 1986; Stephano, 1999). Al microscopio electrónico se observan viriones pleomórficos, la mayoría esféricos de 180 a 300 nm de diámetro, formados por una nucleocápside helicoidal protegida por una envoltura lipoproteica (Moreno-López y col., 1986), que presenta prolongaciones de 8-12 nm, que corresponden a las glicoproteínas HN y F responsables de las actividades hemaglutinante, hemolítica, de neuraminidasa y formadora de sincicios observadas en el *Rubulavirus porcino* (Moreno-López y col., 1986; Reyes-Leyva y col., 1999) (figura 1a).

La información genética del RVP está contenida en una molécula de ácido ribonucleico (ARN) de cadena negativa, es decir, su orientación es contraria a la del ARN mensajero. A partir de esta molécula se sintetiza una cadena de ARN de sentido positivo que actúa como molde

**CUADRO 1. Estructura taxonómica del orden *Mononegavirales*****Taxonomic structure of order *Mononegavirales***

Familia	Subfamilia	Género	Virus de Interés
<i>Paramyxoviridae</i>	<i>Paramyxovirinae</i>	<i>Respirovirus</i> <i>Morbillivirus</i> <i>Rubulavirus</i> <i>Henipavirus</i> <i>Avulavirus</i>	<i>V. Sendai</i> , <i>Parainfluenza (PI) 1, 3</i> <i>V. Sarampión</i> , <i>Moquillo</i> <i>V. Parotiditis, PI 2, 4, RVP</i> <i>V. de Nipah</i> , <i>Hendra</i> <i>V. de la enfermedad de Newcastle</i>
	<i>Pneumovirinae</i>	<i>Pneumovirus</i> <i>Metapneumovirus</i>	<i>V. sincitial respiratorio</i> <i>V. de la rinotraqueitis del pavo</i>
<i>Rhabdoviridae</i>		<i>Vesiculovirus</i>	<i>V. de la estomatitis vesicular</i>
		<i>Lyssavirus</i>	<i>V. de la rabia</i>
		<i>Ephemerovirus</i>	<i>V. de la fiebre efímera bovina</i>
		<i>Cytorhabdovirus</i>	<i>V. de la necrosis de la lechuga</i>
		<i>Nucleorhabdovirus</i>	<i>V. de la papa enana amarilla</i>
<i>Filoviridae</i>		<i>Marburgvirus</i>	<i>V. de Marburg</i>
		<i>Ebolavirus</i>	<i>V. de Ebola</i>
<i>Bornaviridae</i>		<i>Bornavirus</i>	<i>V. de Borna</i>

Modificado de Rima y col., 1995, y Mayo, 2002.

Adapted from Rima *et al.*, 1995 and Mayo, 2002.

para la replicación. El virus posee 6 genes que codifican 10 proteínas con funciones estructurales, reguladoras y enzimáticas. La organización del genoma es la siguiente: 3' NP-P-M-F-HN-L 5' (figura 1b); esta secuencia y las regiones intergénicas (segmentos de 1 a 47 nucleótidos) son similares en todos los miembros del género *Rubulavirus* (Linné y col., 1992; Lamb y Kolakofsky, 1996). Cada gen codifica una proteína, excepto el gen F, que codifica el polipéptido F<sub>0</sub> que es dividido por una proteasa celular en las proteínas F<sub>1</sub> y F<sub>2</sub> (Berg y col., 1997), y el gen P que codifica las proteínas P, I, V y C, que se expresan por edición del ARN mensajero (Berg y col., 1992) (cuadro 2).

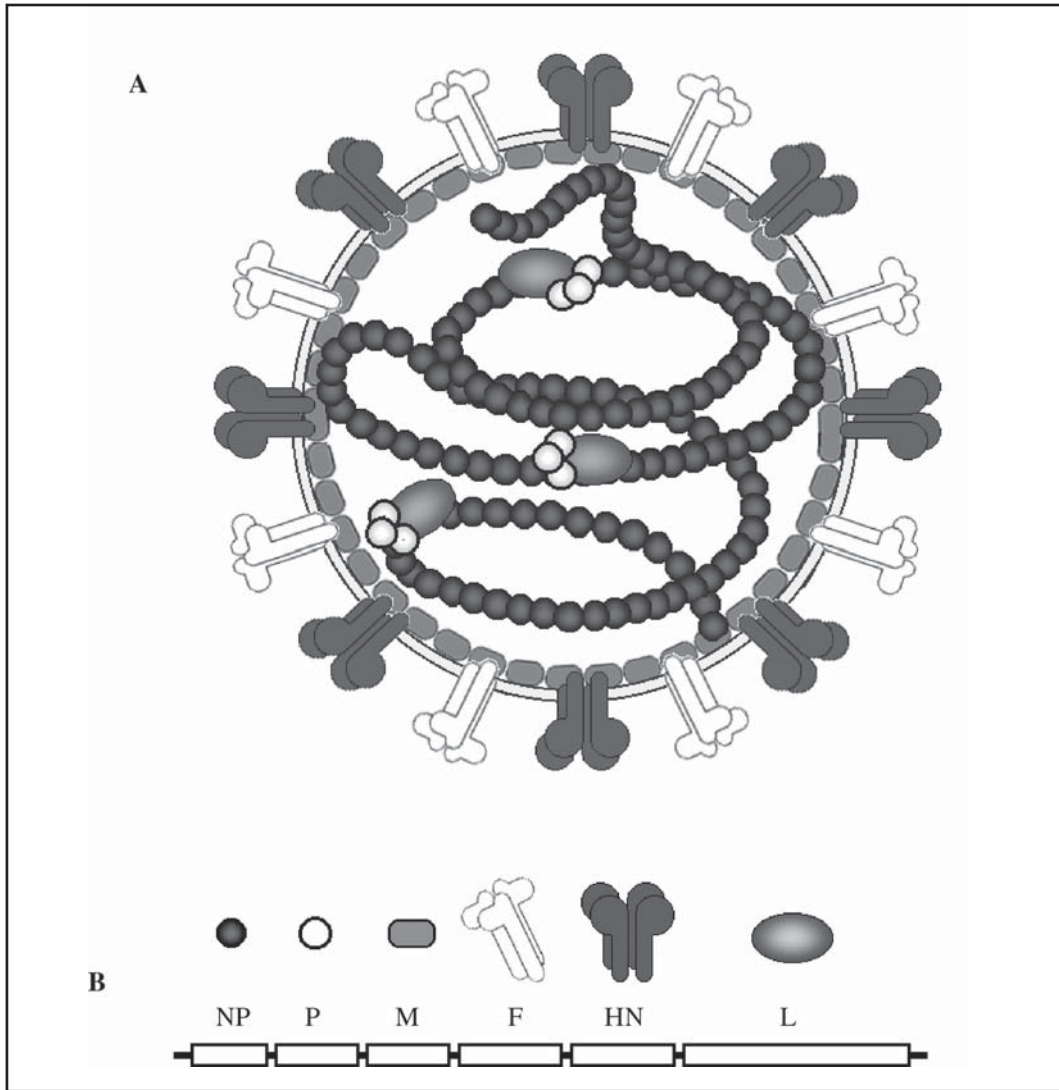
El RVP conserva de 41-47% de identidad en secuencia genética con el virus de la parotiditis humana (Sundqvist y col., 1991; Berg y col., 1991, 1992, 1997; Svenda y col., 1997); esto influye para que ambos virus presenten similitudes en actividades biológicas y en características patológicas, pero las similitudes más importantes se refieren a su afinidad y tropismo tisular.

Así estos dos virus comparten su afinidad por el sistema nervioso central, por órganos del aparato reproductor femenino y masculino, por tejido glandular y por células y tejidos linfáticos (Stephano y col., 1988; Allan y col., 1996; Ramírez-Mendoza y col., 1997; Ramírez-Herrera y col., 1997; Hernández y col., 2002; Wolinsky, 1996).

#### PROTEINAS DE LA ENVOLTURA VIRAL

La membrana del RVP presenta tres tipos de proteínas: las glicoproteínas HN y F son de transmembrana con dominios activos en el exterior del virión y la proteína M asociada a la parte interna de la membrana.

La glicoproteína HN de los paramixovirus es responsable de reconocer el receptor y de la adhesión a las células blanco de la infección. La HN es una proteína multifuncional que presenta actividad hemaglutinante, neuraminidasa y promotora de fusión de las membranas viral y celular (Ebata y col., 1991; Sergel y col., 1993;



**FIGURA 1. a)** Esquema del RVP y sus proteínas constituyentes. En la superficie de la membrana viral se encuentran las glicoproteínas transmembranales HN y F, en la parte interna de la misma se halla la proteína de matriz M. Intimamente ligada a la cadena de ARN se encuentran las nucleoproteínas (NP) que conforman la nucleocápside helicoidal y las proteínas P y L que forman el complejo con actividad polimerasa del virus (Modificado de acuerdo con Markwell y Fox, 1980; Rima y col., 1995; Lamb y Kolakofsky, 1996; Hjertner, 1997; Reyes-Leyva y col., 2002); **b)** Mapa genómico del RVP. El virus posee un genoma monocatenario de ARN negativo, formado por seis genes separados por regiones intergénicas de longitud variable (1 - 47 nucleótidos) (Linné y col., 1992).

