

11261
9
EJ 2

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
Facultad de Medicina

CARACTERIZACION DEL RECEPTOR CELULAR
DEL PARAMIXOVIRUS PORCINO LPM

TESIS, QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS (INMUNOLOGÍA)

PRESENTA:

M.V.Z. JULIO ROBERTO REYES LEYVA

TUTOR:

DR. EDGAR ZENTENO GALINDO

COTUTOR:

DR. PABLO HERNÁNDEZ JÁUREGUI

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Ciudad Universitaria, D. F. octubre de 1993.



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 está 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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

CARACTERIZACION DEL RECEPTOR CELULAR DEL PARAMIXOVIRUS PORCINO LPM.
Reyes Leyva JR (1993) Tesis de Maestría en Ciencias Biomédicas, Inmunología.
Facultad de Medicina, UNAM. Tutor: Dr. Edgar Zenteno.

RESUMEN.

El paramixovirus porcino de La Piedad Michoacán (LPM) es el agente etiológico de una enfermedad que provoca alteraciones neurológicas, respiratorias y reproductivas, acompañada por opacidad de la córnea y que afecta principalmente a cerdos neonatos. En este trabajo se determinó la naturaleza química del receptor celular del paramixovirus porcino LPM. El virus LPM posee actividad aglutinante para los eritrocitos estudiados, incluyendo humano A, B, O, carnero, cuyo, conejo, rata, ratón, pollo y cerdo. Además se realizaron ensayos de hemaglutinación (HA) y de formación de sincicios (FS) con eritrocitos y células Vero tratadas con las enzimas neuraminidasa y tripsina. El tratamiento con neuraminidasa disminuyó la HA y la FS demostrando que el virus LPM reconoce residuos de ácido siálico, por el contrario, el tratamiento de las células con tripsina incrementó el grado de infección. Para identificar la especificidad del virus LPM se realizaron ensayos de inhibición de la HA y de la FS, con azúcares, glicósidos y glicoproteínas. Estos ensayos de competencia de unión mostraron que el virus reconoce anómeros α del ácido siálico, siendo sialil(α 2,3)lactosa el mejor inhibidor de la actividad viral. Glicoproteínas con un gran contenido de residuos sialil(α 2,3)lactosa, IgA y orosomucoide, fueron buenos inhibidores de la actividad HA del virus. Para determinar la participación de los oligosacáridos de la superficie celular en el proceso de infección, se trataron células Vero con antibióticos inhibidores de la glicosilación. El uso de tunicamicina y desoxijirimicina redujo notablemente la infección por el virus LPM. El patrón de expresión de azúcares en células Vero y en tejidos de cerdos neonatos sanos se determinó utilizando diversas lectinas conjugadas a fluoresceína. Los ensayos de fluorescencia con la lectina de *Mauackia amurensis*, específica por moléculas NeuAc α 2,3Gal, demostraron la presencia de sialil(α 2,3)lactosa en células Vero. Los tratamientos de las células Vero con neuraminidasa, tunicamicina y desoxijirimicina disminuyeron el reconocimiento por esta lectina. Esta lectina también demostró la presencia de sialil(α 2,3)lactosa en tejidos respiratorio y nervioso de cerdos neonatos. En especial en la mucosa bronquial y en la corteza cerebral. Los resultados demuestran que el virus LPM reconoce como receptores a moléculas sialiladas, expresadas en la superficie celular. Al parecer la estructura mínima requerida por el virus para interactuar con su receptor es el ácido siálico, ya que su eliminación de las células disminuye la infección. Sin embargo, la hemaglutinina viral parece poseer un sitio de unión restringido, ya que α 2,3 pero no α 2,6 sialilactosa resultó ser inhibidor de la actividad HA y FS. El patrón de expresión de sialil(α 2,3)lactosa en los tejidos de cerdos neonatos y la especificidad del virus LPM hacia este tipo de oligosacáridos explica el tropismo tisular mostrado en la patogenia de la enfermedad.

CHARACTERIZATION OF RECEPTORS FOR THE PORCINE LPM PARAMYXOVIRUS.

Reyes Leyva JR (1993) Tesis de Maestría en Ciencias Biomédicas, Inmunología. Facultad de Medicina, UNAM, México. Tutor: Dr. Edgar Zenteno.

ABSTRACT.

The porcine La Piedad Michoacán (LPM) paramyxovirus is the ethiological agent of a new porcine disease, characterized by neurological, respiratory and reproductive manifestations with corneal opacity; that mainly affects neonatal pigs. This work concerns with the chemic nature of cellular receptor for the porcine LPM virus.

The studies included the inhibition of both haemagglutinating (HA) and syncytium forming (SF) activities of LPM virus, using sugars, glycosides and glycoproteins as receptor binding competitors. The viral HA and SF activities were also tested with neuraminidase- or trypsin-treated cells. Also, the virus infection was tested on glycosylation-inhibited Vero cells. Finally, the binding patterns of FITC-conjugated lectins were tested with mock and treated Vero cells as well as with neonatal healthy pigs' tissues.

The competition binding assays showed that LPM virus recognizes sialic acid-containing structures, mainly sialyl(α 2,3)lactose moieties. Moreover, the human glycoproteins, IgA and α 1 acid, wich contain high amounts of sialyl(α 2,3)lactose were the best inhibitors of the virus activities. The assays in neuraminidase-treated Vero cells confirmed the relevance of sialic acid as receptor for LPM virus, because this treatment diminished the infection. Conversely, treatment of the cells with trypsin increased the number of syncytia produced by LPM virus. The inhibition of the glycosylation pathway of Vero cells with tunicamycin or deoxynojirimycin abolished or importantly diminished, respectively, the syncytium forming activity of LPM virus. The expression of sialyl(α 2,3)lactose molecules in mock Vero cells was confirmed using FITC-conjugated *Maackia amurensis* (MAA) lectin, wich specifically recognizes NeuAc α 2,3Gal moieties. Treatment of Vero cells with neuraminidase, tunicamycin or deoxynojirimycin notably decreased the binding of this lectin. In the same manner, this lectin showed a high binding degree on nervous and respiratory tissues of neonatal pigs. The highest binding of MAA lectin was observed with bronchial mucous and cerebral cortex.

The results showed that LPM virus recognizes sialylated molecules as receptors. It seems, that sialic acid is the minimal structure required by LPM virus to interact with cells. However, the viral haemagglutinin seems to have a restricted binding site, because, α 2,3, but not α 2,6 sialyllactose inhibited the virus activities. This suggests that the N-acetyl group as well as the C1's hidroxyl of sialic acid and possibly the CH₂OH group of Gal are relevant components in the interaction with LPM virus. The binding site on the virus haemagglutinin seems to recognize both the chemic structure and the tridimensional conformation of cellular receptors.

The expression pattern of sialyl(α 2,3)lactose on neonatal pigs' tissues and the high specificity of LPM virus for these molecules explain the tissue tropism showed in disease's pathogenesis.

I N D I C E

PRESENTACION.	1
RESUMEN.	2
ABSTRACT.	3
INDICE.	4
INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.	6
INTRODUCCION.	8
Enfermedad del ojo azul en el cerdo.	8
Características clínicas.	9
Patogenia.	11
Estructura del virus LPM.	13
Propiedades biológicas del virus LPM.	17
Inmunidad.	18
Receptores virales.	19
Glicosilación.	22
JUSTIFICACION.	24
OBJETIVOS.	25
HIPOTESIS.	25
MATERIAL Y METODOS.	26
Reactivos.	26
Células y Virus.	26
Purificación Viral.	27
Determinación de la concentración de proteínas.	28
Preparación de un suero hiperinmune.	28
Estandarización del contenido viral.	29
Ensayos de Hemaglutinación (HA).	30
Hemaglutinación de eritrocitos de diversas especies animales.	30
Hemaglutinación de eritrocitos tratados con enzimas.	30
Especificidad por oligosacáridos del virus LPM.	30
Purificación de la hemaglutinina viral.	31
Especificidad por oligosacáridos de la hemaglutinina.	32
Características físico-químicas de la proteína HN.	33
Efecto de la temperatura de incubación sobre la actividad de la proteína HN.	33
Hemaglutinación en presencia de cationes divalentes.	33
Estabilidad térmica de la proteína HN.	33
Determinación del peso molecular relativo de la proteína HN.	34
Ensayos de Infección.	34
Determinación de las unidades formadoras de sincicios.	34
Tinción de cultivos infectados.	35

Infección de células tratadas con enzimas.	35
Efecto de azúcares sobre la formación de sincicios.	36
Infección de células tratadas con antibióticos inhibidores de la glicosilación.	36
Ensayos de fluorescencia.	37
Conjugación de lectinas a fluorocromos.	37
Fluorescencia directa en células Vero tratadas con antibióticos inhibidores de la glicosilación.	37
Fluorescencia directa en células Vero tratadas con enzimas.	38
Cortes de tejidos porcinos.	38
Fluorescencia directa en tejidos porcinos.	39
Fluorescencia en tejidos porcinos tratados con enzimas.	39
RESULTADOS.	40
Caracterización físico-química y biológica del virus LPM.	40
Ensayos de Hemaglutinación (HA).	41
Hemaglutinación de eritrocitos de diversas especies animales.	41
Hemaglutinación de eritrocitos tratados con enzimas.	41
Especificidad del virus LPM por oligosacáridos.	42
Purificación de la hemaglutinina viral.	43
Especificidad de la proteína HN por oligosacáridos.	43
Caracterización físico-química de la proteína HN.	44
Efecto de la temperatura de incubación sobre la actividad de la proteína HN.	44
Hemaglutinación en presencia de cationes divalentes.	45
Estabilidad térmica de la proteína HN.	45
Peso molecular de la proteína HN.	46
Ensayos de Infección.	46
Formación de sincicios en células Vero.	46
Formación de sincicios en células Vero tratadas con enzimas.	46
Inhibición de la formación de sincicios con azúcares.	47
Infección de células Vero tratadas con antibióticos inhibidores de la glicosilación.	47
Ensayos de fluorescencia.	48
Lectinas utilizadas en los ensayos de fluorescencia.	48
Fluorescencia en células Vero tratadas con antibióticos inhibidores de la glicosilación.	48
Fluorescencia en células Vero tratadas con enzimas.	49
Fluorescencia directa en tejidos de cerdos neonatos.	50
DISCUSION.	51
CONCLUSIONES.	67
PERSPECTIVAS DE INVESTIGACION.	69
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	70

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.

No.	Descripción	Página
Fig.	1 Cerdo con opacidad de la córnea.	8
Cdro.	1 Cuadro sináptico: Familia Paramyxoviridae.	13
Fig.	2 Micrografía electrónica del paramixovirus porcino LPM.	14
Fig.	3 Flujo de eventos durante la replicación de los paramixovirus.	14
Fig.	4 Perfil de las proteínas del virus LPM.	14
Tab.	1 Pesos moleculares relativos de las proteínas estructurales de los paramixovirus.	14
Fig.	5 Diagrama de una partícula de los paramixovirus y su mapa genómico.	14
Tab.	2 Porcentaje de identidad en aminoácidos de las proteínas HN, H y G de paramixovirus.	16
Fig.	6 Efecto citopático en células Vero infectadas con virus LPM.	17
Fig.	7 Inmunodifusión doble con suero antiviral LPM.	19
Fig.	8 Mecanismos de infección en virus con envoltura.	20
Fig.	9 Vía de glicosilación de los N-glicanos.	23
Fig.	10 Estructuras de los principales oligosacáridos presentes en las superficies celulares.	23
Fig.	11 Efecto citopático en células PK-15.	40
Fig.	12 Perfil electroforético del virus LPM.	40
Tab.	3 Recuperación de la actividad hemaglutinante durante la purificación del virus LPM.	40
Tab.	4 Actividad hemaglutinante del paramixovirus LPM.	41
Tab.	5 Actividad hemaglutinante del virus LPM en eritrocitos tratados con enzimas.	42
Tab.	6 Efecto de oligosacáridos sobre la actividad hemaglutinante del paramixovirus porcino LPM.	42
Tab.	7 Carbohidratos no inhibidores de la hemaglutinación inducida por el virus LPM.	42
Tab.	8 Efecto de glicoproteínas sobre la actividad hemaglutinante del paramixovirus porcino LPM.	43
Fig.	13 Estructura de los oligosacáridos presentes en algunas de las glicoproteínas utilizadas en este estudio.	43
Fig.	14 Purificación de la proteína HN del virus LPM en gradientes de sacarosa.	43
Tab.	9 Inhibición de la actividad hemaglutinante de la proteína HN del paramixovirus porcino LPM.	44
Tab.	10 Actividad del virus LPM y de su proteína HN a diferentes temperaturas de incubación.	44

Fig. 15	Actividad de la proteína HN en presencia de cationes divalentes.	45
Fig. 16	Estabilidad térmica de la proteína HN del virus LPM.	45
Fig. 17	Perfil electroforético de la proteína HN.	46
Fig. 18	Formación de sincicios en células Vero infectadas con el paramixovirus porcino LPM.	46
Tab. 11	Formación de sincicios por el virus LPM en células Vero tratadas con enzimas.	47
Fig. 19	Efecto de azúcares en la infección por el virus LPM.	47
Fig. 20	Efecto de sialil(α 2.3)lactosa en la infección.	47
Fig. 21	Estrategia seguida para inhibir la glicosilación.	47
Fig. 22	Efecto de inhibidores de la glicosilación en la infección viral.	48
Tab. 12	Lectinas utilizadas en este estudio y su especificidad por azúcares.	48
Tab. 13	Patrón de unión de lectinas a células tratadas con antibióticos inhibidores de la glicosilación.	48
Tab. 14	Unión de lectinas a células tratadas con enzimas.	49
Fig. 23	Infección por virus LPM en células Vero tratadas con enzimas.	49
Tab. 15	Patrón de unión de lectinas a tejidos de cerdos neonatos.	50

INTRODUCCION.

Enfermedad del ojo azul en el cerdo.

El paramixovirus porcino de La Piedad Michoacán (LPM) es el agente causal de la enfermedad del ojo azul [Moreno-López et al. 1986], nueva 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 la enfermedad (Fig. 1) [Stephano, Gay y Ramírez 1988].

Los primeros casos de la enfermedad se presentaron durante 1979 en granjas de La Piedad, Michoacán, donde se observaron brotes de una encefalitis en lechones con características clínicas y patológicas diferentes a las observadas previamente en México [Stephano et al. 1981]. En 1980 se observaron brotes de la enfermedad en otras granjas de la misma zona así como en granjas cercanas en los estados de Jalisco y Guanajuato. Ese mismo año la enfermedad se expandió al resto de Michoacán y Guanajuato. En 1982 la enfermedad se diagnosticó en el Estado de México, en 1983 en el Distrito Federal y en los estados de Nuevo León, Hidalgo, Tlaxcala y Queretaro [Stephano y Gay 1985]. En 1984 se presentaron brotes en Tamaulipas y en 1988 en Puebla y Campeche [Carreón et al. 1989]. La enfermedad ha continuado su difusión en el país, sin embargo, el foco principal sigue siendo La Piedad y zonas circunvecinas de los estados de Michoacán, Jalisco y Guanajuato, donde existe una densa población porcina [Fuentes et al. 1990].



FIG. 1. CERDO CON OPACIDAD CORNEAL.