**a)** PoRV and its proteins. In the virus membrane (envelope) are inserted the transmembrane HN and F glycoproteins, on the inner face is located the matriz (M) protein, which maintains an intimate contact among the nucleocapsid and glycoproteins. The genomic RNA is protected by the nucleoprotein (NP) and have an helical structure, which is also associated with the P and L proteins. These last proteins constitute the viral polymerase complex (Adapted from Markwell and Fox, 1980; Rima *et al.*, 1995; Lamb and Kolakofsky, 1996; Hjertner, 1997; Reyes-Leyva *et al.*, 2002); **b)** Genomic map of PoRV. This virus possesses a negative single stranded RNA genome which contain six genes separated by variable length intergenic regions (1-47 nucleotides) (Linné *et al.*, 1992).

**CUADRO 2. Genes y proteínas del *Rubulavirus porcino*****Genes and proteins of *Porcine rubulavirus***

Gen	Péptido	Nombre	Masa molecular	Características, ubicación y actividades relacionadas
NP	NP	Nucleoproteína	68	Proteína de la nucleocápside. Función estructural, protección del genoma y conformación tridimensional del sustrato de la polimerasa.
P	P	Fosfoproteína	52	Asociada a la nucleocápside. Forma el complejo polimerasa con la proteína L.
V	V		N.D.	Proteína no estructural. Actividad inhibitoria sobre el complejo polimerasa viral. Inhibición de la cascada de señales activada por INF $\gamma$ .
C	C		N.D.	Proteína no estructural. Actividad inhibitoria sobre el complejo polimerasa viral. Inhibición de la cascada de señales activada por INF $\gamma$ .
I	I		N.D.	Proteína no estructural. Función desconocida.
M	M	Proteína de Matriz	40	Proteína asociada a la membrana. Participa en el ensamble de los viriones.
F	F <sub>1</sub>	Proteína de Fusión	59	Glicoproteína transmembranal. Péptido de fusión de membranas viral y celular, hemólisis, formación de sincitios.
	F <sub>2</sub>		12	Glicoproteína externa de membrana. Asociada a F2 mediante enlace disulfuro.
HN	HN	Hemaglutinina-Neuraminidasa	66	Glicoproteína transmembranal. Reconocimiento del receptor celular y adherencia. Hidrólisis de ácido siálico, promoción de la fusión membranal célula-virus.
L	L	Proteína de alto peso molecular	200	Enzima asociada a la nucleocápside. Componente catalítico del complejo polimerasa formado con la proteína P. Transcripción y replicación.

Datos tomados de Morrison y Portner, 1991; Lamb y Kolakofsky, 1996; Svenda y col., 2002.

These data were taken from Morrison and Portner, 1991; Lamb and Kolakofsky *et al.*, 1996; Svenda *et al.*, 2002.

Lamb, 1993). Esta proteína forma dímeros y tetrámeros que exponen varios sitios de unión al receptor celular sobre la membrana viral (Markwell y Fox, 1980, Reyes-Leyva y col., 2002). El análisis del ADN complementario del gen HN del RVP mostró que codifica una proteína de 576 aminoácidos, con un dominio hidrofóbico cercano a la región amino terminal, por la que se ancla a la membrana viral, y con cuatro sitios potenciales de N-glicosilación (Sundqvist y col., 1991).

El análisis de la glicoproteína HN, purificada mediante centrifugación diferencial en gradientes de sacarosa y cromatografía de intercambio iónico, permitió determinar que está compuesta

por 50.5, 13.3 y 13.6% de aminoácidos no polares, polares sin carga y polares cargados. Su fracción glicosídica está constituida por manosa, galactosa, N-acetilgalactosamina y N-acetilglucosamina en proporciones de 3:3:2:1 respectivamente, así como trazas de ácido N-acetilneuramínico (Reyes-Leyva y col., 1999). Lo que muestra la proporción y los constituyentes típicos de una proteína N-glicosilada, coincidiendo con las predicciones de composición peptídica y de N-glicosilación basadas en la secuencia genética (Sundqvist y col., 1991; Zenteno-Cuevas y col., 1998). No obstante, la proporción encontrada de N-acetilgalactosamina sugiere que esta proteína también podría estar O-glicosilada.

En relación a su actividad, la glicoproteína HN aglutina eritrocitos de una gran variedad de especies animales, incluyendo cerdo, carnero, vaca, perro, conejo, ratón, rata, hámster, cobayo, pollo y humano tipos A, B, y O (Stephano y col., 1988; Moreno-López y col., 1986; Reyes-Leyva y col., 1993). Esto se debe al reconocimiento específico de ácidos siálicos expresados en las superficies de todos estos eritrocitos. Al respecto, hemos demostrado, en ensayos de competencia con diversos azúcares, que la proteína HN posee mayor afinidad por residuos de ácido N-acetilneuramínico unidos por enlace glicosídico alfa 2-3 a galactosa (NeuAc $\alpha$ 2,3Gal), los cuales inhiben su actividad hemaglutinante (Reyes-Leyva y col., 1993, 1999). La proteína HN posee también actividad neuraminidasa o sialidasa que le permite hidrolizar los residuos de ácido siálico de los receptores celulares; esta actividad se realiza a un pH de 3.3 y es muy estable en un rango de temperatura de 30-55°C (Santos-López y col., 2004).

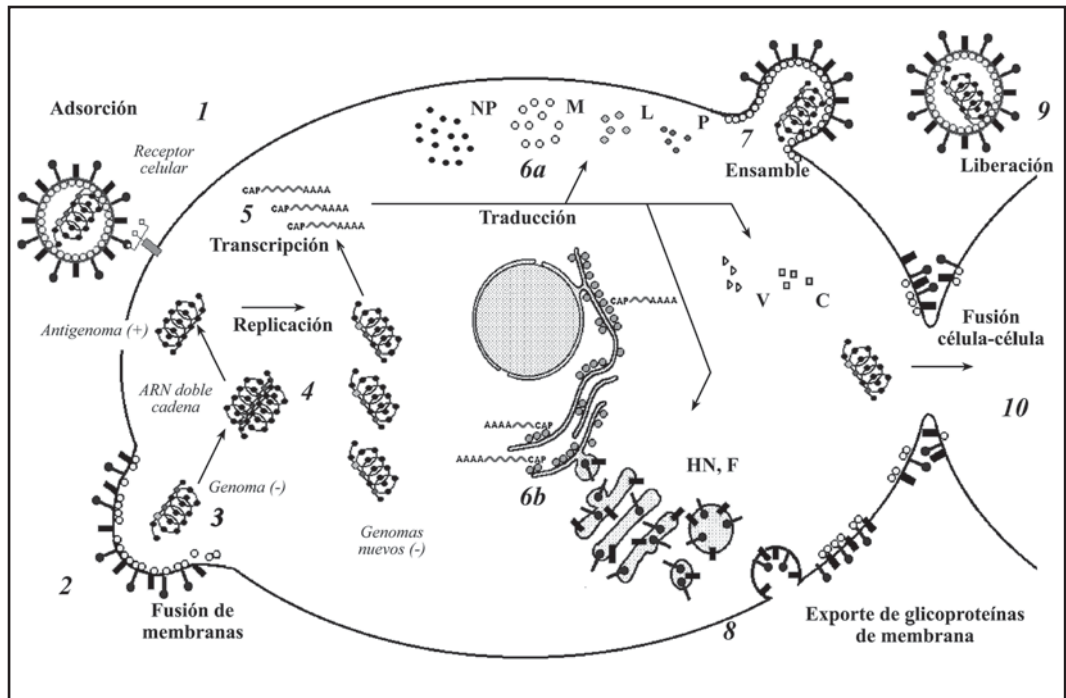
La expresión de glicoconjugados con NeuAc $\alpha$ 2,3Gal es determinante de la susceptibilidad a la infección por el RVP en cultivos celulares. La competencia por el receptor con lectinas (proteínas que reconocen carbohidratos) específicas para este oligosacárido terminal, así como inhibidores de la glicosilación como la dexametasona, que favorece la expresión de ácido neuramínico en enlace  $\alpha$ 2.6 en lugar de  $\alpha$ 2.3, lograron bloquear la unión del virus al receptor celular y evitar así la infección, confirmando la importancia del ácido siálico en posición  $\alpha$ 2.3 para que la infección se lleve a cabo exitosamente (Reyes-Leyva y col., 1997).

Hemos identificado una estrecha relación entre la expresión tisular de NeuAc $\alpha$ 2,3Gal en cerdos sanos (Vallejo y col., 2000) con los sitios de replicación viral identificados en cerdos infectados natural y experimentalmente (Allan y col., 1996; McNeilly y col., 1997; Ramírez-Mendoza y col., 1997). Los datos indican que las diferencias patológicas entre distintos grupos de edad se deben en parte a la expresión diferencial de NeuAc $\alpha$ 2,3Gal en los tejidos, ya que se encuentra una mayor proporción de este oligosacárido en el sistema nervioso central de cerdos neonatos

y en el sistema reproductor de cerdos adultos que en otros tejidos. Las diferencias en la expresión tisular de ácidos siálicos parecen guardar una relación con cambios hormonales durante el proceso de maduración de los animales (Vallejo y col., 2000; Reyes-Leyva y col., 2002).

La glicoproteína F es muy conservada entre los miembros de la familia *Paramyxoviridae* y otras familias de virus formados por ARN de cadena negativa. Esta proteína tiene un dominio altamente hidrofóbico que participa en la fusión de la membrana celular y la envoltura viral, lo que permite que el virus se introduzca al citoplasma y que se difunda de célula a célula sin exponerse al medio extracelular (figura 2). Esta característica origina la formación de células gigantes multinucleadas (sincicios) apreciables en tejidos y en cultivos celulares infectados por paramixovirus (Morrison y Portner, 1991). La proteína F es sintetizada como un precursor inactivo llamado F<sub>0</sub>, que por acción de una proteasa celular del tipo de la tripsina da origen a dos polipéptidos (F<sub>1</sub> y F<sub>2</sub>) unidos por un enlace disulfuro que constituyen la proteína activa (Sheid y Choppin, 1974). El procesamiento proteolítico expone un segmento altamente hidrofóbico en el extremo N-terminal de la subunidad F<sub>1</sub>, implicado directamente en el ataque inicial a la membrana celular para dar lugar a la fusión (White, 1990).

Se ha propuesto que la proteína F debe ser activada de alguna forma por la HN para que el evento de fusión de membranas se desencadene. En estos eventos están relacionados dominios cercanos a la membrana viral, donde se encuentran motivos de unión proteína-proteína (Deng y col., 1995; Hu y col., 1992; Stone-Hulslander y Morrison, 1999; Tsurudome y col., 1995). Al parecer, durante la interacción con los receptores celulares la HN sufre un cambio de conformación que permite contactar un dominio de la proteína F, que a su vez expone el péptido hidrofóbico involucrado directamente en el ataque a la membrana celular, para iniciar de esta forma la introducción a la célula hospedera. Esta interacción F-HN es específica de especie viral, ya que se ha observado que la coexpresión en cultivos celulares de proteínas de distintos



**FIGURA 2. Representación gráfica del ciclo de los paramixovirus.** La partícula viral se adsorbe en la membrana de la célula hospedera por medio de la proteína HN, que reconoce como receptor específico el oligosacárido NeuAc $\alpha$ 2,3Gal (1). Un cambio conformacional de la HN activa la proteína F, la cual lleva a cabo la fusión de las membranas celular y viral (2), provocando que el ARN viral sea liberado en el citoplasma (3). En este punto comienza, por un lado, la síntesis de ARN antígeno (cadena complementaria al genoma), la cual da origen a genomas nuevos (4), y por otro lado, a la producción de ARN mensajero (5), que codifica para las proteínas virales (6a). Los productos de la traducción se dirigen al sitio de ensamble, las proteínas NP, P y L son acopladas al ARN recién sintetizado y la proteína M se ubica en la parte interna de la membrana celular (7). Las glicoproteínas (HN y F), sintetizadas en retículo endoplásmico, son modificadas en aparato de Golgi (6b) y posteriormente expresadas en la membrana citoplásmica, en contacto íntimo con la proteína M (8). La afinidad de las proteínas del genoma (NP, P y L) con la proteína de matriz y de ésta con las glicoproteínas es determinante para el ensamble del virión, que es liberado de la célula por exocitosis (9). Es característico en los paramixovirus que además de la formación de viriones, los virus pueden infectar las células inmediatamente vecinas a través de la fusión membranal célula-célula, debido a la expresión de las proteínas virales en la membrana de la célula hospedera (10), lo cual le permite dispersarse sin necesidad de salir al medio extracelular (Modificado de Lamb y Kolakofsky, 1996, y Reyes-Leyva y col., 2002).

**Graphic representation of the cycle of paramyxoviruses.** The virus particle is adsorbed on the cellular membrane by means of the HN protein, which recognizes as specific receptor the oligosaccharide NeuAc $\alpha$ 2,3Gal (1). A conformational change in HN seems to cause the activation of the F protein and then the membrane fusion is carried out (2) internalizing the virus genome in the cytoplasm (3). Once the genome is inside the cell, it begins the synthesis of antigenomic RNA (a positive + complementary copy of the genome) which serves as an intermediate in the genomic RNA (-) replication (4). Messenger RNAs for each protein are synthesized from genomic RNA (5). The translation products become either soluble (6a) or endoplasmic reticulum associated (glycoproteins) (6b), they are transported to the assembling sites (7), where the M protein plays a decisive role in the assembly of virions, by electrostatic interactions with the transmembrane glycoproteins and nucleocapsid (8). Later, virions are released by exocytosis (9). Additionally, the virus particles can be disseminated to neighboring cells by means of cell-cell membrane fusion, due to the expression of glycoproteins on infected cell membrane and receptors in the others (10) in this form viruses avoid exposition to unfavorable environment (Adapted from Lamb and Kolakofsky, 1996 and Reyes-Leyva *et al.*, 2002).

paramixovirus no producen fusión celular (Deng y col., 1995).

La proteína M se localiza en la parte interna de la envoltura viral, está constituida por 369 aminoácidos, gran parte de los cuales son de carácter básico (Berg y col., 1992). Debido a su carga neta positiva tiene gran afinidad por la NP, característica importante que le permite intervenir en el ensamble de la partícula viral con un reducido gasto energético, interactuando con las nucleocápsides en las zonas de la membrana celular donde se están expresando las glicoproteínas virales (Sanderson y col., 1993). La proteína M es importante en el mantenimiento de la estructura del virión, ya que forma una especie de puente entre la nucleocápside y la envoltura viral; además, se ha propuesto que juega un papel regulador de la transcripción, probablemente por obstaculizar la acción de la polimerasa sobre el genoma viral durante el ensamble de viriones (Lamb y Kolakofsky, 1996).

#### PROTEINAS ASOCIADAS A LA NUCLEOCAPSIDE

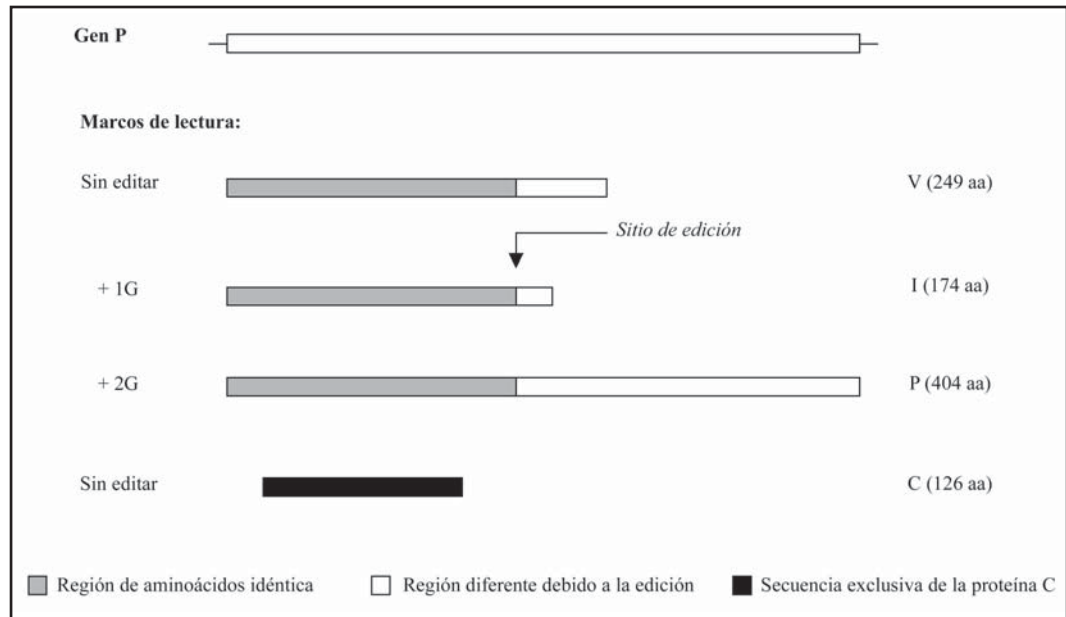
La nucleoproteína (NP) forma parte integral de la nucleocápside y rodea al ARN genómico en todo su contorno helicoidal. Tiene función estructural y proporciona una conformación adecuada a la cadena de ARN genómico durante su transcripción y replicación (Kolakofsky y col., 1998). Cada molécula de NP está asociada a seis nucleótidos y se propone que ésta es la razón por la que solamente los genomas paramixovirales, que poseen un número de nucleótidos múltiplo de seis, son replicados eficientemente (Calain y Roux, 1993; Kolakofsky y col., 1998). La unión de la NP al genoma es de una afinidad muy alta y no se separan durante la replicación ni la transcripción, así que, a diferencia de los virus de ARN positivo, el genoma de los virus de ARN negativo nunca se encuentra desnudo (Kolakofsky y col., 1998).

A la nucleocápside se asocian aproximadamente cincuenta complejos con actividad de polimerasa que se encargan de la transcripción y replicación del genoma viral. Cada complejo está formado por tres unidades de la proteína P y una de la proteína L, aunque también se puede pre-

sentar el mismo número de complejos de proteína P sin la proteína L (Kolakofsky y col., 1998). El gen P puede dar origen a cuatro productos: P, V, I y C. La proteína V, de 249 aminoácidos, es codificada por una copia exacta del gen P. La adición de dos guanidinas no codificadas, entre las posiciones 586 a 591 de la secuencia genómica, permite que el marco de lectura se alargue para dar lugar a la expresión de la proteína P, de 404 aminoácidos. El marco de lectura que da origen a la proteína I se forma de manera similar al de la proteína P, sólo que en lugar de añadir dos guanidinas se añade una, lo que ocasiona que el marco de lectura termine antes que cualquiera de los otros dos, originando un péptido de 174 aminoácidos. Por último, la proteína C (126 aminoácidos) se codifica en un marco de lectura más pequeño contenido dentro de los tres anteriores (figura 3). De esta manera se puede observar que las proteínas V, P e I poseen un dominio idéntico en el extremo amino de 168 aminoácidos (Berg y col., 1992).