Cerdo de 45 días de edad con opacidad unilateral de la córnea y conjuntivitis bilateral; al momento de la fotografía, el animal presentaba parálisis bilateral de los miembros posteriores. El suero de este cerdo mostró un título elevado de anticuerpos contra el paramixovirus porcino LPM.

Hasta el momento, México es el único país afectado por la enfermedad del ojo azul del cerdo [Linné 1992]. Sin embargo, se pensaba que un síndrome similar, con alteraciones respiratorias y reproductivas, descrito en Estados Unidos, Canadá, Holanda y otros países de Europa, era causado por el mismo paramixovirus. Se ha reportado recientemente que este síndrome es causado por el virus de Lelystad [Christianson 1991], el cual ha sido clasificado dentro del género Arterivirus, perteneciente a una nueva familia viral llamada Arteriviridae [Cavanagh y Horzineck 1993].

Características clínicas.

Durante un brote de la enfermedad del ojo azul la morbilidad es del 20%, con una mortalidad del 90%, siendo los animales más susceptibles lechones menores a 20 días de edad [Stephano et al. 1981]. Los signos clínicos varían de acuerdo a la edad de los animales. En cerdos neonatos los signos se presentan rápidamente y reflejan la infección del sistema nervioso central; es común observar a los lechones con ataxia, rigidez en los miembros posteriores, temblor muscular, movimientos involuntarios, etc., los lechones mueren regularmente 48 horas después de que los primeros signos son observados. La opacidad de la córnea sólo se presenta en 1-10% de los animales afectados [Stephano, Gay y Ramírez 1988].

Los cerdos mayores de 30 días de edad que son infectados sólo presentan manifestaciones reproductivas, rara vez presentan signos de daño neurológico y pocos mueren por la infección, a menos que se presente asociada a otras infecciones de tipo respiratorio. Frecuentemente, la única indicación de la infección en cerdos mayores es conjuntivitis y opacidad de la córnea. Las cerdas gestantes cuando son infectadas desarrollan ocasionalmente opacidad de la córnea. Sin embargo, presentan un incremento en el número de lechones nacidos muertos y fetos momificados; cuando se infectan al inicio de la gestación presentan regresos al estro, con la consecuente baja en los porcentajes de fertilidad. Estas manifestaciones redundan en un daño importante a la economía de los porcicultores [Stephano y Gay 1985].

Desde 1983 se han indentificado brotes de la enfermedad, con encefalitis y opacidad de la córnea, en donde los principales afectados son cerdos mayores de 45 días de edad. En estos casos, además de las alteraciones reproductivas comúnmente observadas en las cerdas, los machos presentan orquitis, epididimitis y atrofia testicular [Stephano et al 1990, Campos y Carbajal 1991]. Esta sintomatología sigue el comportamiento patológico de otro paramixovirus, el de la parotiditis humana [Pomeroy y Jordan 1992].

Patogenia

En estudios de transmisión experimental se demostró que el virus LPM producía signos clínicos y cambios patológicos en lechones [Stephano y Gay 1983] y cerdas [Stephano et al. 1988], similares a los que habían sido observados en brotes naturales. Hay evidencias que indican que la ruta natural de infección es la nasofaringe, ya que la inoculación experimental intranasal o intratraqueal en lechones de 1 día de edad, provoca un síndrome nervioso similar al observado en la infección natural [Stephano y Gay 1983].

El sitio inicial de replicación podría ser la mucosa nasal (cornetes) y amígdalas. De ahí, el virus se disemina hacia el sistema nervioso y los pulmones; ésto sucede temprano en la infección ya que una de las primeras manifestaciones clínicas es la aparición de signos neurológicos [Stephano y Gay 1985]. Además, el virus se aísla de encéfalo con mayor abundancia que de ningún otro tejido, y la inoculación intracerebral acorta el período de incubación, ocasionando cuadros clínicos similares a los casos agudos en lechones infectados naturalmente [Pérez, Stephano y Gay 1988]. Daños microscópicos en el sistema nervioso central, se observan aún en cerdos sin signos neurológicos. El mayor dato histológico es una encefalomielitis, que afecta principalmente la sustancia gris del tálamo, cerebro medio y corteza cerebral. Hay marcada gliosis focal y difusa inflamación linfocitaria

perivascular; neuronofagia, necrosis neuronal y glial, meningitis y coroiditis y no se observan cuerpos de inclusión. En los pulmones es frecuente observar zonas diseminadas de neumonía intersticial, con engrosamiento del septo alveolar por células mononucleares [Stephano, Gay y Ramírez 1988].

La viremia es parte importante en la diseminación, ya que el virus también 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].

La opacidad corneal no ha sido reproducida experimentalmente. La alteración macroscópica más drástica que se ha logrado reproducir en el ojo es el edema corneal que desaparece paulatinamente. Los cambios histológicos incluyen el edema corneal y uveítis con infiltración por macrófagos y neutrófilos en diferentes partes del ojo: endotelio corneal, unión esclerocorneal, en el iris y en el nervio óptico [Stephano y Gay 1983].

El virus también puede llegar a útero causando muerte embrionaria y retorno al estro en cerdas en el primer tercio de la gestación y produciendo muerte fetal y momificaciones en cerdas con gestación más avanzada. Muchos animales tienen una amigdalitis moderada con descamación del epitelio y con células inflamatorias en las criptas. En otros órganos no se observan cambios importantes [Stephano y Gay 1985].

Estructura del virus LPM.

Por sus características físico-químicas, biológicas, estructurales y morfológicas el virus LPM ha sido clasificado dentro del género Paramyxovirus, de la familia Paramyxoviridae. En el cuadro 1 se presenta información sobre la familia Paramyxoviridae y un resumen de la función de sus proteínas.

El virus LPM ha sido aislado a partir de las amígdalas, el pulmón y el encéfalo de lechones con encefalomielitis aguda. A la microscopía electrónica el virus LPM muestra la morfología clásica de los paramyxovirus (Fig. 2) [Moreno-López et al. 1986]. En tinciones negativas los viriones de los paramyxovirus se observan esféricos o pleomórficos y miden de 100 a 360 nm. Su nucleocápside es helicoidal y está encerrada en una membrana lipoprotéica, derivada de las células, que es extremadamente frágil, dejando al virión vulnerable a la destrucción por el almacenaje, congelamiento y descongelamiento. Debido a esto, las partículas virales aparecen con frecuencia distorsionadas en las micrografías electrónicas, y es difícil hacer la demostración de su nucleocápside interna [Kingsbury 1990].

Como todos los virus con envoltura, el virus LPM se inactiva con solventes orgánicos, como éter y cloroformo, sin perder sus características antigénicas [Moreno-López et al. 1986]. Además, es resistente a la actinomicina D, lo que indica la presencia de ácido ribonucléico (ARN) en su genoma [Stephano, Gay y Ramírez 1988]. Los

CUADRO 1. FAMILIA PARAMYXOVIRIDAE.

La familia Paramyxoviridae incluye a virus formados por ARN de cadena única, negativa; los cuales han sido clasificados en tres géneros de acuerdo a las actividades biológicas de su glicoproteína de adherencia (HN, H o G). Todos los miembros de esta familia son causantes de enfermedades importantes tanto en animales como en el hombre, afectando en forma significativa a los sistemas respiratorio y nervioso.

CLASIFICACION DE LA FAMILIA PARAMYXOVIRIDAE.

GENERO	PROTEINAS DE ENVOLTURA	ACTIVIDADES BIOLOGICAS	ESPECIES VIRALES	HOSPEDERO NATURAL
Paramyxovirus	HN, F	Hemaglutinación Neuraminidasa Fusión celular	Virus Sendai (PI-1)	Ratón
			PI-3 bovino	Ganado bovino
			* Virus parainfluenza tipos 1-4 humanos	Humano
			* SV5 (PI-2 canino)	Perro
			* Virus de la parotiditis	Humano
Morbillivirus	H, F	Hemaglutinación Fusión celular	* Virus LPW	cerdo
			Virus de la enfermedad de Newcastle	Aves
			Virus del sarampión	Humano
Pneumovirus	G, F	Fusión celular	Virus del moquillo	Perro
			Virus de la peste del ganado	Rumiantes
			Virus sincicial respiratorio humano	Humano
			Virus sincicial respiratorio bovino	Ganado bovino

* Por su homología genómica los virus PI-2, PI-4, Parotiditis, SV5 y LPW serán clasificados en un género aparte llamado Rubulavirus.

FUNCIONES DE LAS PROTEINAS DE LOS PARAMYXOVIRUS.

PROTEINA	FUNCION PRINCIPAL
HN	Glicoproteína de la envoltura viral responsable del reconocimiento del receptor celular.
F	Glicoproteína de la envoltura viral, su alta hidrofobicidad favorece la fusión con la membrana celular y la formación de sincicios.
N	Proteína asociada a la parte interna de la envoltura viral, se encarga de organizar las proteínas y nucleocápsides durante el ensamblaje del virión.
NP	Proteína estructural que constituye la base principal de la cápside viral, está asociada fuertemente al ARN genómico.
L	Proteína involucrada junto con la proteína P en la actividad polimerasa.
P	Proteína relacionada con la actividad polimerasa, parece participar en la regulación de la replicación del genoma viral

paramixovirus contienen ARN de hebra "negativa", por lo tanto, el ARNm debe ser primero transcrito por una polimerasa de ARN que viene integrada al virión (Fig. 3) [Roizman 1990].

El virión del paramixovirus porcino LPM está constituido por seis proteínas: la Hemaglutinina-Neuraminidasa (HN), la proteína de Fusión (F), la Fosfoproteína (P), la Nucleoproteína (NP), la proteína de Matriz (M) y la proteína de alto peso molecular (L) (Fig. 4) [Sundqvist et al. 1990]. En la tabla 1 se muestran en conjunto los pesos moleculares relativos de las proteínas estructurales del virus LPM y su comparación con las de otros paramixovirus [Linné 1992].

Las proteínas L, NP y P junto con el ARN viral forman la nucleocápside de los paramixovirus. Las proteínas P participan, formando un complejo con la proteína L, en la replicación del ARN viral (Fig. 5). Al parecer, la proteína NP sólo posee función estructural [Ray y Compans 1990].

La proteína M de los paramixovirus se asocia a la envoltura viral pero no está glicosilada, su función principal consiste en organizar a la nucleocápside en las zonas de la membrana celular donde abundan las glicoproteínas virales; también ha sido implicada en la regulación de la síntesis de ARN [Morrison 1988]. En el virus de sarampión, las proteínas M están relacionadas con la inducción del daño a la membrana celular de neuronas y en la presentación de panencefalitis esclerosante subaguda [Ray y Compans 1990]. La

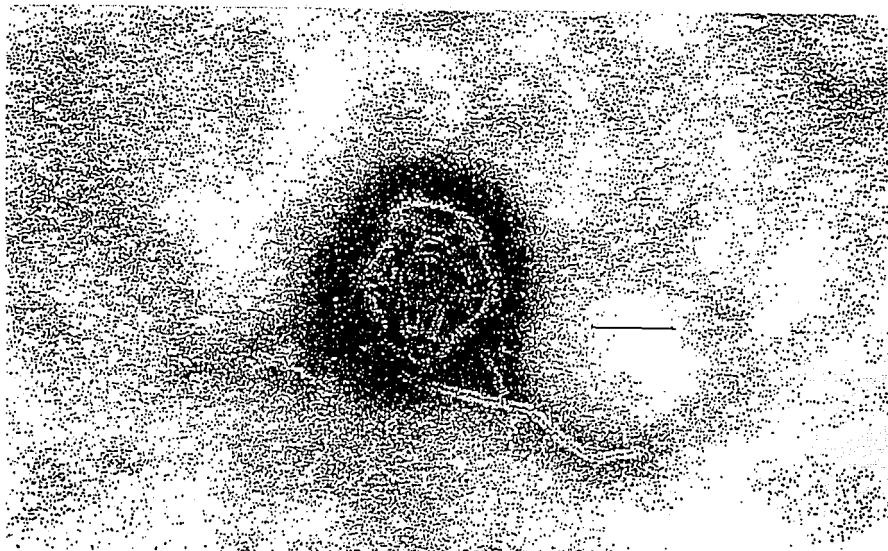


FIG. 2. MICROGRAFIA ELECTRONICA DEL PARAMIXOVIRUS LPM.

Tinción negativa (ácido fosfotungstico) de un virión del virus LPM aislado del cerebro de un lechón con signos de encefalomyelitis.

Nótese la envoltura viral con proyecciones (complejos de glicoproteínas) y la nucleocápside helicoidal enmarañada en el interior del virión. Es común observar nucleocápsides separadas, debido a la fragilidad de la envoltura viral (Moreno-López et al. 1986).

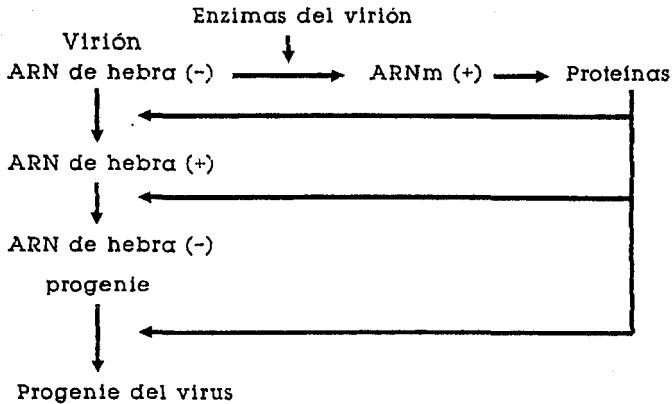


Fig. 3. FLUJO DE EVENTOS DURANTE LA REPLICACION DE LOS PARAMIXOVIRUS. Tomado de Roizman (1990).

El virión de los paramixovirus está formado por un ácido ribonucléico (ARN) de cadena (-) que sirve de molde para 1. La transcripción de un ARNm, que codifica para las proteínas virales y que es sintetizado por una transcriptasa que viene asociada al virión. 2. Una vez iniciada la síntesis de proteínas virales, la hebra parental sirve de molde para la síntesis de ARN de cadena (+) (diferente al transcrito inicial de ARNm) que a su vez será utilizado para la síntesis de múltiples copias de ARN (-) que formarán el genoma de la progenie viral (Roizman 1990).

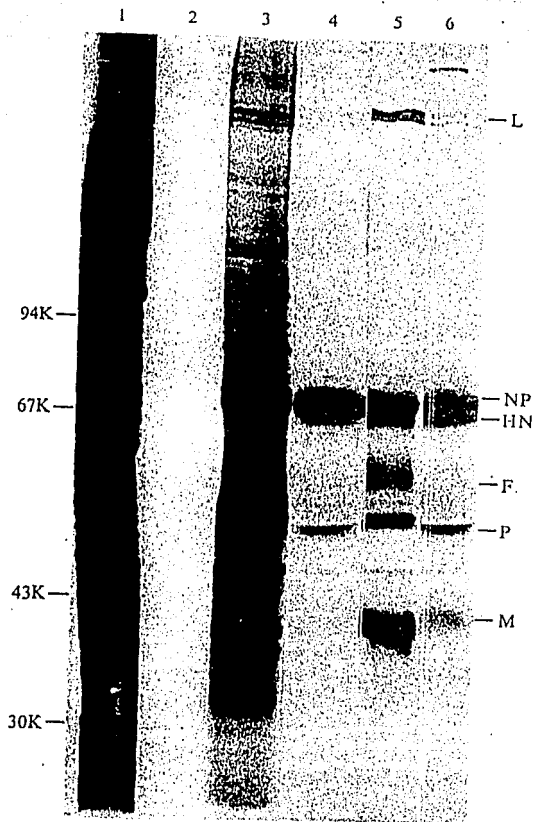


Fig. 4. PERFIL ELECTROFORETICO DEL VIRUS LPM. El virus LPM fué marcado con ^{35}S -metionina y posteriormente inmunoprecipitado. Líneas 1 y 2, células PK-15 no infectadas. Líneas 3 y 4, células infectadas con virus LPM. Líneas 5 y 6, virus LPM purificado. Líneas 2, 4 y 6 contienen el material inmunoprecipitado con un suero hiperinmune anti virus LPM. Las letras a la derecha corresponden a las proteínas virales (cuadro 1). Tomado de Sundqvist et al. 1990.