Datos experimentales muestran que las proteínas V y C de los paramixovirus están involucradas en la regulación de la replicación y la transcripción viral (Curran y col., 1991 y 1992; Kato y col., 1997; Hjertner y col., 1998a y b) y en la inhibición de las cascadas de activación del interferón en la célula hospedera como respuesta a la infección (Didcock y col., 1999a, b). Estas evidencias se discuten más adelante en esta revisión.

La proteína L es la más voluminosa del virión y es el componente catalítico de la ARN polimerasa (Svenda y col., 1997). La proteína L del RVP, y de los paramixovirus en general, guarda gran homología en función con la proteína L del *Virus de la estomatitis vesicular* (VSV), miembro de la familia *Rhabdoviridae* (Svenda y col., 1997). Las funciones de la proteína L del VSV se han estudiado intensamente, entre ellas se encuentran actividades catalíticas en la síntesis de ARN genómico y mensajero, actividades de metiltransferasa (Hercyk y col., 1988), de cinasa (Sánchez y col., 1985) y de poliadenil sintetasa (Hunt y Hutchinson, 1993). La gran similitud en secuencia genética entre la proteína L del VSV y la de los paramixovirus sugiere que



**FIGURA 3. Edición cotranscripcional del gen P.** Los paramixovirus poseen un característico proceso de edición en el gen P, que consiste en la adición de una o dos guanidinas (G) que no se encuentran codificadas en la secuencia génica. La adición de estos nucleótidos ocurre en un sitio con la secuencia UUUAAGAGGGGGG, conservado en muchos miembros de la familia y que en el caso del RVP se sitúa entre los nucleótidos 579 a 591. La inserción de los nucleótidos se lleva a cabo en cualquier posición entre las últimas G de la secuencia mencionada, por lo que el proceso es denominado “tartamudeo” de la polimerasa. Originalmente existe un marco de lectura que codifica la proteína V. Cuando es agregada 1 G, este marco de lectura se acorta para dar origen a la proteína I, mientras que al agregarse 2 G, el codón de terminación se desplaza produciendo un marco de lectura más largo que da origen a la proteína P. La proteína C puede ser traducida en cualquiera de los mensajeros, ya sea editados o no, porque su marco de lectura se encuentra en cualquiera de ellos y no es modificado por el proceso de edición (Berg y col., 1992; Linné y col., 1992).

**Co-transcriptional edition of the P gene.** PoRV, like other *Paramyxoviridae* members, possesses a typical edition process in the P gene, which consist in the addition of 1 or 2 G nontemplated nucleotides. This nucleotides are added in the 579-591 site of P gene, where is located the sequence UUUAAGAGGGGGG conserved in all the viruses of the family. Nontemplated G residues are inserted between the others G's in the sequence, in a process so-called “polymerase stuttering”. In the non-edited P gene there is one open reading frame (ORF) that codes for the V protein. When 1 G is added this ORF is shortened to originate the I protein mRNA; however, when 2 G are added the end codon is displaced far from, producing a longer ORF which originates the P protein. The C protein can be translated by anyone of these mRNA, since its ORF is present in all they and the edition process don't modify its sequence (Berg *et al.*, 1992; Linné *et al.*, 1992).

estas proteínas podrían tener las mismas funciones. Estas actividades explican por qué los paramixovirus realizan sus ciclos completos de replicación en citoplasma sin necesidad de ingresar al núcleo, ya que la proteína L proveería de actividades de replicación del genoma completo para dar origen a nuevas partículas virales, síntesis de ARN mensajero para expresar sus genes, así como modificación de los mismos: metilación en su extremo 5' y poliadenilación en el extremo

3' para que estos funcionen en forma similar a los ARN mensajeros celulares.

Recientemente se demostró la interacción de las proteínas V y P con la NP y la proteína L del *Rubulavirus porcino*. En estos ensayos se observó que la unión de V y P a la NP se lleva a cabo por medio de su extremo carboxilo terminal y que el extremo amino, que es común en ambas proteínas, es el que interacciona directamente con la proteína L (Svenda y col., 2002). Sin embar-

go, poco se sabe del papel que juegan los complejos P-L y V-L en los procesos de transcripción y replicación viral. Se ha propuesto que P es un factor que promueve la transcripción y que V actúa como regulador (Lamb y Kolakofsky, 1996).

## TROPISMO Y SUSCEPTIBILIDAD TISULAR

Diversos reportes de infecciones experimentales con el RVP coinciden en que el aislamiento y la determinación de antígeno viral en los cerdos infectados son esencialmente en sistema nervioso central de neonatos (Stephano y col., 1988; Allan y col., 1996; McNeilly y col., 1997; Ramírez-Herrera y col., 1997) y en aparato reproductor de cerdos adultos (Stephano y col., 1988; Campos y Carvajal., 1989; Ramírez-Mendoza y col., 1997; Reyes-Leyva y col., 2002). La infección experimental con la cepa LPM del *Rubulavirus porcino* en cerdos de 3 días de edad produjo signos neurológicos severos, muriendo a los 8 días p.i. En contraste, los cerdos de 17 días mostraron cierta resistencia y solamente el 30% de ellos presentó signos nerviosos (Allan y col., 1996). Las infecciones experimentales en cerdos de más de 20 días de edad con la cepa LPM no han mostrado la severidad de los cuadros neurológicos observados en los animales más jóvenes, o definitivamente no han mostrado ningún signo clínico (Moreno-López y col., 1986; Allan y col., 1996; Ramírez-Mendoza datos no publicados). La distribución del antígeno viral detectado por inmunofluorescencia en los tejidos de los animales infectados por vía intranasal sugiere que el RVP ingresa por el nervio olfatorio hacia el sistema nervioso central (Allan y col., 1996; Ramírez-Herrera y col., 1997). Estos resultados correlacionan directamente con la distribución de la molécula reconocida en forma específica por la proteína HN (NeuAc $\alpha$ 2,3Gal) en los cerdos neonatos y lactantes, en los que el nervio olfatorio expresa una gran cantidad de este carbohidrato (Vallejo y col., 2000), lo cual refuerza la hipótesis de que en forma natural la entrada del virus es por vía nasal (Hernández-López y col., 1997).

La expresión de NeuAc $\alpha$ 2,3Gal parece ser determinante también de la susceptibilidad a la infección en el aparato reproductor de cerdos adultos (Vallejo y col., 2000). Durante una infección experimental con la cepa PAC3 (Jalisco/1993) en cerdos machos adultos se logró detectar al antígeno viral en el epidídimo, testículos y próstata hasta por 70 días p.i., lo que sugiere que el virus puede ser excretado con el semen y que podría transmitirse la enfermedad del ojo azul por vía venérea (Ramírez-Mendoza y col., 1997).

Recientemente se detectó la presencia transitoria del virus en células sanguíneas de cerdos infectados experimentalmente, en la primera semana p.i., asociado a la superficie de eritrocitos y posteriormente localizado en el interior de leucocitos (Reyes-Leyva y col., 2004). Esto último coincide con la identificación de antígeno viral en el interior de monocitos infiltrados en el epidídimo de cerdos infectados a las 7 semanas p.i. (Ramírez-Mendoza y col., 1997). Se ha demostrado que la infección de células inmunes juega un papel importante en la diseminación sistémica de otros paramixovirus (Katz, 1994; Wolinsky, 1996).

## PAPEL DE LAS PROTEINAS VIRALES EN LA PERSISTENCIA VIRAL

La persistencia se refiere a la presencia de partículas virales en un organismo o tejido durante períodos relativamente largos, comparados con el tiempo que permanecen durante una infección lítica aguda. Durante todo este tiempo los virus presentan un bajo nivel de replicación y la infección puede pasar clínicamente desapercibida. Sin embargo, en algún momento la población viral puede volver a desencadenar una infección lítica, debido a múltiples factores. Tanto en un estado como en otro, un elemento muy importante es la baja expresión o mal funcionamiento de algunas proteínas virales.

Recientemente se demostró la persistencia del RVP en el sistema nervioso central de cerdos convalecientes a la infección natural (Cuevas-Romero, 2002) y experimental (Wiman y col., 1998). En este fenómeno de persistencia, que

parece ser común entre los paramixovirus, se han involucrado distintos mecanismos como la producción de partículas virales defectuosas, que no poseen un genoma completo y no son replicadas eficientemente (Lazzarini y col., 1981; Murphy y col., 1987), por lo que compiten con el genoma viral completo, por la polimerasa, evitando así que la replicación viral alcance un nivel óptimo (Hjertner, 1997). Se ha observado que la expresión de proteínas virales funcionalmente deficientes son importantes para el establecimiento de una infección persistente; por ejemplo, una proteína F defectuosa es responsable de disminuir los patrones de fusión celular durante la infección por virus del sarampión (Hummel y col., 1994). En otro estudio con el virus del sarampión se reportó que una cepa persistente reduce la expresión de las proteínas P, M y H (Celma y Fernández-Muñoz, 1992). Otros trabajos involucran a la proteína M, que muestra disfunciones en virus aislados de pacientes con panencefalitis esclerosante subaguda (Rima y col., 1994), y a la proteína V, cuya ausencia en cultivos celulares aumenta la virulencia del virus Sendai (Kato y col., 1997).

Por otro lado, cuando la HN incrementa su actividad de neuraminidasa promueve la persistencia del virus parainfluenza 3 en cultivos celulares. Observaciones realizadas en virus con una actividad de neuraminidasa alta sugieren que la proteína HN expresada en la membrana de células infectadas hidroliza el ácido siálico de las células vecinas, reduciendo la cantidad necesaria de receptores para que el virus pueda introducirse a la otra célula en forma efectiva (Moscona y Pelusso, 1991).

La falta de respuesta inmune citotóxica también se ha involucrado en el desarrollo de infecciones persistentes (Rima y col., 1994; Murphy, 1994); un fenómeno importante para este efecto es la reducción en los niveles de expresión de las proteínas virales expresadas en la superficie de las células hospederas (Smith, 1994).

La inducción de la persistencia *in vitro* del RVP se ha llevado a cabo en células PK-15, mostrando la presencia de ARN subgenómico y una gran disminución en el transcrito del gen L, componente catalítico de la polimerasa. Se observó también un ligero descenso del ARN mensajero

de la proteína P, acompañado por elevación de la proteína V (Hjertner y col., 1998a y b). La proteína V ha sido relacionada con la regulación negativa de la transcripción y replicación, originando que los virus sean menos nocivos para las células (Curran y col., 1991; Kato y col., 1997). *In vivo* el RVP fue capaz de permanecer en cerdos convalecientes a una infección experimental por períodos relativamente largos. El ARN viral pudo detectarse en cerebro y pulmón mediante ensayos de hibridación con sondas de ARN, después que los cerdos convalecientes fueron inmunosuprimidos (Wiman y col., 1998). Tales hallazgos sugieren que el RVP, como la mayoría de los paramixovirus, es capaz de permanecer por períodos prolongados produciendo una infección persistente subclínica en el hospedero; este hecho puede tener un peso epidemiológico importante en la enfermedad, ya que un animal infectado asintomático puede servir como reservorio y fuente de infección para otros cerdos. La importancia de la persistencia viral en la diseminación de la enfermedad ha sido confirmada recientemente en cerdos convalecientes a la infección natural que transmitieron el virus a cerdos centinelas durante la fase subclínica de la enfermedad (Cuevas-Romero, 2002).

## ASPECTOS INMUNOLOGICOS

Con relación a la respuesta inmune humoral, se ha demostrado la producción de anticuerpos en los cerdos infectados naturalmente, los cuales pueden permanecer por lo menos durante año y medio en los animales que sobreviven (Stephano, 1999). En cerdos infectados experimentalmente nuestro grupo ha observado que la producción de anticuerpos se identifica por ensayos de neutralización viral e inhibición de la hemaglutinación a partir de la primera y segunda semanas p.i., respectivamente (Hernández y col., 1998). La aplicación de una vacuna constituida por virus inactivado con formalina en hembras sanas durante el segundo tercio de la gestación indujo anticuerpos que fueron transferidos a la camada y fueron detectables en los lechones durante los 30 días posteriores al nacimiento. La aplicación de esta vacuna experimental en una granja afec-

tada por la enfermedad del ojo azul indujo una notable producción de anticuerpos; sin embargo, sólo redujo un 30% las manifestaciones clínicas y la mortalidad por la infección (Hernández-Jáuregui y col., 1992), lo cual sugiere que existen otros mecanismos que están involucrados en el control de la enfermedad.

Por su ubicación en la superficie y su complejidad, la proteína de mayor potencial antigénico y el blanco más efectivo del sistema inmunológico es la HN. Por ello esta proteína es también la que presenta mayor variabilidad en muchos de los virus de esta familia y también la que más se estudia como candidato en la generación de vacunas (Ray y Compans, 1990; Haanes y col., 1997; Yates y col., 1997). Nosotros hemos demostrado que la proteína HN del RVP es el antígeno inmunodominante en la respuesta inmune de cerdos infectados experimentalmente. Los anticuerpos anti-HN se detectaron por inmunotransferencia a los 15 días p.i.; mientras que la producción de anticuerpos contra los antígenos NP y M del virión se iniciaron a las cuarta y quinta semanas p.i., respectivamente (Hernández y col., 1998).

Otro factor importante de protección contra paramixovirus es la glicoproteína F, ya que se ha observado que en los virus de parainfluenza el desarrollo de anticuerpos contra F y HN brinda mejor protección que cualquiera de las dos por separado; sin embargo, la inmunogenicidad de la proteína F es bastante baja, por lo que es necesario repetir varias veces la inoculación de la misma para obtener resultados satisfactorios (Ray y Compans, 1990).

En relación a la respuesta inmune celular, se ha demostrado que las células mononucleares de cerdos infectados responden proliferando al estímulo antigénico con el RVP *in vitro*. Esta respuesta proliferativa se presentó a partir de la segunda semana p.i. y se mantuvo al menos durante 7 semanas, alcanzando el punto máximo a la cuarta semana p.i. Las células que proliferan en respuesta al virus son principalmente linfocitos T con fenotipo CD4+CD8+ y CD4+CD8-. Esos resultados sugieren que la estimulación antigénica con el RVP activa vías de señalización de los linfocitos diferentes a las utilizadas

por otros antígenos y mitógenos (Hernández y col., 1998, 2001, 2004).

La respuesta celular tiene un peso muy importante para la erradicación de la infección viral. Se ha observado que las glicoproteínas HN y F de diversos paramixovirus pueden estimular células T citotóxicas y NK, pero la respuesta celular más efectiva es la dirigida contra antígenos de la estructura interna del virus, como la proteína NP, cuyos péptidos, presentados por las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad tipo I, inducen la lisis de las células infectadas (Ray y Compans, 1990).

### EVASION DE LA RESPUESTA INMUNE

En años recientes se ha investigado el papel de ciertas proteínas de los paramixovirus que participan en la inhibición de la actividad del interferón (IFN). Los interferones son una familia de proteínas que se secretan en respuesta a infecciones virales. Esencialmente son de dos tipos, los INF $\alpha/\beta$ , producidos en respuesta directa a la infección viral por fibroblastos y diversos tipos celulares, y el IFN $\gamma$ , producido por linfocitos T y células NK. Los interferones tienen receptores específicos en las membranas de las células, cuyo reconocimiento activa la transcripción de diversos genes involucrados en actividades antivirales. Cuando el IFN reconoce su receptor en una célula se activa una cascada de señales que propicia la fosforilación de los factores de transcripción STAT1 y STAT2, los cuales se dimerizan y se internan en el núcleo, donde interactúan con la proteína p48 para formar un complejo de activación transcripcional de genes que responden a INF $\alpha/\beta$  (Stark y col., 1998; Goodbourn y col., 2000). Se ha observado la interacción de las proteínas celulares STAT con las proteínas virales V y C durante infecciones por los paramixovirus Sendai (Didcock y col., 1999b), SV5 (Didcock y col., 1999a, b) y el de parotiditis (Kubota y col., 2001; Nishio y col., 2002). En cada caso se ha comprobado que esta interacción ocasiona la disminución de los niveles de las proteínas STAT, lo cual interrumpe las vías de señalización del interferón y se inactiva la respuesta antiviral. En el caso del virus

SV5 se logró probar que la unión de su proteína V a STAT1 promueve la degradación proteolítica de ésta (Didcock y col., 1999a), mientras que en un estudio con el virus de parotiditis se observó que su proteína V se une tanto a STAT1 como a STAT2 (Nishio y col., 2002). En este último trabajo se demostró también la interacción de la proteína C del virus Sendai con STAT1, por lo que son dos las proteínas de este virus que pueden unirse a STAT1, sin embargo, no se sabe si existe un efecto de competencia entre ambas o bien un fenómeno de sinergismo. Un estudio con el virus Nipah, otro miembro de la familia *Paramyxoviridae* que afecta también al ganado porcino, muestra que su proteína V interacciona con las proteínas STAT1 y 2, pero que no induce su degradación, sino que sólo las secuestra en el citoplasma evitando que puedan ingresar al núcleo para activar los genes de respuesta al interferón (Rodríguez y col., 2002).

En el caso particular del RVP no se ha investigado el papel que pueden jugar las proteínas V y C en los procesos de inhibición de la respuesta antiviral mediada por interferón; sin embargo, la identificación de un desequilibrio de la proporción de linfocitos CD4:CD8 y la proliferación predominante de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> durante la infección, estos últimos favorecedores de una respuesta inmune de tipo TH2, por su elevada producción de IL10 y escaso IFN $\gamma$  (Hernández y col., 1998, 2001, 2002), sugieren que alguna de las proteínas virales no estructurales está jugando un papel en este proceso. Estos mecanismos son muy importantes en la patogenia viral porque la inactivación de la respuesta a interferón podría permitir la supervivencia del virus en el organismo, lo cual, aunado a otros procesos como la persistencia y la falta de una vacuna efectiva, pueden estar involucrados en los problemas de control de la enfermedad.