Tabla 1. PESOS MOLECULARES RELATIVOS DE LAS PROTEINAS ESTRUCTURALES DE LOS PARAMIXOVIRUS.

Proteína	Virus				
	LPMv	PI-3	Sendai	NDV	Parotiditis
L	200	200	200	200	200
HN	66	68	71	72	79
NP	68	65	58	53	72
F	59	54	49	53	61
P	52	79	79	53	45
M	40	39	38	37	40

Los pesos moleculares de las diferentes proteínas de los paramixovirus se obtuvieron de Sundqvist et al. (1990) y de las referencias de ese artículo. Los pesos moleculares están expresados en KD.

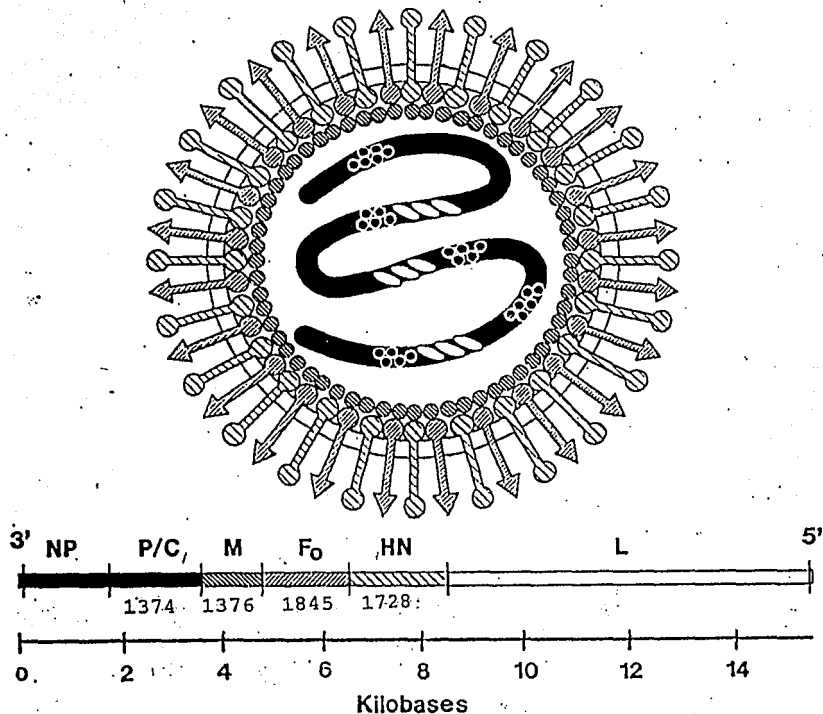


FIG. 5. DIAGRAMA DE UNA PARTICULA DE PARAMIXOVIRUS Y DEL MAPA GENOMICO. Los genes y las proteínas que ellos codifican están marcados con el mismo tipo de sombreado. La nucleocápside interna (negro) contiene al ARN genómico junto con las proteínas estructurales de nucleocápside, NP. Las proteínas asociadas al genoma P (círculos) y L (óvalos) que participan en la replicación del ARN viral. En la parte interna de la envoltura se encuentra la proteína M (círculos rayados) y en la parte externa las glicoproteínas HN (proyecciones redondas) y F (proyecciones triangulares). El mapa genómico muestra la secuencia de genes determinada para el virus LPM, los números corresponden a los nucleótidos que constituyen cada gen (Linné et al 1992). El esquema fué tomado de un modelo para el virus Sendai (Kingsbury 1990).

proteína M del virus LPM es rica en aminoácidos básicos, estos le confieren una carga neta positiva que puede ser importante en su interacción con otros componentes virales y celulares durante el ensamblaje del virión [Berg et al. 1991].

La glicoproteína HN de los paramixovirus forma parte de la envoltura viral y se ha implicado en el reconocimiento y enlace, con gran afinidad, a estructuras celulares que contienen ácido siálico. Las proteínas HN forman dímeros y tetrameros unidos por puentes disulfuro, responsables de la observación de proyecciones en la superficie del virión. Estos complejos presentan a los receptores celulares un grupo de sitios de adhesión que incrementan la probabilidad de interacción productiva [Kingsbury 1990]. Análisis de las secuencias nucleotídicas han demostrado que la porción hemaglutinina de la proteína HN, es muy conservada entre los diferentes paramixovirus [Morrison 1988]. La proteína HN presenta también un dominio conservado con capacidad para eliminar los residuos de ácido siálico de los receptores celulares permitiendo un mayor acercamiento con estructuras celulares que actúan como receptores secundarios [Huang et al. 1980]. Recientemente, se ha propuesto que existe una gran homología en aminoácidos funcionales entre la proteína HN de los paramixovirus con la neuraminidasa del virus Influenza tipo A [Colman, Hoyne y Lawrence 1993]. Asimismo, la proteína HN del virus LPM conserva gran homología, en la secuencia de aminoácidos de sus dominios funcionales, con otros Paramixovirus [Sundqvist et al. 1991].

La glicoproteína F de los paramixovirus realiza funciones esenciales en la penetración de la célula, pues logra la fusión de la envoltura viral a la porción externa de la membrana celular. También es expresada sobre la superficie de la célula infectada, lo que permite que tal célula fusione su membrana con la de la célula vecina no infectada, produciendo la formación de sincicios y la extensión de la infección en el área local por este mecanismo de reclutamiento. La proteína F se sintetiza en forma de dos precursores (F1 y F2) unidos por un puente disulfuro para formar un heterodímero con actividad biológica [Kingsbury 1990].

El análisis de los genes para las proteínas HN [Sundqvist 1991], M [Berg et al. 1991] y P [Berg et al. 1992] ha mostrado la estrecha relación existente entre el virus LPM y los virus del subgrupo II de paramixovirus: parotiditis, virus símico 5 (SV5), Parainfluenza-2 (PI-2) y PI-4; encontrándose un porcentaje de homología en secuencia de aminoácidos alrededor del 40% con estos virus y del 30% con virus del subgrupo I: Sendai, PI-1, PI-3 humano y PI-3 bovino (Tab. 2) [Linné et al 1992]. Se han presentado evidencias de que el ARNm de la proteína P del virus LPM, involucrada en la replicación viral, sufre un procesamiento postranscripcional similar al ocurrido en el virus de la parotiditis humana; este procesamiento conduce a la expresión diferencial de proteínas P, V o C [Berg et al. 1992]. El significado biológico de la expresión de las diferentes proteínas es desconocido, sin embargo esto indica que el virus LPM y el virus de la parotiditis son muy cercanos

Tabla 2. PORCENTAJE DE IDENTIDAD EN AMINOACIDOS DE LAS PROTEINAS HN, H y G DE LOS PARAMIXOVIRUS.

VIRUS	MuV	SV5	PI-2	PI-4	NDV	SV	PI-3	MV	RSV
LPMv	41	43	38	35	32	26	28	16	18
MuV	-	45	40	38	34	27	26	19	18
SV5		-	46	39	35	27	27	23	22
PI-2			-	37	33	25	28	14	21
PI-4				-	32	27	25	18	21
NDV					-	27	27	15	23
SV						-	48	20	22
PI-3							-	20	18
MV								-	15

La identidad en secuencia de aminoácidos fué obtenida de Sundqvist et al. (1991) y de las referencias que ahí se mencionan.

evolutivamente, y pudieran conservar similitud en sus mecanismos reguladores de la replicación [Linné 1992].

Al parecer, la relación genética del virus LPM con virus de los géneros Morbillivirus y Pneumovirus, es escasa [Linné et al. 1992].

Con base en los datos acumulados, el virus LPM ha sido clasificado como nuevo miembro del género Paramixovirus. Sin embargo, se ha propuesto recientemente que el virus LPM sea clasificado junto con los virus SV5, parotiditis, PI-2 y PI-4 dentro de un nuevo género de la familia Paramixoviridae, llamado Rubulavirus.

Propiedades biológicas del virus LPM.

El virus LPM se replica con facilidad en el citoplasma de cultivos primarios de células de riñón de cerdo, tiroides de bovino y en las líneas celulares PK-15, TC, Vero, CK, BEK, BHK-21 y ED [Moreno-López et al. 1986]. También crece en la cavidad alantoidea de embriones de pollo de 6 días, provocando mortalidad del 50% de los embriones en un período de incubación de 72 horas [Stephano, Gay y Ramírez 1988].

En cultivo primario de riñón y en células Vero, el efecto citopático producido por el virus LPM consiste casi exclusivamente en la formación de sincicios (Fig. 6). Sin embargo, en cultivos de células PK-15 el virus LPM produce vacuolación seguida por lisis celular y la formación de sincicios es escasa (resultados Fig. 11).

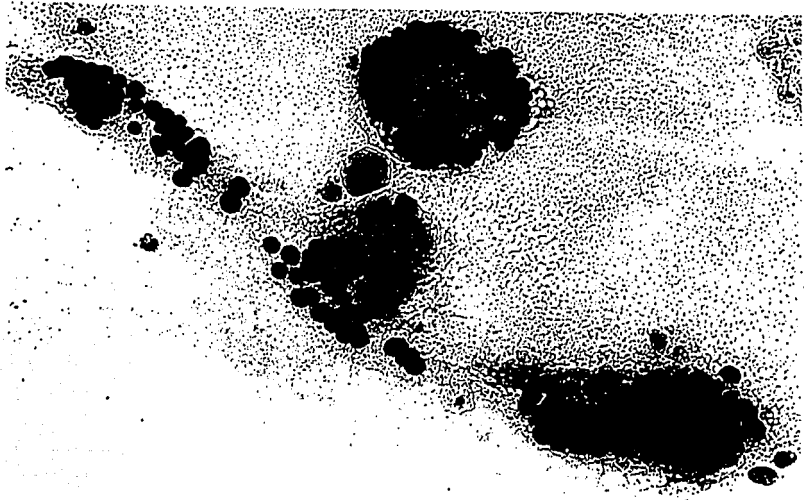


FIG. 6. EFECTO CITOPATICO EN CELULAS VERO INFECTADAS CON VIRUS LPM.

Cultivo de células Vero (riñón de mono verde africano) infectado con 1000 UFS del virus LPM. La formación de sincicios es muy abundante, llegando a formarse sincicios con más de 50 núcleos. Los cultivos de células Vero infectados con virus LPM sufren poca lisis celular.

El daño celular se empieza a observar en el segundo día postinfección y se completa en el quinto día [Martínez et al. 1985].

El virus LPM tiene la capacidad de aglutinar eritrocitos de una gran variedad de mamíferos y aves tales como: carnero, oveja, cabra, vaca, caballo, cerdo, gato, perro, cobayo, conejo, rata, ratón, hámster, pollo, gallina, pavo y humano de tipo A. B y O. Debido a la presencia de neuraminidasa en su envoltura, también produce lisis de los eritrocitos señalados [Moreno-López et al 1986, Stephano, Gay y Ramírez 1988].

Inmunidad.

Es escasa la información generada en relación a la inmunidad en la enfermedad del ojo azul. Algunos datos, como la autolimitación de la enfermedad en una zona de brote, sugieren que la inmunidad es sólida [Stephano y Gay 1985]. En animales convalescientes de la enfermedad se pueden identificar títulos altos de anticuerpos por periodos prolongados [Hernández-Jáuregui et al. 1992].

No obstante la estrecha relación genética y estructural existente, el virus LPM no comparte determinantes antigénicos importantes con otros paramixovirus, ya que los sueros hiperinmunes contra PI-1, PI-2, PI-3, sarampión, parotiditis, virus sincicial respiratorio

humano y bovino y virus de la enfermedad de Newcastle no reaccionaron con el virus LPM en pruebas de neutralización, inmunofluorescencia, fijación del complemento, inmunodifusión doble (Fig. 7) e inhibición de la hemaglutinación [Martínez et al. 1985, Moreno-López et al. 1986]. Esto adquiere mayor importancia al conocer que sueros colectados desde 1972 presentaron títulos altos de anticuerpos contra el virus LPM. Estos datos sugieren que el virus LPM ya se encontraba distribuido dentro de la población porcina mucho antes de identificarse la enfermedad del ojo azul [Rosales, Martínez y Correa 1988].

Por el momento, no existe vacuna comercial contra la enfermedad del ojo azul, aunque se han desarrollado algunas vacunas que han mostrado buenos resultados en la prevención de la enfermedad experimental [Reyes-Leyva 1988, Hernández y Hernández 1990, Hernández-Jáuregui et al. 1990, Hernández-Jáuregui et al. 1992].

Receptores virales.

El evento inicial en la infección viral es el reconocimiento de células susceptibles, que poseen en su superficie moléculas que actúan como receptores virales. La unión del virus a su receptor es mediada por proteínas de adherencia viral [Tardieu, Epstein y Weiner 1982]. La interacción entre las proteínas de adherencia viral y el receptor permite que el virus se introduzca a la célula,

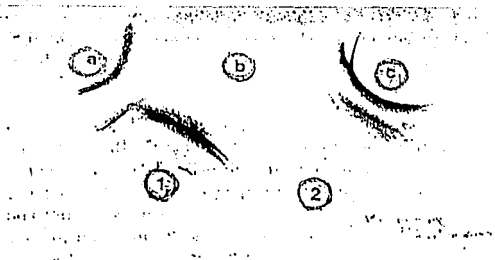


FIG. 7. INMUNODIFUSION DOBLE CON SUERO ANTI VIRUS LPM.

a. Suero de un cerdo experimentalmente infectado con el virus LPM. b. Suero de conejo hiperinmunizado con el virus LPM. c. Suero de un cobayo hiperinmunizado con la cepa bovina del virus PI-3. 1. Virus LPM. 2. Virus PI-3. No hubo reacción cruzada entre 2 y b. En otros ensayos el virus LPM tampoco ha mostrado reacciones cruzadas contra los virus PI-1, PI-2, PI-3 humano, sarampión, parotiditis, VSR humano y bovino y NDV. Tomado de Moreno-López et al. 1986.

este proceso puede realizarse por endocitosis o por fusión con la membrana celular (Fig. 8) [Sharpe y Fields 1985]. Muchos virus, como los picornavirus, utilizan una sola proteína, VP1, para adherirse y penetrar a su célula blanco. Sin embargo, los virus complejos pueden tener más de una proteína de adherencia en su superficie y reconocer distintas estructuras celulares [Tardieu, Epstein y Weiner 1982]. Algunos virus utilizan estrategias complejas para asegurar la infección. Por ejemplo, si la penetración no resulta, los paramixovirus pueden separarse de las células después de escisión del ácido neurámico de sus receptores, utilizando una neuraminidasa, así el virus aparentemente reconoce a la célula que va a infectar [Roizman 1990].