#### PERSPECTIVAS EN LA INVESTIGACION SOBRE RVP

Es conocida la alta frecuencia de mutación de los virus ARN, en la que se han propuesto

como factores determinantes: la relativa falta de fidelidad de las polimerasas virales, la presión selectiva producida por el sistema inmunológico de los organismos hospederos, los cambios en el medio ambiente, los eventos de recombinación y otros factores que han sido descritos por múltiples autores (Holland y col., 1982; Morse y Schluenderberg, 1990; Nichol y col., 1993; Murphy, 1994; Domingo y Holland, 1997; Aranda y col., 1997). Los virus ARN son quizá los más variables entre todas las entidades autorreplicantes de la naturaleza, llegando a registrar tasas de mutación entre  $10^{-3}$  y  $10^{-5}$  por genoma por replicación (Domingo, 1989; Holland y col., 1982; Drake, 1993). Existe una amplia bibliografía respecto a la aparición de nuevas variantes y cepas de diversas especies de la familia *Paramyxoviridae* (Iorio y col., 1986; Smith e Inglis 1987; Hetherington y col., 1994; Wild y Buckland, 1994; Kashiwagi y col., 1997; Yates y col., 1997; Heinen y col., 1998). Cada vez son más frecuentes los reportes que anuncian el reconocimiento y caracterización de nuevas cepas y tipos virales, que pueden llegar a ocasionar problemas de salud (Smith e Inglis 1987; Domingo, 1989; De Jong y col., 1995), y es precisamente en este aspecto en que se hace patente la necesidad de contar con modelos para el estudio de la evolución de los virus, así como para entender la evolución de los seres vivos en general, a nivel molecular (Becker, 1996; Domingo y Holland, 1997). Las herramientas moleculares para el estudio de la evolución viral han aportado opciones para la modificación de terapias antivirales y estrategias preventivas mediante vacunas constituidas por múltiples componentes virales (Domingo, 1989; Novella y col., 1995; Taboga y col., 1997).

Como se ha descrito en el texto, las proteínas de los paramixovirus, y en particular del RVP, realizan distintas funciones que impactan de diversas maneras el curso de la infección. El conocimiento integral de la estructura y función de las proteínas virales permitirá diseñar estrategias adecuadas para el control de la enfermedad.

## RESUMEN

El *Rubulavirus porcino* (RVP) es el agente etiológico de la enfermedad del ojo azul de los cerdos, entidad patológica que se caracteriza por cuadros de meningoencefalitis y daño reproductor en cerdos. Es un virus envuelto con genoma de ARN de polaridad negativa perteneciente a la familia *Paramyxoviridae*. Posee una alta afinidad por el tejido nervioso en cerdos neonatos y por el sistema reproductor en cerdos adultos. Este virus posee seis proteínas estructurales y dos no estructurales. En los paramixovirus algunas de estas proteínas promueven una mayor diseminación y daño en los tejidos infectados, mientras que otras tienen actividades reguladoras, manteniendo la integridad de los tejidos por más tiempo. En este trabajo se describe la estructura y función de las proteínas del *Rubulavirus porcino* y su papel en la patogenicidad viral.

## AGRADECIMIENTOS

Parte de los datos reportados en esta revisión fueron aportados por trabajos con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto 3228PB9607). Los autores de esta revisión fueron becarios de maestría y doctorado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

## REFERENCIAS

ALLAN, G.M., F. MACNEILLY, Y. WALKER, T. LINNE, J. MORENO-LOPEZ, P. HERNANDEZ, S. KENNEDY, B.P. CARROL, B. HERRON, J.C. FOSTER, B. ADAIR. 1996. A sequential study of experimental porcine paramyxovirus (LPMV) infection of pigs: immunostaining of cryostat sections and virus isolation. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8: 405-413.

ARANDA, M.A., A. FRAILE, J. DOPAZO, J. M. MALPICA, F. GARCIA-ARENAL. 1997. Contribution of mutation and RNA recombination to the evolution of a plant pathogenic RNA. *J. Mol. Evol.* 44: 81-88.

BECKER, Y. 1996. A short introduction to the origin and molecular evolution of viruses. *Virus Genes.* 11: 73-77.

BERG, M., A. SUNDQVIST, J. MORENO-LOPEZ, T. LINNE. 1991. Identification of the porcine paramyxovirus LPMV matrix protein gene: comparative sequence analysis with other paramyxoviruses. *J. Gen. Virol.* 72: 1045-1050.

BERG, M., A.-C. BERGVALL, M. SVENDA, A. SUNDQVIST, J. MORENO-LOPEZ, T. LINNE. 1997. Analysis of the fusion protein gene of the porcine rubulavirus LPMV: comparative analysis of paramyxoviruses F proteins. *Virus Genes.* 14: 55-61.

BERG, M., B. HJERTNER, J. MORENO-LOPEZ, T. LINNE. 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: 1195-1200.

BERGER, E.A., P.M. MURPHY, J.M. FARBER. 1999. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry tropism, and disease. *Annu. Rev. Immunol.* 17: 657-700.

CALAIN, P., L. ROUX. 1993. The rule of six, a basic feature for efficient replication of Sendai virus defective interfering RNA. *J. Virol.* 67: 4822-4830.

CAMPOS, H.R., S.M. CARVAJAL. 1989. Trastornos reproductivos en los sementales de una granja porcina de ciclo completo ante un brote de ojo azul. Memorias de la XXVI Reunión Nacional de AMVEC, Manzanillo, Col., México, pp. 62-64.

CELMA, M.L., R. FERNANDEZ-MUÑOZ. 1992. Measles virus gene expression in lytic and persistent infections of human lymphoblastoid cell line. *J. Gen. Virol.* 73: 2203-2209.

CUEVAS-ROMERO, J.S. 2002. Persistence of porcine rubulavirus (PoRV-LPMV) in naturally infected pigs. International Master of Sciences Programme, Faculty of Veterinary Medicine, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala

CURRAN, J., R. BOECK, D. KOLAKOFSKY. 1991. The Sendai virus P gene expresses both an essential protein and an inhibitor of RNA synthesis by shuffling modules via mRNA editing. *EMBO J.* 10: 3079-3085.

CURRAN, J., J.B. MARQ, D. KOLAKOFSKY. 1992. The Sendai virus nonstructural C proteins specifically inhibit viral mRNA synthesis. *Virology* 189: 647-656.

DE JONG, M.D., C.A.B. BOUCHER, G.J. GALASSO, M.S. HIRSH, E.R. KERN. 1995. Consensus symposium on combined antiviral therapy. *Antiviral Res.* 29: 5-29.

DENG, R., Z. WANG, P.J. MAHON, M. MARI-NELLO, A.M. MIRZA, R.M. IORIO. 1995. Mutations in the NDV HN protein that interfere with its ability to interact with the homologous F protein in the promotion of fusion. *Virology* 253: 43-54.

- DIDCOCK, L., D.F. YOUNG, S. GOODBOURN, R.E. RANDALL. 1999a. The V protein of simian virus 5 inhibits interferon signalling by targeting STAT1 for proteasome-mediated degradation. *J. Virol.* 73(12):9928-33.
- DIDCOCK, L., D.F. YOUNG, S. GOODBOURN, R.E. RANDALL. 1999b. Sendai virus and simian virus 5 block activation of interferon-responsive genes: importance for virus pathogenesis. *J. Virol.* 73:3125-33.
- DOMINGO, E. 1989. RNA virus evolution and the control of viral disease. *Prog. Drug. Res.* 33: 93-133.
- DOMINGO, E., J.J. HOLLAND. 1997. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu. Rev. Microbiol.* 51: 151-178.
- DRAKE, J.W. 1993. Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 4171-4175.
- EBATA, S.N., M.J. COTE, C. KANG, K. DIMOCK. 1991. The fusion and hemagglutinin-neuraminidase glycoproteins of human parainfluenza virus 3 are both required for fusion. *Virology.* 83: 437-441.
- FUENTES, R.M., N.R. CARREON, M.H. RAMIREZ, M.E. TRUJILLO, B.I. FRAIRE. 1992. Estudio piloto de la frecuencia de anticuerpos contra el paramixovirus del ojo azul en cerdos de la República Mexicana. *Vet. Mex.* 23: 37.
- GOODBOURN, S., L. DIDCOCK, R.E. RANDALL. 2000. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.* 81(Pt 10):2341-64.
- HAANES, E.J., P. GUIMOND, R. WARDLEY. 1997. The bovine parainfluenza virus type-3 (BPIV-3) hemagglutinin/neuraminidase glycoprotein expressed in baculovirus protects calves against experimental BPIV-3 challenge. *Vaccine.* 15: 730-738.
- HEINEN, E., W. HERBST, N. SCHMEER. 1998. Isolation of a cytopathogenic virus from a case of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) and its characterization as a parainfluenza virus type 2. *Arch. Virol.* 143: 2233-2239.
- HERCYK, N, S.M. HORIKAMI, S.A. MOYER. 1988. The vesicular stomatitis virus L-protein possesses the mRNA methyltransferase activities. *Virology.* 163: 222-225.
- HERNANDEZ, J., Y. GARFIAS, A. NIETO; C. MERCADO, L.F. MONTANO, E. ZENTENO. 2001. Comparative evaluation of the CD4+CD8+ and CD4+CD8- lymphocytes in the immune response to porcine rubulavirus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 79(3-4):249-59.
- HERNANDEZ, J., Y. GARFIAS, J. REYES-LEYVA, R. CHAVEZ, R. LASCURAIN; J. VARGAS, E. ZENTENO. 2002. Peanut and *Amaranthus leucocarpus* lectins discriminate between memory and naive/quiescent porcine lymphocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 84 (1-2): 71-82.
- HERNANDEZ, J., J. REYES-LEYVA, R. ZENTENO, H. RAMIREZ, P. HERNANDEZ-JAUREGUI, E. ZENTENO. 1998. Immunity to porcine rubulavirus infection in adult swine. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 64: 367-381.
- HERNANDEZ, J., J. REYES-LEYVA, H. RAMIREZ, O. VALENZUELA, E. ZENTENO. 2004. Características de la respuesta inmune de cerdos infectados con el rubulavirus porcino. *Rev. Vet. Méx.* En prensa.
- HERNANDEZ-JAUREGUI, P. 2003. The pathogenesis of the porcine rubulavirus (LPMV): Infection in PK-15 cultured cells and in experimentally infected pigs. Doctoral thesis Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala. Acta Universitatis Agriculturae Sueciae. Veterinaria 155.
- HERNANDEZ-JAUREGUI, P., A. SUNDQVIST, M. FUENTES, A. DIAZ, J. REYES-LEYVA, E. HERNANDEZ, J. MORENO-LOPEZ. 1992. Correlación entre las pruebas de virus neutralización, inhibición de la hemoaglutinación y ELISA en sueros vacunales y de brote para anticuerpos contra el paramixovirus del Síndrome del Ojo Azul en cerdos. *Vet. Mex.* 23: 217-222.
- HERNANDEZ-LOPEZ, J., H. RAMIREZ-MENDOZA, R. ZENTENO-CUEVAS, J. MONROY-BACILIO, J. REYES-LEYVA, E. ZENTENO. 1997. Neumonitis inducida por el *Rubulavirus porcino*. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Méx.* 10: 250-255.
- HETHERINGTON, S.V., A.S. WATSON, R.A. SCROGGS, A. PORTNER. 1994. Human parainfluenza virus type 1 combines cocirculation of strains and development of geographically restricted lineages. *J. Infect. Dis.* 169: 248-252.
- HJERTNER, B. 1997. Molecular and biological aspects of porcine rubulavirus (LPMV). Lytic and persistent infections. Doctoral thesis Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala. Acta Universitatis Agriculturae Sueciae. Veterinaria
- HJERTNER, B, T. LINNE, J. MORENO-LOPEZ. 1998a. Establishment and characterisation of a porcine rubulavirus (LPMV) persistent infection in porcine kidney cells. *Acta. Vet. Scand.* 38: 213-224.

- HJERTNER, B., A.C. WIMAN, M. SVENDA, M. BERG, J. MORENO-LOPEZ, T. LINNE. 1998b. Multiple factors including subgenomic RNAs and reduced viral protein expression are associated with a persistent infection by porcine rubulavirus (LPMV). *Arch. Virol.* 143: 425-439.
- HOLLAND, J., K. SPINDLER, F. HORODYSKI, E. GRABAU, S. NICHOL, S. VANDEPOL. 1982. Rapid evolution of RNA genomes. *Science* 215: 1577-1585.
- HU, X., R. RAY, R.W. COMPANS. 1992. Functional interactions between the fusion protein and hemagglutinin-neuraminidase of human parainfluenza viruses. *J. Virol.* 66: 1528-1534.
- HUMMEL, K.B., J.A. VANCHIERE, W.J. BELLINI. 1994. Restriction of fusion protein mRNA as a mechanism of measles virus persistence. *Virology* 202: 665-672.
- HUNT, D.M., K.L. HUTCHINSON. 1993. Amino acid changes in the L polymerase protein of vesicular stomatitis virus which confer aberrant polyadenylation and temperature-sensitive phenotypes. *Virology* 193: 786-793.
- IORIO, R.M., J.B. BORGMAN, R.L. GLICKMAN, M.A. BRATT. 1986. Genetic variation within a neutralizing domain on the haemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of Newcastle disease virus. *J. Gen. Virol.* 67: 1393-1403.
- KASHIWAGI, Y., H. KAWASHIMA, K. TAKEKUMA, A. HOSHIKA, T. MORI, T. NAKAYAMA. 1997. Detection of mumps virus genome directly from clinical samples and a simple method for genetic differentiation of the Hoshino vaccine strain from wild strains of mumps virus. *J. Med. Virol.* 52: 195-199.
- KATO, A., K. KIYOTANI, Y. SAKAI, T. YOSHIDA, Y. NAGAI. 1997. The paramyxovirus, Sendai virus, V protein encodes a luxury function required for viral pathogenesis. *EMBO J.* 16: 578-587.
- KATZ, M. 1994. Clinical spectrum of measles. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 191: 1-12.
- KOLAKOFSKY, D., T. PELET, D. GARCIN, S. HAUSMANN, J. CURRAN, L. ROUX. 1998. Paramyxovirus RNA synthesis and requirement for hexamer genome length: the rule of six revisited. *J. Virol.* 72: 891-899.
- KUBOTA, T., N. YOKOSAWA, S. YOKOTA, N. FUJII. 2001. C terminal CYS-RICH region of mumps virus structural V protein correlates with block of interferon alpha and gamma signal transduction pathway through decrease of STAT 1-alpha. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283(1): 255-9.
- LAMB, R.A. 1993. Paramyxovirus fusion: a hypothesis for changes. *Virology* 197: 1-11.
- LAMB, R.A., D. KOLAKOFSKY. 1996. *Paramyxoviridae: The viruses and their replication*. In: B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley y col. (ed.). Fields Virology. Third ed. Lippincott-Raven Publishers, E.U.A.
- LAZZARINI, R.A., J.D. KEENE, M. SCHUBERT. 1981. The origins of defective interfering particles of the negative-strand RNA viruses. *Cell.* 26: 145-154.
- LINNE, T., M. BERG, A.-C. BERGVALL, B. HJERTNER, J. MORENO-LOPEZ. 1992. The molecular biology of the porcine paramyxovirus LPMV. *Vet. Microbiol.* 33: 263-273.
- MARKWELL, M.A., C.F. FOX. 1980. Protein-protein interactions within paramyxoviruses identified by native disulfide bonding or reversible chemical cross-linking. *J. Virol.* 33: 152-166.
- MAYO MA. 2002. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Arch. Virol.* 147 (8):1655-63.
- MCNEILLY, F., Y. WALKER, G.M. ALLAN, J.C. FOSTER, T. LINNE, M. MERZA, P. HERNANDEZ, S. KENNEDY, B. ADAIR. 1997. A comparative study on the use of virus and antibody detection techniques for the diagnosis of La Piedad Michoacan paramyxovirus (LPMV) infection in Pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9: 3-9.
- MORENO-LOPEZ, J., P. CORREA-GIRON, A. MARTINEZ, A. ERICSSON. 1986. Characterization of a paramyxovirus isolated from the brain of a piglet in Mexico. *Arch. Virol.* 91: 221-231.
- MORRISON, T.G., A. PORTNER. 1991. Structure, function and intracellular processing of glycoproteins of *Paramyxoviridae*, pp. 347-382. En: D.W. Kingsbury (ed.) The Paramyxoviruses. Plenum Press, E.U.A.
- MORSE, S.S., A. SCHLUEDERBERG. 1990. Emerging viruses: the evolution of viruses and viral diseases. *J. Infect. Dis.* 162: 1-7.
- MOSCONA, A., R.W. PELUSSO. 1991. Fusion properties of cells persistently infected with human parainfluenza virus type 3: participation of hemagglutinin-neuraminidase in membrane fusion. *J. Virol.* 65: 2773-2777.
- MURPHY, D.G., K. DIMOCK, C.Y. KANG. 1987. Defective interfering particles of human parainfluenza virus 3. *Virology* 158: 439-443.
- MURPHY, F.A. 1994. New, emerging, and reemerging infectious diseases. *Adv. Virus Res.* 43: 1-52.