Un gran número de moléculas celulares se han identificado como receptores virales. Entre ellas tenemos el receptor para factores del crecimiento epidermal que es utilizado por el virus vaccinia tipo 6 [Eppstein et al. 1985], la molécula C3d de linfocitos humanos, es el receptor del virus Epstein-Barr [Fingerroth et al. 1984] y el receptor para acetilcolina es utilizado por el virus de la rabia [Lentz et al. 1982]

Diversos virus reconocen como receptores primarios o secundarios a moléculas sacarídicas. Por ejemplo, los virus varicela zoster y herpes simple utilizan para enlace inicial moléculas de heparán sulfato [WuDunn y Spear 1989], sin embargo, la unión más específica

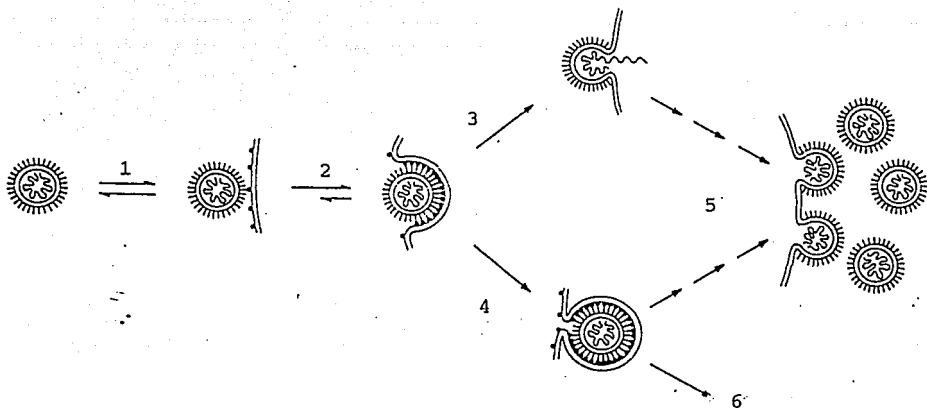


FIG. 8. MECANISMOS DE INFECCION EN VIRUS CON ENVOLTURA.

1. El primer evento de la infección viral es el reconocimiento de receptores celulares, esta reacción es reversible, de tal forma que el virus puede separarse para buscar otra célula. 2. La afinidad entre las proteínas de adherencia viral y los receptores refuerza la interacción inicial e induce la invaginación de la membrana celular. La penetración a la célula puede seguir dos vías: 3. La fusión en la superficie celular, conduce a la liberación del genoma en el citoplasma, o 4. Se produce endocitosis del virión el cual queda incluido dentro de una vesícula; para que el genoma pueda ser liberado se requiere de un aporte de protones que incrementa la acidez de la vesícula para que se separe la nucleocápside viral. La infección puede ser productiva (5), es decir, el genoma se replica y hay liberación de viriones. se presenta infección abortiva (6) en la cual la célula no permite la replicación viral. Tomado de Sharpe y Fields (1985).

de estos virus ocurre con otra estructura, el receptor para factores del crecimiento de fibroblastos [Yayon et al. 1991]; los virus de influenza tipo A y B, interactúan con moléculas del ácido N-acetilneuramínico, y pueden discriminar entre moléculas sialiladas de acuerdo a sus enlaces glicosídicos [Weis et al. 1988]; los virus influenza tipo C y los coronavirus, parecen reconocer el enlace tipo éster del ácido N-acetil-9-O-acetilneuramínico [Herrler et al. 1985, Vlasak et al. 1988]. En el citomegalovirus murino la virulencia parece estar directamente relacionada con el reconocimiento conjunto de ácido neuramínico y N-acetilglucosamina [Ravindranath y Graves 1990].

La especificidad y afinidad de las proteínas de adherencia viral por el receptor en las células blanco determina el tropismo tisular y el rango de hospedero de un virus [Tardieu, Epstein y Weiner 1982]. La localización de los receptores en sitios estratégicos, celulares o tisulares, ha sido decisiva en la evolución de cada familia viral [Pastan y Willingham 1981]. La expresión de posibles receptores virales en una célula determina la susceptibilidad a la infección, pero no implica que tal célula sea permisible a la replicación del virus. Así, el receptor para poliovirus, ICAM-1, se expresa en células del tracto gastrointestinal y en neuronas, lugares donde la replicación de estos virus es permitida. Sin embargo, en otras células que expresan ICAM-1 no hay una infección productiva, esto implica que los poliovirus requieren algunos elementos celulares específicos que permitan su replicación [Rueckert 1990].

En algunos virus la especificidad por el receptor es controversial, por ejemplo los paramixovirus reconocen como receptor moléculas ubicuas, que contienen ácido siálico, y sin embargo el rango de hospedero de cada miembro de esta familia viral es restringido [Kingsbury 1990].

No obstante la diversidad de receptores virales conocidos, la mayoría de ellos son glicoproteínas, glicolípidos o sialiloligosacáridos. Las porciones glicánicas de un receptor pueden actuar directamente como el sitio de unión para las proteínas de adherencia viral, o actúan manteniendo una conformación adecuada del sitio receptor [Tavakkol y Burness 1990].

Glicosilación.

La glicosilación es una cualidad común de la mayoría de las membranas eucarióticas y proteínas de secreción. Las porciones glicánicas, de glicoproteínas y glicolípidos, están presentes exclusivamente sobre la superficie externa de la membrana plasmática y forman parte de los receptores para diversas hormonas, toxinas o bacterias entre otros.

Los carbohidratos están unidos por enlaces O- y N-glicosídicos a las proteínas de la superficie celular y su biosíntesis sigue la vía de glicosilación general establecida para esta clase de compuestos. En el caso de estructuras N-glicosiladas dos fases

pueden ser distinguidas en la vía de glicosilación:

1°. El ensamble de un oligosacárido precursor ($\text{Glc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$), sobre el transportador Dolicol pirofosfato (Dol-PP), el cual transfiere estos precursores a las cadenas de polipéptidos recién sintetizadas en el retículo endoplásmico (RE).

2°. Una vez unido, el oligosacárido sufre una secuencia de reacciones de separación en las que intervienen principalmente las enzimas glucosidasas I y II del RE y manosidasas I y II del aparato de Golgi. La adición de residuos de N-acetilglucosamina, galactosa, fucosa y ácido siálico catalizada por glicosiltransferasas específicas en el compartimiento trans-Golgi, completa el ensamble del complejo de oligosacáridos (Fig. 9). Dependiendo del grado de procesamiento, una gran variedad de oligosacáridos de tipo manosídicos y N-acetilactosamínicos pueden ser observados en las superficies celulares (Fig. 10) [Kornfeld y Kornfeld 1985].

El uso de antibióticos inhibidores de la glicosilación ha permitido estudiar el papel que juegan los oligosacáridos de glicoproteínas virales y celulares durante los procesos de infección [Klenk 1990].

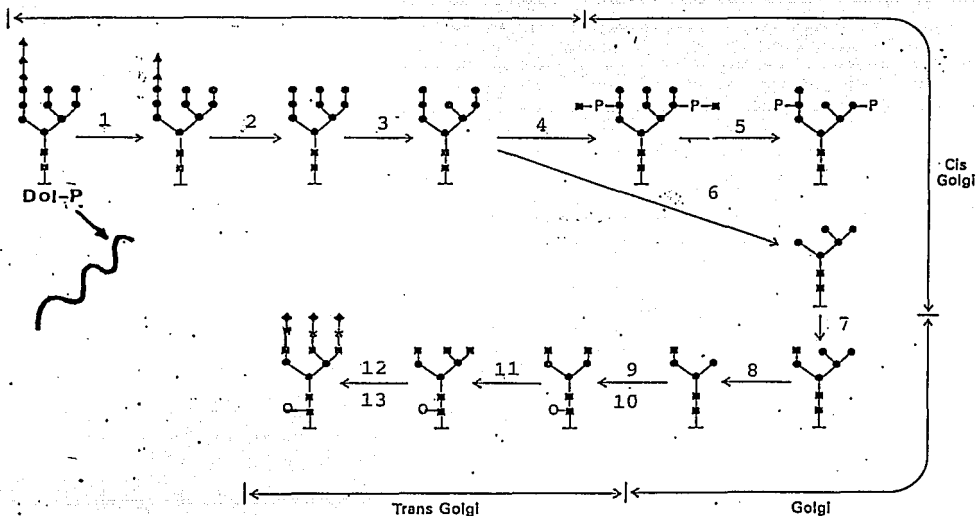


FIG. 9. VIA DE GLICOSILACION DE LOS N-GLICANOS.

El proceso se inicia cuando el Dolicol pirofosfato (Dol-P) transfiere, al polipéptido recién sintetizado, un oligosacárido precursor formado por tres glucosas (triángulos), nueve manosas (círculos oscuros) y dos N-acetilglucosaminas (cuadros). Este oligosacárido sufre una serie de reacciones de separación en las que intervienen las enzimas glucosidasas I (1) y II (2) y α-1,2 manosidasa (3) del retículo endoplásmico y las manosidasas I (6) y II (8) del aparato de Golgi. La adición de residuos N-acetilglucosamina, fucosa (círculos claros), galactosa (estrellas) y ácido siálico (rombos) es realizada por glicosiltransferasas específicas (4,7,9-13).

Cada tipo celular posee diferente actividad enzimática en relación a su vía de glicosilación, por lo que se puede observar gran variedad de estructuras oligosacarídicas en las superficies celulares [Kornfeld y Kornfeld 1985].

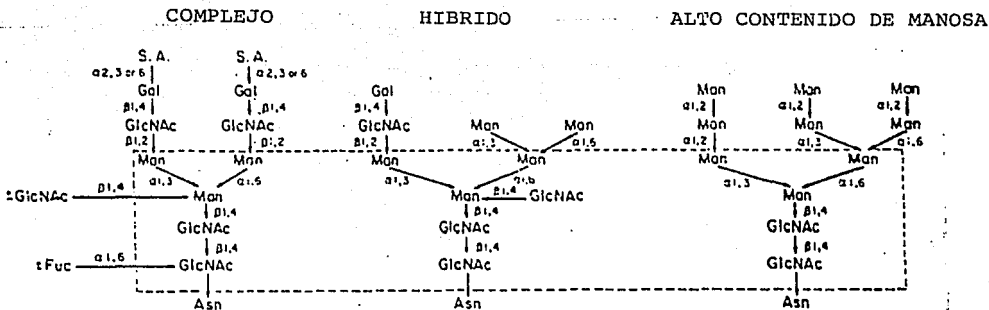


FIG. 10. ESTRUCTURAS DE LOS PRINCIPALES OLIGOSACARIDOS PRESENTES EN LAS SUPERFICIES CELULARES.

Dependiendo del grado de procesamiento que sufran las estructuras glicánicas en la vía de glicosilación, éstas pueden expresar oligosacáridos de tipo complejo, con terminaciones de ácido siálico (S.A.) y ramificaciones laterales de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y de fucosa (Fuc); o pueden expresar moléculas con un gran contenido de manosa (Man). Algunos glicanos expresan moléculas híbridas con terminaciones en galactosa (Gal) o en manosa con cadenas laterales de N-acetilglucosamina. Tomado de Kornfeld y Kornfeld 1985.

JUSTIFICACION.

El aislamiento e identificación de nuevos virus se realiza en individuos con signos clínicos que no se ajustan a las entidades patológicas conocidas. La propagación de algunos virus con gran actividad patogénica se determina cuando una epidemia está presente. Por lo tanto, es importante definir cuales son los factores que influyen para que un virus aparentemente "inocuo", adquiera carácter patogénico y se manifieste como enfermedad.

En nuestro laboratorio, en el Depto. de Bioquímica de la Fac. de Medicina, estamos interesados en estudiar las interacciones celulares mediadas por carbohidratos como el reconocimiento, la comunicación y la adhesión. En relación al paramixovirus porcino LPN, nos interesa reconocer la naturaleza química de su receptor celular y determinar cómo influye la presencia de esas estructuras en el comportamiento patológico del virus.

Las proteínas de adherencia viral reconocen estructuras específicas de la membrana celular, cuya distribución tisular puede influir sobre el tropismo tisular y el rango de hospedero del virus. De la misma manera, la relación que guarde el receptor de un virus dado con el resto de las estructuras celulares puede alterar la capacidad de reconocimiento viral y por lo tanto la susceptibilidad o resistencia a la infección.

OBJETIVOS.

Definir la especificidad de reconocimiento del paramixovirus porcino LPM por oligosacáridos celulares, determinar su participación en el proceso de infección y su influencia sobre el tropismo tisular y el rango de hospedero del virus.

HIPOTESIS

El alto nivel de expresión, en la superficie celular, convierte a los oligosacáridos en blanco de las proteínas de adherencia de múltiples virus. La expresión de oligosacáridos sialilados en líneas celulares o en tejidos porcinos determina la susceptibilidad a la infección por el paramixovirus porcino LPM.

MATERIAL Y METODOS.

Reactivos.- Azúcares, glicósidos y glicoproteínas complejas, neuraminidasa de *Vibrium cholerae*, medio esencial de mantenimiento de Eagle (E'MEM), solución de Hank, tinción de Giemsa, tinción de May-Grünwald, suero fetal bovino, lectinas de *Canavalia ensiformis* (Con A), *Arachis hypogaea* (PNA) y de *Lens culinaris* (LCA), isotiocianato de fluoresceína (FITC) y de rodamina (TRITC) fueron obtenidos de Sigma Chemicals, USA. Tripsina de páncreas bovino se obtuvo de Difco, Co. USA. Lectinas de *Maackia amurensis* y de *Sambucus nigra*, tunicamicina, desoxinojirimicina y desoximanojirimicina se obtuvieron de Boehringer-Mannheim Biochemica, Alemania. Sialil(α 2,3)lactosa, sialil(α 2,6)lactosa, ácido N-glicolilneuramínico, gangliósido Gm1, IgA, IgM e IgG séricas humanas, de alta pureza, fueron amablemente donados por el Prof. Claude Michalsky de la Universidad de Ciencias y Tecnologías de Lille, Francia. Las botellas y placas para microcultivo celular y los tubos para centrifuga fueron obtenidos de Nunc, Dinamarca; las placas para microensayo de hemaglutinación fueron obtenidas de Falcon, USA; los tubos de criopreservación y para microfuga fueron de Nalgene, USA.

Células y Virus.- Eritrocitos de humano tipo A1, A2, B y O, de carnero, cerdo, cobayo, conejo, rata y pollo fueron mantenidos en solución de Alsever hasta su uso. Las células de riñón de cerdo, PK-15, fueron cultivadas en botellas de 200 y 750 mL y se utilizaron para la multiplicación del virus. Las células de riñón

de mono verde africano, Vero, fueron cultivadas en botellas de 50 mL y se utilizaron en los ensayos de infección y de inhibición de la infección. Ambas líneas celulares fueron cultivadas con E'MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino. El paramixovirus porcino cepa LPM fué donado gentilmente por el Dr. Jorge Moreno López de la Universidad de Uppsala, Suecia. El virus fué replicado, a bajo pasaje, en cultivos de células PK-15, con E'MEM suplementado con 2% de suero fetal bovino.