- NICHOL, S.T., C.F. SPIROPOULOU, S. MORZUNOV, P.E. ROLLIN, T.G. KSIAZEK, H. FELDMAN, A. SANCHEZ, J. CHILDS, S. ZAKI, C.J. PETERS. 1993. Genetic identification of a Hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. *Science* 262: 914-917.
- NISHIO, M., D. GARCIN, V. SIMONET, D. KOLAKOSKY. 2002. The carboxyl segment of the mumps virus V protein associates with Stat proteins in vitro via a tryptophan-rich motif. *Virology* 300(1): 92-9.
- NOVELLA, I.S., E. DOMINGO, J.J. HOLLAND. 1995. Rapid viral quasispecies evolution: implications for vaccine and drug strategies. *Mol. Med. Today* 1: 248-253.
- RAMIREZ-HERRERA, M.A., M.L. MENDOZA-MAGAÑA, S.H. DUEÑAS. 1997. Experimental infection of swine and cat central nervous systems by the pig paramyxovirus of the blue eye disease. *J. Vet. Med.* B44: 461-476.
- RAMIREZ-MENDOZA, H., P. HERNANDEZ-JAUREGUI, J. REYES-LEYVA, E. ZENTENO, J. MORENO-LOPEZ, S. KENNEDY. 1997. Lesions in the reproductive tract of boars experimentally infected with porcine rubulavirus. *J. Comp. Path.* 117: 237-252.
- RAY, R., R.W. COMPANS. 1990. Paramyxoviruses. In: M.H.B. Van Regenmortel, A.R. Neurath (ed.). *Immunochemistry of viruses II. The basis for serodiagnosis and vaccines.* Elsevier, New York.
- REYES-LEYVA, J., B. ESPINOSA, J. HERNANDEZ, R. ZENTENO, V. VALLEJO, P. HERNANDEZ-JAUREGUI, E. ZENTENO. 1997. Neu $\alpha$ 2,3-Gal glycoconjugate expression determines cell susceptibility to the porcine rubulavirus LPMV. *Comp. Biochem. Physiol.* 118B: 327-332.
- REYES-LEYVA, J., P. HERNANDEZ-JAUREGUI, L.F. MONTAÑO, E. ZENTENO. 1993. The porcine paramyxovirus LPM specifically recognizes sialyl( $\alpha$ 2,3) lactose-containing structures. *Arch. Virol.* 133: 195-200.
- REYES-LEYVA, J., B. ESPINOSA, G. SANTOS, R. ZENTENO, J. HERNANDEZ, V. VALLEJO, E. ZENTENO. 1999. Purification and characterization of the Hemagglutinin-neuraminidase of Porcine Rubulavirus LPMV. *Glycoconj. J.* 16: 517-522.
- REYES-LEYVA, J., O. GARCIA MORALES, G. SANTOS-LOPEZ, V. VALLEJO-RUIZ, H. RAMIREZ-MENDOZA, J. HERNANDEZ. 2004. Detección de viremia en la infección por *Rubulavirus porcino*. *Arch. Med. Vet.* En proceso de revisión.
- REYES-LEYVA, J., G. SANTOS, J. HERNANDEZ, B. ESPINOSA, M.T. BORRAZ, H. RAMIREZ, V. VALLEJO, E. ZENTENO. 2002. Mecanismos moleculares de la patogenicidad viral: Estudios con el *Rubulavirus porcino*. En: Cea Bonilla A., del Arenal Mena IP, Riveros Rosas H, Vázquez Contreras E (eds). *Mensaje Bioquímico*, Vol. XXVI. Depto. Bioquímica, Fac. Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., México.
- RIMA, B., D.J. ALEXANDER, M.A. BILLETER, P.L. COLLINS, D.W. KINGSBURY, M.A. LIPKIND, Y. NAGAI, C. ÖRVELL, C.R. PRINGLE, V. TER MULLEN. 1995. Family *Paramyxoviridae*, p. 265-274. In: F.A. Murphy, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, S.A. Ghabrial, A.W. Jarvis, G.P. Matelli, M.A. Mayo, M.D. Summers (ed.). *Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses.* Viena-Nueva York: Springer-Verlag.
- RIMA, B.K., J.A.P. EARLE, K. BACZKO, P.A. ROTA, W.J. BELLINI. 1994. Measles virus strain variation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 191: 65-83.
- RODRIGUEZ, J.J., J.P. PARISIEN, C.M. HORVATH. 2002. Nipah Virus V Protein Evades Alpha and Gamma Interferons by Preventing STAT1 and STAT2 Activation and Nuclear Accumulation. *J. Virol.* 76(22): 11476-83.
- ROSALES, E.F., L.A. MARTINEZ, G.P. CORREA. 1988. Análisis retrospectivo (1972-1986) de la presencia de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación contra el paramixovirus porcino LPM, al parecer asociado con el "Síndrome de Ojo Azul". *Tec. Pec.* 26: 304-311.
- SANCHEZ, A., B.P. DE, A.K. BANERJEE. 1985. In vitro phosphorylation of NS protein by the L protein of vesicular stomatitis virus. *J. Gen. Virol.* 66: 1025-1036.
- SANDERSON, C.M., H.H. WU, D.P. NAYAK. 1993. Sendai virus M protein binds independently to either the F or the HN glycoprotein in vivo. *J. Virol.* 68: 69-76.
- SANTOS-LOPEZ, G., E. FLORES, R. BAÑOS, I. HERRERA-CAMACHO, J. REYES-LEYVA. 2004. Purification of the porcine rubulavirus attachment protein by liquid isoelectric focusing. *Protein Expr. Purif.* En prensa.
- SERDEL, T., L.W. MACGUINNES, M.E. PEEPLES, T.G. MORRISON. 1993. The attachment function of the Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase protein can be separated from fu-

- sion promotion by mutation. *Virology* 193: 717-726.
- SHEID, A., P.W. CHOPPIN. 1974. Identification of biological activities of paramyxovirus glycoproteins. Activation of cell fusion, hemolysis, and infectivity of proteolytic cleavage of an inactive precursor protein of Sendai virus. *Virology* 57: 475-490.
- SMITH, D. B., S.C. INGLIS. 1987. The mutation rate and variability of eucaryotic viruses: an analytical review. *J. Gen. Virol.* 68: 2729-2740.
- SMITH, G. L. 1994. Virus strategies for evasion of the host response to infection. *Trends Microbiol.* 2: 81-88.
- STARK, G.R., I.M. KERR, B.R. WILLIAMS, R.H. SILVERMAN, R.D. SCHREIBER. 1998. How cells respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 227-64.
- STEPHANO, H.A. 1999. Blue eye disease. In: B.E. Straw, S. D'Allaire, W.L. Mengelin, D.J. Taylor (eds.). Diseases of swine. 8<sup>th</sup> ed. Ames, Iowa. Iowa State University Press. Pp 103-112.
- STEPHAN, H.A., G.M. GAY, T.C. RAMIREZ. 1988. Encephalomyelitis, reproductive failure and corneal opacity (blue eye) in pigs, associate with a paramyxovirus infection. *Vet. Rec.* 122: 6-10.
- STONE-HULSLANDER, J., T.G. MORRISON. 1999. Mutational analysis of heptad repeats in the membrane-proximal region of Newcastle disease virus HN protein. *J. Virol.* 73: 3630-3637.
- SUNDQVIST, A., M. BERG, P. HERNANDEZ-JAUREGUI, T. LINNE, J. MORENO-LOPEZ. 1990. The structural proteins of a porcine paramyxovirus (LPMV). *J. Gen. Virol.* 71: 609-613.
- SUNDQVIST, A., M. BERG, P. HERNANDEZ-JAUREGUI, T. LINNE, J. MORENO-LOPEZ. 1991. The haemagglutinin-neuraminidase gene of the porcine paramyxovirus LPMV: comparison with other paramyxovirus revealed the closest to simian virus 5 and mumps virus. *Arch. Virol.* 122: 331-340.
- SVENDA, M., M. BERG, J. MORENO-LOPEZ, T. LINNE. 1997. Analysis of the large (L) protein gene of the porcine rubulavirus LPMV: identification of possible functional domains. *Virus Res.* 48: 57-70.
- SVENDA, M., B. HJERTNER, T. LINNE, M. BERG. 2002. Both the P and V proteins of the porcine rubulavirus LPMV interact with the NP protein via their respective C-terminal unique parts. *Virus Res.* 83(1-2):31-41.
- TABOGA, O., C. TAMI, E. CARRILLO, J.I. NUÑEZ, A. RODRIGUEZ, J.C. SAIZ, E. BLANCO, M.L. VALERO, X. ROIG, J.A. CAMARERO, D. ANDREU, M.G. MATEU, E. GIRALT, E. DOMINGO, F. SOBRINO, E. PALMA. 1997. A large-scale evaluation of peptide vaccines against foot-and-mouth disease: lack of solid protection in cattle and isolation of scape mutants. *J. Virol.* 71: 2606-2614.
- TSURUDOME, M., M. KAWANO, T. YUASA, M. NISHIO, K. HIROSHI, Y. ITO. 1995. Identification of regions on the hemagglutinin-neuraminidase protein of human parainfluenza virus type 2 important for promoting cell fusion. *Virology* 213: 190-203.
- VALLEJO V., J. REYES-LEYVA, J. HERNANDEZ, H. RAMIREZ, P. DELANNOY, E. ZENTENO. 2000. Differential expression of sialic acid on porcine organs during maturation process. *Comp. Biochem. Physiol.* Part B 126: 415-424.
- WHITE, J.M. 1990. Viral and cellular membrane fusion proteins. *Annu. Rev. Physiol.* 52: 675-697.
- WILD, T.F., R. BUCKLAND. 1994. Functional aspects of envelope-associated measles virus proteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 191: 51-64.
- WIMAN, AC, B. HJERTNER, T. LINNE, G. ALLAN, F. MCNEILLY, J. MORENO-LOPEZ, M. BERG. 1998. Porcine rubulavirus LPMV RNA persists in the central nervous system of pigs after recovery from acute infection. *J. Neurovirol.* 4: 545-552.
- WOLINSKY, J.S. 1996. Mumps virus. In: B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley y col. (ed.) Fields Virology. T<sup>rd</sup> ed. Lippincott-Raven Publishers, E.U.A.
- YATES, P.J., M.A. AFZAL, P.D. MINOR. 1997. Antigenic and genetic variation of the HN protein of mumps virus strains. *J. Gen. Virol.* 77: 2491-2497.
- ZENTENO-CUEVAS, R., J. HERNANDEZ, B. ESPINOSA, J. REYES-LEYVA, E. ZENTENO. 1998. Secondary structure prediction of the hemagglutinin-neuraminidase from a porcine rubulavirus. *Arch. Virol.* 143: 333-352.