Purificación Viral.- El sobrenadante de cultivos infectados fué clarificado por centrifugación a 3,200 rpm por 20 min y almacenado a -20°C hasta su uso. El virus contenido en los sobrenadantes fué precipitado con polietilenglicol 6,000 (10% p/v), durante 4 h a 4°C con agitación leve y se centrifugó a 3200 rpm 20 min. El botón se resuspendió en solución NTE (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, pH 7.5) con un volumen equivalente al 5% del volumen original, se congeló inmediatamente en N₂ líquido y se mantuvo en congelación a -56°C (35). El virus fué purificado por centrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa (25% y 50%), 1 h a 100,000 x g. Después, se recuperó la interfase viral, se diluyó 1:10 y se centrifugó 4 h más a 100,000 g en un gradiente lineal de sacarosa (10-60%). Al final, el virus se obtuvo por sedimentación al través de una solución de sacarosa al 30% [Sundqvist et al 1990] El virus se tituló por pruebas de hemaglutinación (HA) y unidades formadoras de sincicios (UFS). La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford. El grado de homogeneidad del

material purificado se analizó por el patrón electroforético en geles de poliacrilamida bajo condiciones reductoras siguiendo los procedimientos descritos por Laemmli (1970).

Determinación de la concentración de proteína. La concentración de proteínas se determinó siguiendo el método de Bradford (1976) modificado para microvolúmenes. Se realizó una curva de concentración de 0-10 $\mu\text{g/mL}$ de una proteína conocida, albúmina sérica bovina (BSA), en un volumen final de 100 μL por tubo. En un tubo aparte, se colocó un volumen de 40-60 μL de la muestras del gradiente. Todas las diluciones se realizaron con agua destilada. A todos los tubos se les añadió 1 mL del reactivo de Bradford (azul de Coomasie G-250 100 mg, etanol 95% 50 mL, ácido ortofosfórico 85% p/v 100 mL, agua destilada c.b.p. 1000 mL). Se agitaron los tubos en vortex y se esperaron 10 min, colocando los tubos en obscuridad antes de leer en espectrofotómetro a 595 nm.

Preparación de suero hiperinmune.- Un antisuero polivalente contra el paramixovirus LPM fué preparado en 4 conejos por inoculación subcutánea de 100 μg de virus purificado, emulsificado (v/v) en adyuvante completo de Freund. Esta dosis de virus fué aplicada nuevamente a los 10 días con adyuvante incompleto de Freund y la misma dosis viral sin adyuvante, se aplicó tres veces más en las siguientes 3 semanas. Los conejos fueron sangrados 1 semana después de la última inoculación. El suero fué separado por centrifugación y se le determinó el título de anticuerpos contra el virus LPM por

las técnicas de ELISA e inhibición de la hemaglutinación [Hernández-Jáuregui et al. 1992]. Los anticuerpos fueron precipitados utilizando sulfato de amonio al 30% (p/v), se dializaron contra PBS, y se dividieron en alícuotas que se mantuvieron a -20°C hasta su uso [Hudson y Hay 1989].

Estandarización del contenido viral para los ensayos biológicos. En la mayoría de los ensayos se utilizaron como fuentes de virus los sobrenadantes de diferentes cultivos de células PK-15 infectadas con paramixovirus LPM. Los cultivos infectados fueron seleccionados entre el 3er y 5o día postinfección de acuerdo a la presencia de efecto citopático (vacuolización y lisis). Las células de los cultivos seleccionados fueron lisadas totalmente someténdolas 3 veces a choque térmico. Los sobrenadantes se colectaron después de clarificar por centrifugación a 3,200 rpm 20 min y se filtraron por membrana 0.22 µm, se les determinó la actividad hemaglutinante y se les ajustó el título a 32 unidades hemaglutinantes (UHA) con eritrocitos de carnero. Los sobrenadantes filtrados se dividieron en alícuotas de 1 ml y se almacenaron a -56°C hasta su uso.

Ensayos de hemaglutinación.

Aglutinación de eritrocitos de diversas especies animales.

La capacidad hemaglutinante del paramixovirus LPM se probó en placas de 96 pozos con fondo en U. 25 μ L del virus LPM fueron diluidos serialmente con un volumen igual de PBS, después, 50 μ L de eritrocitos al 1% fueron añadidos a cada pozo. Se utilizaron eritrocitos de humano tipo A1, A2, B y O, de carnero, cerdo, cobayo, conejo, rata y pollo. La hemaglutinación se determinó, por observación directa, después de 90 min de incubación a 4°C. El título fué reportado como el inverso de la última dilución del virus con actividad hemaglutinante [Osawa y Matsumoto 1972].

Hemaglutinación de eritrocitos tratados con enzimas.- Aliquotas de 0.5 mL del paquete de eritrocitos de humano y de carnero fueron incubadas 30 min a 37°C con neuraminidasa (0.1 U) o con tripsina (0.1 mg). Después, los eritrocitos se lavaron tres veces con PBS a 2000 rpm 5 min y se prepararon suspensiones al 1% en PBS. Los ensayos de hemaglutinación se realizaron por la técnica de dilución seriada del virus LPM [Markwell, Fredman y Svennerholm 1984].

Especificidad por oligosacáridos del virus LPM.

La especificidad por oligosacáridos del virus LPM fué determinada comparando la capacidad inhibidora de diversos azúcares, glicósidos y glicoproteínas sobre su actividad hemaglutinante. Diluciones dobles seriadas de cada compuesto se incubaron, 1 h a 4°C, en

presencia de 4 UHA del virus. Posteriormente, se agregaron eritrocitos de carnero en suspensión al 1% y se dejaron incubar 90 min a 4°C [Osawa y Matsumoto 1972]. Los compuestos utilizados fueron los siguientes: D-manosa, metil-D-manosa, D-glucosa, N-acetil-D-glucosamina, D-galactosa, N-acetil-D-galactosamina, L-fucosa, D-xilosa, trehalosa, sacarosa, d(-) arabinosa, lactosa, lacto-N-tetraosa, heparán-sulfato, dextrán-sulfato, condroitín-sulfato, ácido N-acetilneuramínico, ácido N-glicolilneuramínico, glicósido α -metil-neuramínico, glicósido β -metilneuramínico, ácido colomínico, sialil(α 2,3)lactosa, sialil(α 2,6)lactosa, protamina, albúmina sérica bovina, mucina submaxilar bovina, mucina submaxilar ovina, mucina submaxilar ovina desializada, fetuina bovina, fetuina bovina desializada, transferrina humana, glicoproteína α 1 ácida humana, glicoproteína α 1 ácida humana desializada, IgA sérica humana, IgA sérica humana desializada, IgG sérica humana, IgM sérica humana, sialoglicoproteína (SGP) I, SGP II, SGP III de rata, glicopéptidos de estroma de eritrocitos de rata, glicopéptidos de estroma de eritrocitos humanos, glicopéptidos de mucina submaxilar bovina y mezcla de gangliósidos conteniendo Gm1, Gd1a, Gds, Gts bovinos. Las concentraciones iniciales utilizadas de cada compuesto fueron las siguientes: azúcares 0.2 M, glicósidos 0.2 mM, glicoproteínas y gangliósidos 1 mg/mL y glicopéptidos 10 mg/ml.

Purificación de la hemaglutinina viral. La purificación de la hemaglutinina, proteína HN, del virus LPM se realizó de la siguiente manera. El virus contenido en sobrenadantes clarificados

de células infectadas fué precipitado con polietilenglicol 6000, en agitación durante 4 h a 4°C y centrifugado 20 min a 3200 rpm. El botón viral fué sometido a choque térmico, pasando 5 veces de -56°C a +37°C. Después de esto, el virus fué centrifugado, a 100,000xg 4 h, en un gradiente discontinuo de sacarosa de 50% y 25% en solución NTE. Las fracciones del gradiente fueron separadas en muestras de 1 mL, a las cuales se les determinó concentración de proteína [Bradford 1976], actividad hemaglutinante [Osawa y Matsumoto 1972] y perfil electroforético en geles de poliacrilamida (Laemmli 1970). La proteína HN, obtenida por este procedimiento, fué utilizada en los ensayos de inhibición de la hemaglutinación para determinar su especificidad por oligosacáridos.

Especificidad por oligosacáridos de la hemaglutinina viral.

La especificidad por oligosacáridos de la proteína HN del virus LPM fué determinada en ensayos de inhibición de la hemaglutinación. Diluciones dobles seriadas de cada compuesto se incubaron, 1 h a 4°C, en presencia de 4 UHA de la proteína HN purificada. Posteriormente, se agregaron eritrocitos de carnero en suspensión al 1% y se dejaron incubar 90 min a 4°C [Osawa y Matsumoto 1972]. Los compuestos utilizados fueron los mismos que se utilizaron para inhibir la actividad del virus LPM completo, incluyendo azúcares simples, glicósidos, glicoproteínas, glicopéptidos y glicolípidos (gangliósidos).

Caracterización físico-química de la proteína HN.

Efecto de la temperatura de incubación sobre la actividad de la proteína HN. La hemaglutinación se realizó de acuerdo a la técnica de dilución seriada de la proteína HN incubando con eritrocitos de carnero al 1% a las siguientes temperaturas, 4°, 7°, 23° y 37°C.

Hemaglutinación en presencia de cationes divalentes. Se probó la actividad de la proteína HN con eritrocitos de carnero en presencia de soluciones de CaCl_2 , MnCl_2 o MgSO_4 . La hemaglutinación se llevo a cabo realizando diluciones de la proteína HN en presencia de concentraciones constantes (0.001-0.2M) de cada compuesto. La hemaglutinación también se realizó con diluciones subaglutinantes de la proteína HN en presencia de concentraciones constantes de cada solución. Como testigo se colocaron eritrocitos en presencia de las diluciones de cada compuesto.

Estabilidad térmica de la proteína HN. Siete viales con muestras semejantes de la proteína HN (32 UHA) se colocaron en las siguientes temperaturas 15°, 23°, 30°, 40°, 56°, 65° y 85°C. Se tomaron muestras de los viales entre 15° y 56°C cada 5 min y de los viales a 65° y 85°C cada min. Posteriormente, se realizó la aglutinación con eritrocitos de carnero, incubando 90 min a 4°C.

Peso molecular. El peso molecular relativo de la proteína HN fué determinado comparando su migración, en electroforesis en geles de poliacrilamida, con la de proteínas de peso molecular conocido (Laemmli 1970).

Ensayos de Infección.

Determinación de las unidades formadoras de sincicios (UFS).- Los ensayos de infección (formación de sincicios) se realizaron en placas de microcultivo de 96 pozos. Los cultivos de células Vero fueron separados con tripsina (0.25% en solución de Hank sin Mg^{++} ni Ca^{++}), las células fueron lavadas con solución de Hank tres veces, y resuspendidas a 1×10^5 cels/ml en MEM sin suero fetal bovino. La infección se realizó a temperatura ambiente por 10 min, en agitación ligera, con diluciones seriadas del virus LPM, después, se les agregó medio E'MEM y se incubaron a 37°C. Pasadas 72 hrs, las células fueron fijadas en etanol absoluto y teñidas con los colorantes de May-Grünwald y de Giemsa. La determinación del número de sincicios se realizó por observación al microscopio de luz. Una UFS fué definida como la máxima dilución de virus LPM en la cual sólo se encontró un sincicio por pozo, después de 72 h de infección [Smith 1974].

Tinción de cultivos infectados. Las células infectadas fueron teñidas con el colorante de May-Grunwald y después contrastadas con el colorante de Giemsa. El procedimiento fué el siguiente: 72 h después de la infección, se les retiró el medio a las células y se fijaron con etanol absoluto durante 10 min. Las células se secaron al aire y se tiñeron 5-10 min con colorante de May-Grunwald. Posteriormente se lavaron 2 veces con PBS pH 7.2 y se contrastaron con colorante de Giemsa diluido 1:20 en agua destilada, durante 20 min. Después de lavar rigurosamente con agua destilada, las placas se secaron y se observaron al microscopio sin contraste de fases. Las fotografías de células teñidas fueron tomadas usando rollos para impresiones en color Kodak 400 GC.

Infección en células tratadas con enzimas.- Células Vero sembradas en placas de cultivo de 96 pozos, se dejaron crecer hasta alcanzar 90% de confluencia. Las células fueron tratadas 30 min con diluciones seriadas de neuraminidasa de *V. cholerae* (0.2-0.006 U/ml) o de tripsina pancreática bovina (640-10 µg/ml). Después de esto, las células fueron lavadas tres veces con PBS para eliminar las enzimas. La infección se realizó incubando las monocapas celulares con 100 UFS/pozo del virus LPM, en agitación moderada durante 1 h a temperatura ambiente. Después, se les agregó medio MEM con 2% SFB y se incubaron a 37° C [Markwell, Fredman y Svennerholm 1984], pasadas 72 h, las células fueron fijadas y teñidas para determinar la formación de sincicios.

Efecto de azúcares sobre la formación de sincicios. 100 UFS/pozo del virus LPM fueron incubadas con diluciones seriadas de azúcares (concentración inicial 0.2M), durante 1 h a 4°C, después de lo cual se agregaron 1×10^4 células Vero a cada pozo. Después de 72 h de incubación a 37°C las células fueron fijadas y teñidas para observar la formación de sincicios [Superti y Donelli 1991]. En estos ensayos se utilizaron los siguientes azúcares: D-manosa, L-fucosa, D-galactosa, D-glucosa, N-acetil-D-glucosamina, N-acetil-D-galactosamina, ácido N-acetilneuramínico, sialil(α 2,3)lactosa y sialil(α 2,6)-lactosa.

Infección de células Vero tratadas con antibióticos inhibidores de la glicosilación. Células Vero en fase de crecimiento exponencial, cultivadas en placas de 96 pozos, fueron tratadas con diluciones seriadas (5-0.03 μ g/ml) de los antibióticos tunicamicina, desoximanojirimicina y desoxinojirimicina. Pasadas 8 h de incubación a 37°C, las células fueron infectadas con 100 UFS/pozo de virus LPM, por 1 h a temperatura ambiente en agitación ligera. Después, se les agregó medio MEM y se dejaron incubando a 37°C por 72 h [Stallcup y Fields 1981]. Una vez transcurrido este tiempo las células se fijaron y se tiñeron para observar la formación de sincicios.

Ensayos de Fluorescencia.

Conjugación de lectinas a fluorocromos. Para la conjugación se utilizaron de 1 a 5 mg de proteína (lectina), los cuales fueron dializados contra amortiguador de carbonatos 0.1 M pH 9.5, toda la noche a 4°C. Para cada mg de proteína se añadieron 5 µL de una solución de isotiocianato de fluoresceína (ITCF) o de rodamina (ITCR) en dimetilsulfóxido (100 µg/mL). El fluorocromo se agregó lentamente y se agitó durante 2 h a temperatura ambiente, envolviendo los tubos en papel aluminio para evitar el contacto con la luz. Después de esto, se dializó contra PBS pH 7.2, toda la noche. Al otro día, se obtuvo el conjugado dializado y se separó en alícuotas de 20 µL, las cuales se almacenaron a -20°C hasta su uso [Hudson y Hay 1989].

Fluorescencia en células Vero tratadas con antibióticos inhibidores de la glicosilación. En experimentos paralelos a los de inhibición de la glicosilación, las células Vero fueron cultivadas sobre cubreobjetos dentro de cajas de Petri y fueron tratadas con los antibióticos: TUN (0.6 µg/mL) DNM (2.5 µg/mL) y DMM (2.5 µg/mL). Después de 8 h de incubación a 37°C, los cubreobjetos fueron retirados, lavados 3 veces de 3 min c/u con PBS, y fijados 5 min a temperatura ambiente con acetona al 20% en PBS-BSA (0.02%). Las células fijadas se incubaron 30 min a 37°C en cámara húmeda, con las diferentes lectinas conjugadas a ITCF o ITCR. Las células se

lavaron rigurosamente con PBS-BSA-Tween 20 (0.001%) para eliminar el exceso de conjugado. Los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos con glicerol-diaminobenzidina y se sellaron con esmalte [Rockborn, Klingeborn y Junti 1990]. Las células fueron observadas en microscopio de emisión de luz ultravioleta para fluorescencia IMT-20 (Olympus).

Fluorescencia en células Vero tratadas enzimas. En experimentos paralelos a los de infección de células tratadas con enzimas, las células Vero fueron sembradas sobre cubreobjetos dentro de cajas de Petri y al alcanzar 90% de confluencia fueron fijadas con acetona en PBS-BSA. Posteriormente, Las células fueron tratadas con neuraminidasa (0.1 U/mL) o tripsina (0.1 mg/mL) 30 min a 37°C, después de esto, se lavaron 3 veces con PBS-BSA y se incubaron 30 min a 37°C con las diferentes lectinas conjugadas a fluorocromos. De aquí en adelante se siguió el procedimiento descrito anteriormente.

Cortes de tejidos porcinos. Muestras de tejido respiratorio, nervioso, digestivo y linfático fueron obtenidas de 2 cerdos de 1 día de edad, clínicamente sanos, procedentes de granjas situadas en zonas libres de la enfermedad del ojo azul. Los animales fueron sacrificados por choque eléctrico y sus tejidos fueron obtenidos

inmediatamente después de la muerte. Las muestras fueron colocadas en congelación hasta ser procesadas. Los cortes de 5 μm de espesor de los tejidos fueron obtenidos en criotomo con el compuesto Tissue Tek OCT II en Freón derretido. Los cortes colocados sobre portaobjetos fueron conservados en congelación a -20°C hasta su uso [Laitinen 1987].

Fluorescencia directa en tejidos porcinos. Los cortes de tejidos fueron incubados 30 min a 37°C en cámara húmeda con las diferentes lectinas conjugadas a fluorocromos. Pasado este tiempo, los cortes fueron lavados rigurosamente con PBS-BSA-Tween 20, se les colocó una gota de glicerol-diaminobenzidina y se cubrieron con cubreobjetos, los cuales se sellaron con esmalte. Luego se observaron al microscopio de luz ultravioleta, para determinar la unión de cada lectina a los diferentes tejidos [Nag 1985, Laitinen 1987]. En las fotografías de fluorescencia se usaron rollos para impresión en blanco y negro Kodak super x100.

Fluorescencia en tejidos porcinos tratados con enzimas. En experimentos paralelos, los tejidos fueron tratados 30 min a 37°C con neuraminidasa (0.1 U/mL) o con tripsina (0.1 mg/mL) y, después de lavarlos 3 veces con PBS, fueron incubados con las lectinas conjugadas a fluorocromos, como se mencionó anteriormente.

RESULTADOS.

Caracterización físico-química y biológica del virus LPM.

El paramixovirus porcino, cepa LPM, utilizado en este estudio fué obtenido del Departamento de Virología Veterinaria del Biomedical Center, Uppsala Suecia; donde fué caracterizado originalmente. El virus LPM es resistente a la actinomicina D, se inactiva con solventes orgánicos, posee actividades hemaglutinante, neuraminidasa, hemolítica y formadora de sincicios en cultivo celular; es pleomórfico y posee una nucleocápside helicoidal de ARN dentro de una envoltura lipoprotéica [Moreno-López et al.1986].

El virus LPM fué multiplicado en células de riñón de cerdo, PK-15, en las que produjo un efecto citopático consistente en vacuolación y lisis (Fig. 11). El virus de los sobrenadantes de células PK-15 infectadas fué concentrado por precipitación y purificado en gradientes de sacarosa. El virus purificado mostró un perfil electroforético formado por 5 o 6 proteínas (Fig. 12).

La actividad viral durante la purificación fué determinada por hemaglutinación, 100 mL de sobrenadante mostraron un título de 1,280 UHA/mL, el virus concentrado (2 mL) mostró un título de 40,960 UHA/mL (64% de recuperación) y el virus purificado (4 mL) presentó un título de 5.120 UHA/mL (16% de recuperación) (Tab. 3).

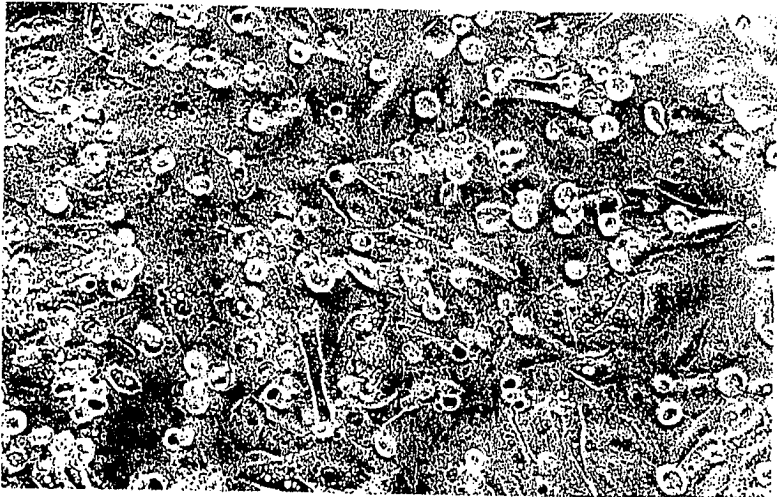


FIGURA 11. EFECTO CITOPATICO EN CELULAS PK-15. Cultivo de células PK-15 (riñón de cerdo) infectadas con virus LPM 1000 UFS/ 10^5 cels. En esta línea celular el virus no produce sincicios bien definidos, por el contrario el efecto citopático consiste en vacuolación y desprendimiento celular, seguidas por lisis del monoestrato.

Compárese esta imagen con la de la figura 6, obtenida con la misma dosis y volumen celular pero con células Vero, en nuestro laboratorio.



FIG. 12. PERFIL ELECTROFORETICO DEL VIRUS LPM. Los sobrenadantes de células PK-15 infectadas con virus LPM fueron colectados, clarificados y precipitados con PEG. El virus fué purificado por centrifugación en gradientes de sacarosa y las fracciones fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras (SDS-PAGE, Laemmli 1970). Se utilizó acrilamida al 10% y los geles se tiñeron con nitrato de plata. 1. Sobrenadante precipitado con peg. 2. fracción 18 (aprox 35% sacarosa) del primer gradiente. 2. Virus LPM obtenido después de la segunda centrifugación (ver material y métodos).

Tabla 3a. Recuperación de la actividad hemaglutinante durante la concentración y la purificación del virus LPM.

	HA	UHA/mL	UHA/vol total	Actividad recuperada
Sobrenadante	32	1,280	128,000/100 mL	
Precipitado	2,048	40,960	81,920/2 mL	64%
Purificado	128	5,120	20,480/4 mL	16%

Tabla 3b. Recuperación de la actividad hemaglutinante durante la concentración y la purificación de la proteína HN.

	HA	UHA/mL	UHA/vol total	Actividad recuperada
Sobrenadante	32	1,280	32,000/25 mL	
Precipitado	256	10,240	25,600/2.5 mL	80%
Purificado	64	2,560	10,240/4 mL	32%

Ensayos de Hemaglutinación (HA).

Hemaglutinación de eritrocitos de diferentes especies animales. La actividad del virus LPM se identificó en ensayos de HA con eritrocitos de diversas especies animales, de acuerdo a la técnica de dilución seriada. El título de HA se expresó como el inverso de la dilución más alta del virus en la que se observó aglutinación completa de los eritrocitos. El virus LPM aglutinó eritrocitos de diversas especies incluyendo humano tipo A1, A2, B y O, de cerdo, carnero, rata, conejo, cobayo y pollo. Los títulos de HA quedaron comprendidos entre 8 (cobayo) y 64 (conejo, pollo y humano A2). Los diferentes títulos de HA obtenidos no tuvieron una relación directa con el derivado de ácido neuramínico (ácido siálico) que presenta cada tipo de eritrocitos (Tabla 4).

Hemaglutinación de eritrocitos tratados con enzimas. La HA también se realizó con eritrocitos tratados con las enzimas neuraminidasa, tripsina o con tripsina seguida por neuraminidasa. Cuando los eritrocitos fueron tratados con neuraminidasa la actividad hemaglutinante se abolió en algunos casos, p.e. de 64 a 0 UHA en eritrocitos humanos A2 y en otros casos se redujo notablemente, p.e. de 32 a 4 UHA en eritrocitos de carnero y humanos A1. Sin embargo, cuando las células se trataron con tripsina hubo un ligero incremento en la actividad aglutinante del virus, de 32 a 64 UHA en eritrocitos de carnero y humanos A1 y de 16 a 32 UHA en eritrocitos humanos tipo B; no obstante, cuando las células tratadas con

Tabla 4 ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DEL PARAMIXOVIRUS LPM

Eritrocitos	Grupo Acetilo Principal ¹	título HA ²
Humano A1	N	32
Humano A2	N	64
Humano B	N	16
Humano O	N	16
Cerdo	N ³	32
Carnero	N	32
Rata (Wistar)	O	32
Conejo	O	64
Cobayo	O	8
Polio	N	64

1. Tomado de Schauer (1982). 2. El título es reportado como el inverso de la última dilución con actividad HA. 3. Los eritrocitos de cerdo contienen ácido N-glicolneuramínico.

tripsina fueron además tratadas con neuraminidasa, la actividad hemaglutinante desapareció en todos los casos (Tabla 5).

Especificidad por oligosacáridos del virus LPM. Con el fin de determinar la especificidad de reconocimiento del virus LPM, se realizaron ensayos de inhibición de la actividad aglutinante utilizando azúcares, glicósidos, glicoproteínas, glicopéptidos y glicolípidos. Para esto, 4 UHA del virus fueron incubadas con diluciones seriadas de cada estructura, antes de realizar la aglutinación de eritrocitos humanos tipo A2. Los resultados se expresan como la concentración molar de cada estructura capaz de inhibir la actividad hemaglutinante viral. De todos los compuestos estudiados, la actividad viral fué inhibida sólo con estructuras que contienen ácido siálico tales como ácido N-acetilneuramínico (NeuAc), ácido N-glicolilneuramínico (NeuGc) y los anómeros α del ácido siálico, ácido colomínico (poli NeuAc(α 2.8)NeuAc) y el glicósido α -metilneuramínico. Las estructuras sialil(α 2,3)lactosaminicas: NeuAc(α 2,3)Gal(β 1,4)GlcNAc y NeuAc(α 2,3)Gal(β 1,3)GlcNAc inhibieron cuatro veces más la HA que el ácido neuramínico libre. La actividad viral no fué inhibida con sialil(α 2,6)lactosa (NeuAc(α 2,6)Gal(β 1,4)-GlcNAc) ni con el glicósido β -metilneuramínico (Tabla 6). Entre los carbohidratos que no inhibieron la actividad viral, tenemos monosacáridos, disacáridos y polisacáridos sulfatados (Tabla 7).

Tabla 5. ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DEL VIRUS
LPM EN ERITROCITOS TRATADOS CON ENZIMAS

<u>Eritrocitos</u>	<u>NT</u>	<u>NANasa</u>	<u>TRIP</u>	<u>T + N</u>
Humano A1	32	4	64	4
Humano A2	64	NA	64	NA
Humano B	16	2	32	NA
Humano O	16	NA	16	NA
Carnero	32	4	64	NA

El paquete de eritrocitos fué tratado con 0.1 U de Neuraminidasa de *V. cholerae* (NANasa) o con 0.1 mg de Tripsina (TRIP). Los eritrocitos tratados con tripsina fueron además tratados con Neuraminidasa (T+N).

NT Eritrocitos No Tratados.

NA No Aglutinaron.

T-6 Efecto de oligosacáridos sobre la actividad hemaglutinante del paramixovirus porcino LPM

Compuesto	Conc. μM ¹	F.I. ²
ac. <u>N</u> -acetilneuramínico	120	1
ac. <u>N</u> -glicolilneuramínico	120	1
glicósido α -metilneuramínico	120	1
glicósido β -metilneuramínico	NI	-
ac. colomínico *	120	1
NeuAc(α 2,3)Gal(β 1,4)GlcNAc **	30	4
NeuAc(α 2,6)Gal(β 1,4)GlcNAc **	NI	-
NeuAc(α 2,3)Gal(β 1,3)GlcNAc **	30	4
Gal(β 1,4)GlcNAc	NI	-

1. Concentración mínima para inhibir 4 UHA del virus LPM en ensayos de HA con eritrocitos humanos A2. NI no inhibidor a 100 mM para azúcares simples y 200 μM para glicósidos. 2. Factor de inhibición obtenido en relación a la concentración de NeuAc. * ácido colomínico de E.coli (Poli NeuAc(2,8)NeuAc) su peso molecular es desconocido, su valor corresponde a $\mu\text{g/mL}$. ** Las estructuras sialilactosamínicas, contienen unidades disacarídicas de tipo 1 (β 1,3) o de tipo 2 (β 1,4),

Tabla 7. CARBOHIDRATOS NO INHIBIDORES DE LA
HEMAGLUTINACION INDUCIDA POR EL VIRUS LPM.

D-glucosa
N-acetil-D-glucosamina
D-galactosa
N-acetil-D-galactosamina
D-manosa
metil-D-manosa
L-fucosa
D-xilosa
d(-)arabinosa
trehalosa
sacarosa
lactosa
lacto-N-tetraosa
heparán-sulfato
dextrán-sulfato
condroitín-sulfato

4 UHA del virus LPM fueron incubadas con diluciones de los diversos azúcares, 1 h 4°C, después se agregaron los eritrocitos y se determinó la hemaglutinación o su inhibición después de 1 h de incubación. Los azúcares no inhibieron a una concentración 100 mM y los glicósidos a 200 µM.

Las glicoproteínas con actividad inhibidora incluyeron a la glicoproteína ácida α -1 humana (orosomucoide), a la IgA sérica humana y a la SGP II de rata. El tratamiento de estas glicoproteínas con neuraminidasa eliminó completamente su actividad inhibidora (Tabla 8). Algunas de las estructuras que no inhibieron la actividad viral contienen moléculas laterales de ácido siálico, p.e. mucina submaxilar bovina. Las cadenas laterales de oligosacáridos que constituyen cada una de las glicoproteínas utilizadas en este estudio son mostradas en la figura 13.

Purificación de la hemaglutinina viral. El virus contenido en 25 mL de sobrenadante de células PK-15 infectadas (1,280 UHA/mL) fué concentrado y resuspendido en 2.5 mL de PBS (10,240 UHA/mL, 80% de recuperación). Posteriormente, el virus fué sometido a choque térmico y su hemaglutinina (proteína HN) fué separada en gradiente de sacarosa. En las fracciones 16 a 19 del gradiente (concentración aproximada de sacarosa del 30%), se obtuvo una banda que presentó una actividad hemaglutinante de 2560 UHA/mL (recuperación del 32% de la actividad total) con eritrocitos de carnero (Fig. 14).

Especificidad por oligosacáridos de la proteína HN. Para determinar si la especificidad de reconocimiento de la proteína HN era la misma que la del virus LPM completo, los ensayos de inhibición de la hemaglutinación se realizaron con los mismos compuestos utilizados para inhibir la actividad viral. Para esto, 4 UHA de la proteína HN fueron incubadas con diluciones seriadas de cada

T-8 EFECTO DE GLICOPROTEINAS SOBRE LA ACTIVIDAD
HEMAGLUTINANTE DEL PARAMIXOVIRUS PORCINO LPM.

Compuesto	Conc. μM ¹	I. F. ²
Glicoproteína α -1 ácida humana	0.1	1200
Glicoproteína α -1 ácida humana desializada	NI	-
Inmunoglobulina A sérica humana	0.025	4800
Inmunoglobulina A sérica humana desializada	NI	-
Inmunoglobulina G sérica humana	NI	-
Inmunoglobulina M sérica humana	NI	-
Protamina	NI	-
Albúmina sérica bovina	NI	-
Mucina submaxilar bovina	NI	-
Mucina submaxilar ovina	NI	-
Mucina submaxilar ovina desializada	NI	-
Fetúna bovina	NI	-
Fetúna bovina desializada	NI	-
Transferrina humana	NI	-
Sialoglicoproteína I de rata	NI	-
Sialoglicoproteína II de rata	250	0.5
Sialoglicoproteína III de rata	NI	-
Glicopéptidos de eritrocito de rata	NI	-
Glicopéptidos de eritrocito humanos	NI	-
Glicopéptidos de mucina submaxilar bovina	NI	-
Mezcla de gangliósidos *	NI	-

1. Concentración mínima para inhibir 4 UHA del virus LPM en ensayos de HA con eritrocitos humanos A2. NI no inhibidor a 200 μM para glicoproteínas y glicopéptidos. 2. Factor de inhibición obtenido en relación a la concentración de NeuAc (Tabla 6)

* La mezcla de gangliósidos contenía 21% de Gm1, 40% de Gd1a, 16% de Gds y 19% de Gts.

*

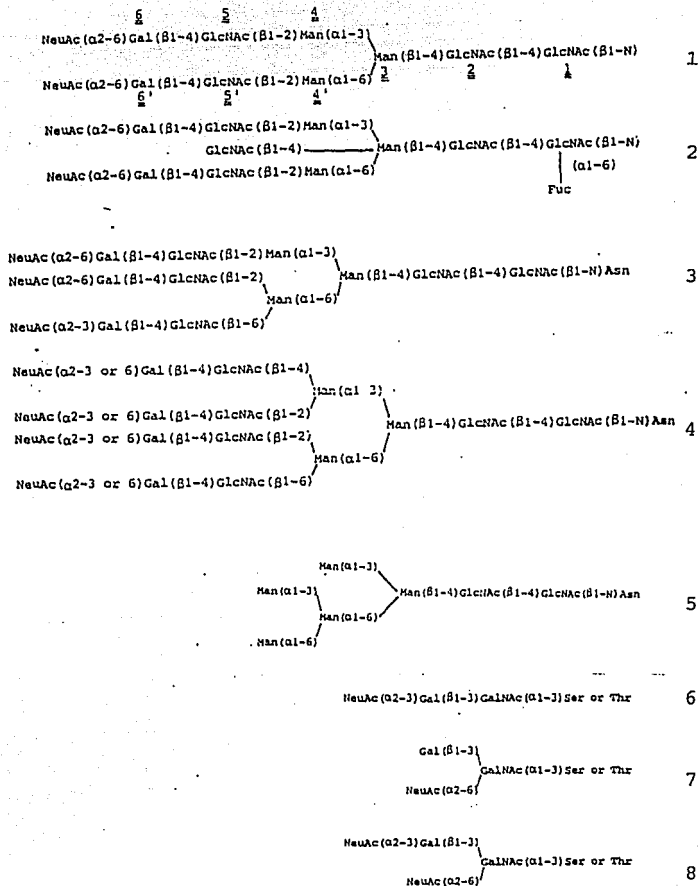
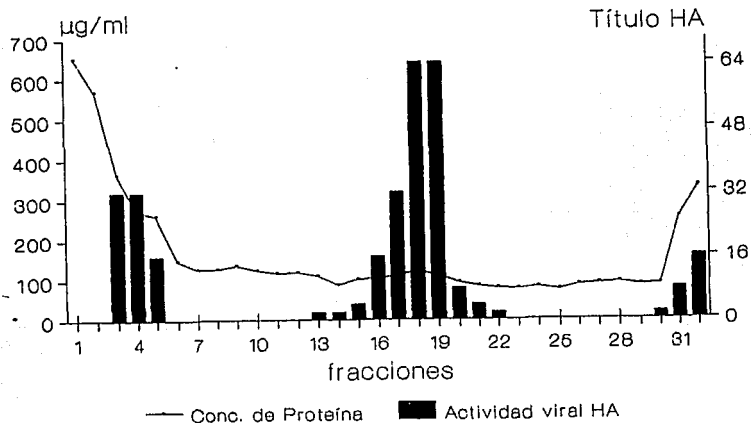


FIG. 13. ESTRUCTURA DE LOS OLIGOSACARIDOS PRESENTES EN ALGUNAS DE LAS GLICOPROTEINAS UTILIZADAS EN ESTE ESTUDIO.

Los esquemas representan la secuencia de azúcares que componen los oligosacáridos laterales de las siguientes glicoproteínas: 1. transferrina sérica humana, 2. IgG humana, 3. transferrina sérica humana, 4. glicoproteína ácida α -1 sérica humana, 5. IgM humana, 6. glicoforina humana, fetuina e IgA sérica humana, 7. mucinas submaxilares, 8. glicoforina humana y fetuina. Tomado de Montreuil 1984'. Glc, D-glucosa; Gal, D-galactosa; Man, manosa, Fuc, L-fucosa; GlcNAc, N-acetilglucosamina; GalNAc, N-acetilgalactosamina; NeuAc, ácido N-acetilneuramínico.

Fig. 14 PURIFICACION DE LA PROTEINA HN DEL VIRUS LPM EN GRADIENTE DE SACAROSA.



Una muestra de sobrenadante (Sn) de células PK-15 infectadas con virus LPM, fué clarificada a 3,200 rpm 20 min, el virus del Sn fué precipitado con PEG 6000 4 h a 4°C y después de centrifugarlo 20 min a 3,200 rpm, el botón formado fué lisado por choque térmico y después fué centrifugado en gradiente discontinuo de sacarosa (25% y 50%) a 100,000xg durante 4 h a 4°C. A cada fracción se le determinó actividad hemaglutinante, con eritrocitos de carnero (HA) y concentración de proteína (Bradford) y posteriormente se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida (7.5%). En las fracciones 3-5 quedaron los restos del virus, en las fracciones 16-19 quedó la proteína HN y en el fondo quedó una mezcla de proteínas, virus y PEG.

estructura, antes de realizar la aglutinación de eritrocitos humanos tipo A2. En forma similar a lo observado con el virus completo, la actividad de la proteína HN fué inhibida sólo con estructuras que contenían ácido siálico y los anómeros α del ácido siálico, tales como NeuAc, NeuGc, poli NeuAc(α 2,8)NeuAc, glicósido α -metilneuramínico, sialil(α 2,3)lactosa y con las glicoproteínas IgA, orosomucoide y SGP II de rata (Tabla 9). La actividad de la proteína HN no fué inhibida con anómeros β del ácido siálico, sialil(α 2,6)lactosa, glicoproteínas desializadas IgA y orosomucoide, ni con los demás compuestos que no inhibieron la actividad viral (Tabla 7 y 8).

Caracterización físico-química de la proteína HN.

Efecto de la temperatura de incubación sobre la actividad de la proteína HN. Para determinar las condiciones óptimas para la actividad de la proteína HN, la hemaglutinación se realizó a diferentes temperaturas. Como se observa en la tabla 10b, la proteína HN aglutinó los eritrocitos a diferentes temperaturas de incubación, sin observarse diferencias en el título. A 4° y 7°C la HA se mantuvo presente hasta 18 h después de iniciado el experimento. A temperatura ambiente (23°C) se observó que el proceso de aglutinación inducido por la proteína HN se revierte; a las 3 h inició el proceso de separación y finalizó a las 5 h 30 min. A 37°C la hemaglutinación se revierte rápidamente finalizando

T-9 INHIBICION DE LA ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DE LA PROTEINA HN DEL PARAMIXOVIRUS PORCINO LPM.

Compuesto	Conc. μM ¹	F.I. ²
ac. N-acetilneuramínico	60	1
ac. N-glicolilneuramínico	60	1
glicósido α -metilneuramínico	60	1
glicósido β -metilneuramínico	NI	-
poli NeuAc(2,8)NeuAc *	120	0.5
NeuAc(α 2,3)Gal(β 1,4)GlcNAc **	15	4
NeuAc(α 2,6)Gal(β 1,4)GlcNAc **	NI	-
NeuAc(α 2,3)Gal(β 1,3)GlcNAc **	15	4
Gal(β 1,4)GlcNAc	NI	-
Glicoproteína α -1 ácida humana	0.24	250
Glicoproteína α -1 ácida humana desializada	NI	-
Inmunoglobulina A sérica humana	0.015	4000
Inmunoglobulina A sérica humana desializada	NI	-
Inmunoglobulina G sérica humana	NI	-
Inmunoglobulina M sérica humana	NI	-
Sialoglicoproteína II de rata	100	0.6

1. Concentración mínima para inhibir 4 UHA de la proteína HN del virus LPM en ensayos de HA con eritrocitos humanos A2. NI. no inhibidor a 100 mM para azúcares y 200 μM para glicósidos y glicoproteínas 2. Factor de inhibición obtenido en relación a la concentración de NeuAc. * ácido colomínico su valor corresponde a $\mu\text{g}/\text{mL}$. ** Estructuras sialilactosamínicas.

Tabla 10a. ACTIVIDAD DEL VIRUS LPM A DIFERENTES TEMPERATURAS DE INCUBACION.

Temperatura °C	Título HA	Tiempo de elución	Tiempo de Hemólisis
4	32	- *	- *
7	32	- *	- *
23	32	5:30 h	8 h
37	-- **	--	< 1 h

Diluciones seriadas del virus LPM fueron incubadas a diferentes temperaturas con eritrocitos de carnero. 1. Corresponde al tiempo que tardan los eritrocitos en separarse después de ser aglutinados. * No se presentó elución ni hemólisis de los eritrocitos, aunque las placas se conservaron durante 18 h. ** No se observó hemaglutinación; la hemólisis se presentó antes de concluida una hora de incubación.

Tabla 10b. ACTIVIDAD DE LA PROTEINA HN A DIFERENTES TEMPERATURAS DE INCUBACION.

Temperatura °C	Título HA	Tiempo de elución
4	32	- *
7	32	- *
23	32	5:30 h
37	-- **	--

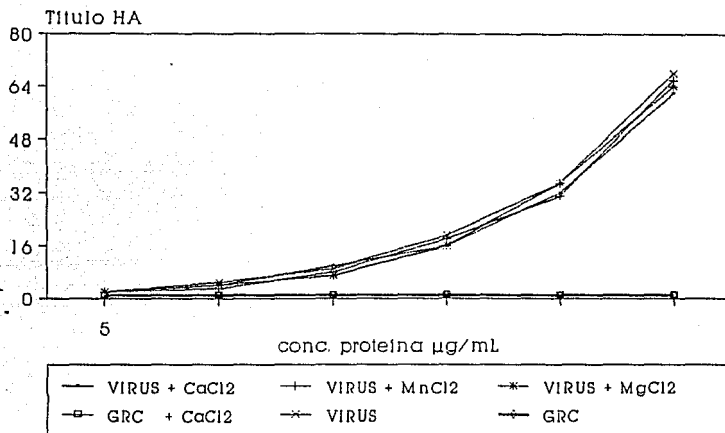
Diluciones seriadas de la proteína HN del virus LPM fueron incubadas a diferentes temperaturas con eritrocitos de carnero. 1. Corresponde al tiempo que tardan los eritrocitos en separarse después de ser aglutinados. * No se presentó elución, aunque las placas se conservaron durante 18 h. ** No se observó hemaglutinación una hora después de iniciada la incubación.

1 h después de iniciada la incubación. En el virus LPM completo también se observa este proceso de elución de los eritrocitos, presentándose además hemólisis cuando los ensayos se realizan a temperatura ambiente o a 37°C (Tabla 10a).

Hemaglutinación en presencia de cationes divalentes. Para determinar si la proteína HN requiere iones para estabilizar su unión a las células se realizaron las pruebas de HA en presencia de soluciones de CaCl_2 , MnCl_2 y MgCl_2 . A las concentraciones utilizadas, 0.2 a 0.001 M, ninguna de estas soluciones alteró (aumentando o disminuyendo) el proceso de HA; tampoco alteraron la formación del botón de sedimentación de los eritrocitos sin la proteína HN en los ensayos controles (Fig. 15).

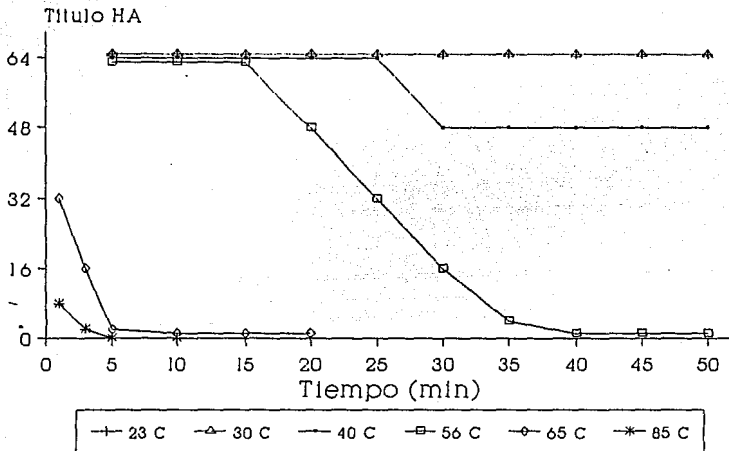
Estabilidad térmica de la proteína HN. Para identificar el efecto de la temperatura en la actividad de la proteína, varias muestras de la proteína HN fueron incubadas a diversas temperaturas antes de realizar la hemaglutinación. Como se muestra en la figura 16, la proteína HN mantiene constante su actividad a 15°, 23° y 30°C. Un ligero descenso en su actividad se observó después de 20 min a 40° C. Sin embargo, la proteína HN perdió completamente su actividad al incubarla 35 min a 56°C, 10 min a 65°C y 2 min a 85°C.

Fig. 15. ACTIVIDAD DE LA PROTEINA HN EN PRESENCIA DE CATIONES DIVALENTES



Los ensayos de hemaglutinación se realizaron en presencia de soluciones de metales catiónicos. Diluciones seriadas de la proteína HN fueron incubadas con eritrocitos de carnero (GRC) en presencia de concentraciones constantes de cada solución. En la gráfica se presenta un experimento representativo, utilizando una concentración 0.02M de cada catión. Ensayos semejantes se realizaron con concentraciones tan bajas como 0.0001M. Los resultados fueron semejantes en todos los casos.

Fig. 16. ESTABILIDAD TERMICA DE LA PROTEINA HN DEL PARAMIXOVIRUS LPM.



Muestras semejantes de la proteína HN del virus LPM fueron incubadas a diferentes temperaturas. Se tomaron muestras de los viales a temperaturas menores a 65° cada 5 min y cada min de los viales a 65° y 85°C. La actividad se determinó por ensayos de hemaglutinación con eritrocitos de carnero.

Peso molecular de la proteína HN. El peso molecular relativo de la proteína HN fué determinado por electroforesis en geles de poli-acrilamida, la comparación con proteínas de peso molecular conocido permitió definir que la proteína HN tiene un peso molecular aproximado de 65 kDa (Fig. 17). Como se puede apreciar la purificación por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa nos permite obtener una proteína homogénea que presenta una banda en el ensayo de electroforesis.

Ensayos de infección.

Formación de sincicios en células Vero. Los ensayos de infección se realizaron en las células Vero, de riñón de mono verde africano. Se seleccionó esta línea celular porque el efecto citopático inducido por el virus LPM consiste exclusivamente en la formación de sincicios. Las células Vero infectadas fueron teñidas con los colorantes de May-Grunwald y Giemsa, esta tinción permitió apreciar claramente la fusión de los citoplasmas celulares. La figura 18 muestra la apariencia clásica de un cultivo de células Vero (10^5 cels/mL) infectado con virus LPM (1000 UFS/mL).

Formación de sincicios en células Vero tratadas con enzimas.

También se probó la capacidad del virus LPM para infectar células Vero tratadas con las enzimas neuraminidasa y tripsina.

La eliminación de residuos de ácido siálico de las células Vero mediante tratamiento con neuraminidasa redujo marcadamente (entre

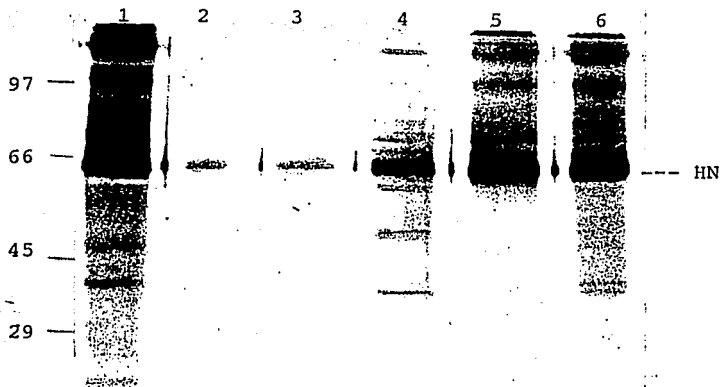


FIG. 17. PERFIL ELECTROFORETICO DE LA PROTEINA HN DEL VIRUS LPM. El sobrenadante de células PK-15 fué clarificado y precipitado con PEG, el virus precipitado fué lisado por choque térmico y posteriormente fué separado por centrifugación en gradiente de sacarosa (25 y 50%). 1. fracción 4, virus completo; 2 y 3 fracciones 18 y 19; 4. virus LPM purificado. 5 y 6 fracciones del fondo del gradiente (ver fig. 14). Los pesos moleculares de la izquierda corresponden a fosforilasa b, 97; albúmina bovina, 66; albúmina de huevo, 45 y anhidrasa carbónica, 29 KDa. La electroforesis se realizó en geles al 7.5% de poliacrilamida, los cuales fueron teñidos con nitrato de plata.

FORMACION DE SINCICIOS EN CELULAS VERO INFECTADAS CON EL PARAMIXOVIRUS PORCINO LPM



Fig 18 a. 10^6 células Vero fueron infectadas con 1000 UFS/mL del virus LPM. Los cultivos infectados fueron fijados, en el 3er día p.i., y se tiñeron con los colorantes de May-Grünwald y Giemsa. (Aumento 100x)
b. Células Vero no infectadas. (Aumento 150x)

FORMACION DE SINCICIOS EN CELULAS VERO INFECTADAS CON EL PARAMIXOVIRUS PORCINO LPM



Fig 18 a. 10^6 células Vero fueron infectadas con 1000 UFS/mL del virus LPM. Los cultivos infectados fueron fijados, en el 3er día p.i., y se tiñeron con los colorantes de May-Grünwald y Giemsa. (Aumento 100x)
b. Células Vero no infectadas. (Aumento 150x)

30 y 45%) la cantidad de sincicios inducidos por el virus. Por el contrario, el tratamiento con tripsina incrementó notablemente (hasta 55%) el número de sincicios formados después de la infección (Tabla 11).

Inhibición de la formación de sincicios con azúcares. Los ensayos de competencia en células Vero se realizaron incubando al virus LPM, antes de infectar las células, con diversos azúcares. De los azúcares estudiados sólo sialil(α 2,3)lactosa inhibió completamente la formación de sincicios desde una concentración 25 μ M.

La preincubación del virus con ácido N-acetilneuramínico también produjo una reducción significativa en la formación de sincicios (Fig. 19). Este fenómeno no se presentó con los demás azúcares a las concentraciones utilizadas, 0.2M. En la figura 20, se puede observar el efecto inhibitor sobre la formación de sincicios causado por la preincubación del virus LPM con sialil(α 2,3)lactosa.

Infección de células Vero tratadas con antibióticos inhibidores de la glicosilación. Para determinar que la expresión de azúcares era importante en el proceso de infección, sometimos a las células Vero a tratamiento con antibióticos inhibidores de la glicosilación. Se utilizaron los antibióticos tunicamicina, desoxinojirimicina y desoximanojirimicina. La figura 21, muestra esquemáticamente el proceso de glicosilación y la estrategia seguida para inhibirlo. Las células Vero fueron tratadas con cada antibiótico 8 h antes de ser infectadas. El tratamiento de las células con tunicamicina

Tabla 11. FORMACION DE SINCICIOS POR EL VIRUS LPM EN CELULAS VERO TRATADAS CON ENZIMAS

Neuraminidasa			Tripsina		
Concentración U/ml	Sincicios por pozo ¹	Infección (%) ²	Concentración µg/ml	Sincicios por pozo	Infección (%)
0.2	56 (SD 0.9)	55	640	150 (SD 1.3)	155
0.1	65 (SD 1.2)	64	160	135 (SD 1.3)	140
0.05	69 (SD 0.0)	68	40	111 (SD 1.6)	115
0.025	69 (SD 1.4)	68	10	99 (SD 0.0)	102
0.012	77 (SD 1.4)	76			
0.006	98 (SD 1.9)	96			
Control ³	102 (SD 1.2)	100	Control	97 (SD 0.8)	100

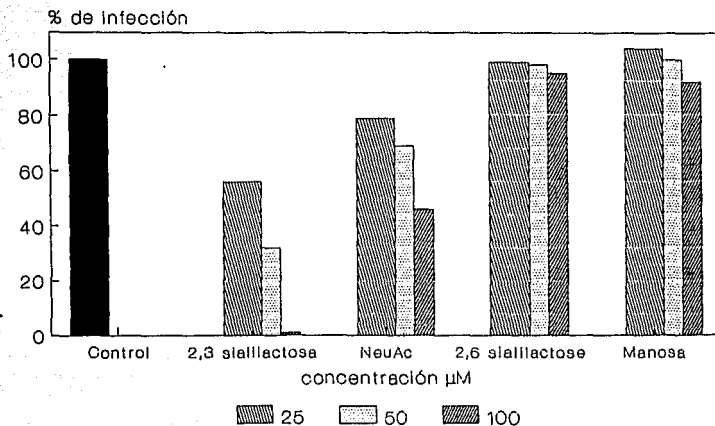
1. Total de sincicios en 10 campos visuales por pozo.

Un sincicio = 10 o más núcleos por citoplasma.

2. Determinado en relación al control, basado sólo en la formación de sincicios.

3. Células Vero infectadas con 100 unidades formadoras de sincicios por pozo.

Fig. 19 EFECTO DE AZUCARES EN LA INFECCION POR PARAMIXOVIRUS LPM



1000 UFS/mL del virus LPM fueron incubadas 1 h a 4°C, antes de agregar las células Vero (10^5 /mL). Los azúcares utilizados en estos ensayos fueron seleccionados de acuerdo con la posibilidad de que formaran parte de las superficies celulares, según Kornfeld y Kornfeld (1985). Otros azúcares sin actividad inhibidora fueron D-glucosa, D-galactosa, L-fucosa, N-acetil-D-glucosamina, N-acetil-D-galactosamina y lactosa.

EFFECTO DE SIALIL(α 2,3)LACTOSA EN LA INFECCION

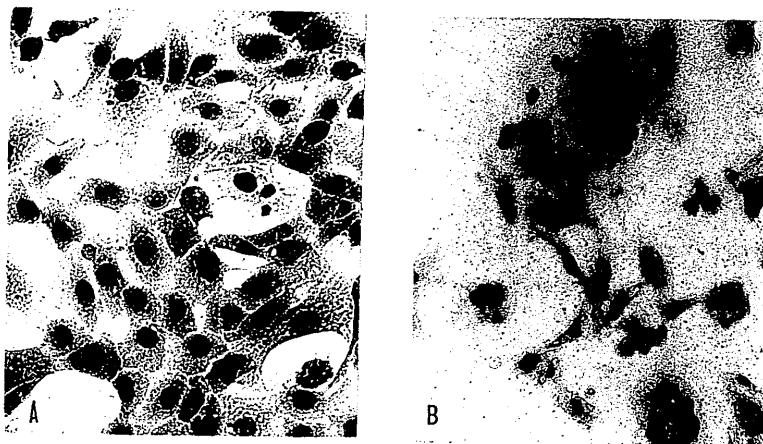


Fig 20. La preincubación del paramixovirus LPM con sialil(2,3)lactosa inhibió la actividad formadora de sincicios del virus. a. Células Vero infectadas con virus LPM preincubado con sialil(α 2,3)lactosa (100 μ M). b. Células Vero infectadas con virus LPM sin preincubar. (Aumento 300x)

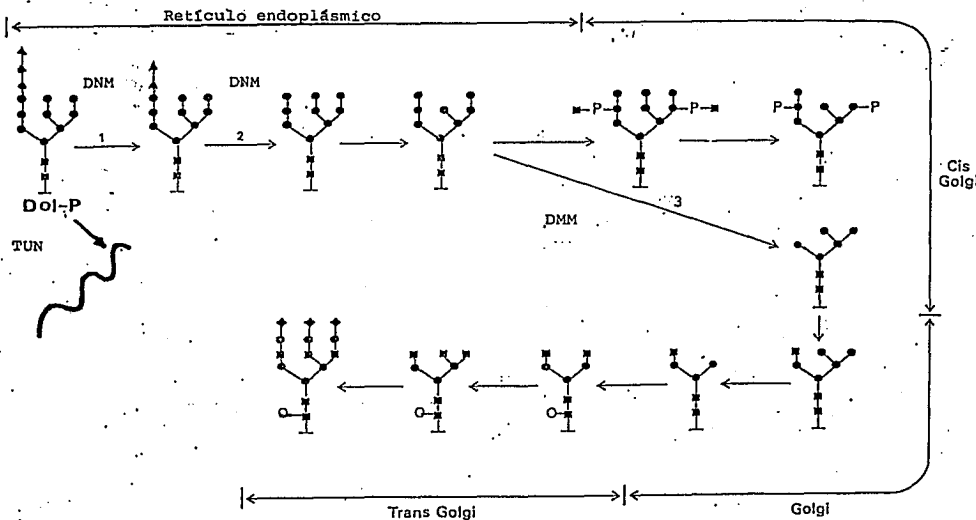
inhibió completamente la formación de sincicios, el tratamiento con desoxinojirimicina produjo una disminución significativa en la formación de sincicios, en cambio, el tratamiento con desoximanojirimicina no alteró la formación de sincicios (Fig. 22). Para determinar los cambios, en la expresión de azúcares de la superficie celular, inducidos por cada antibiótico se utilizaron lectinas conjugadas a compuestos fluorescentes (ver más adelante).

Ensayos de fluorescencia.

Lectinas utilizadas en los ensayos de fluorescencia. Para determinar la relación entre la expresión de oligosacáridos y la infección en células Vero normales, tratadas con enzimas y tratadas con antibióticos, se utilizaron lectinas conjugadas a fluoresceína. Las lectinas son proteínas que tienen la capacidad de reconocer y unirse con moléculas específicas de azúcares. La especificidad por azúcares de las lectinas utilizadas en este estudio es la siguiente: *Arachis hypogaea* (PNA), Gal y GalNAc; *Maackia amurensis* (MAA), NeuAca_{2,3}Gal; *Sambucus nigra* (SNA), NeuAca_{2,6}Gal y *Canavalis ensiformis* (Con A), manosa (Tabla 12).

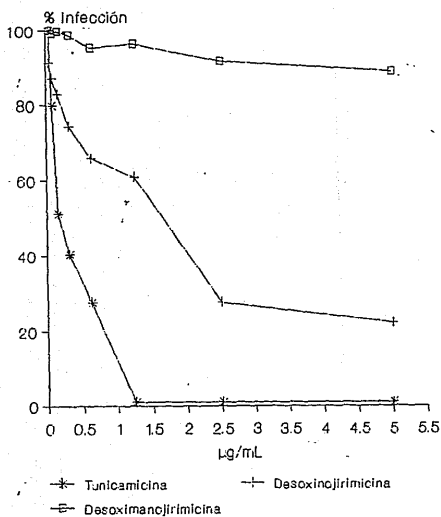
Fluorescencia en células Vero tratadas con antibióticos inhibidores de la glicosilación. Para confirmar que el tratamiento con antibióticos inhibidores de la glicosilación producía cambios en la expresión de azúcares de la superficie celular, se realizaron ensayos de fluorescencia directa con lectinas. En la tabla 13 se

Fig. 21. ESTRATEGIA SEGUIDA PARA INHIBIR LA GLICOSILACION DE CELULAS VERO.



Los antibióticos utilizados inhiben las siguientes fases de la vía de glicosilación. Tunamicina (TUN) inhibe al transportador dolicol pirofosfato (Dol-P), el cual une las moléculas de oligosacáridos a la cadena polipeptídica recién sintetizada; La desoxinójirimicina (DNM) actúa sobre las enzimas glucosidasas I y II del retículo endoplásmico y la desoximanojirimicina bloquea la acción de la enzima manosidasa I del aparato de golgi. 1. glucosídasa I. 2. glucosidasa II. 3. Manosidasa I. Los cuadros representan N-acetilglucosaminas; los círculos, manosas; los triángulos, glucosas; los rombos, ácidos siálicos y los círculos claros, fucosas.

Fig. 22 EFECTO DE INHIBIDORES DE LA GLICOSILACION EN LA INFECCION VIRAL



10^5 células Vero en suspensión fueron cultivadas en presencia de diluciones de los antibióticos inhibidores de la glicosilación tunicamicina, desoxinojirimicina y desoximanojirimicina, en concentraciones iniciales de 50 $\mu\text{g/mL}$. Después de 8 h de cultivo a 37°C , las células fueron infectadas con 100 UFS por pozo del virus LPM. La determinación de infección se realizó en base al número de sincicios producidos después de 72 hrs. El porcentaje de infección fué calculado en relación al número de sincicios obtenidos en los pozos testigos.

Tabla 12. LECTINAS UTILIZADAS EN ESTE ESTUDIO Y SU ESPECIFICIDAD POR AZUCARES

LECTINA	ESPECIFICIDAD
Maackia amurensis (MAA)	NeuAc α 2,3Gal
Arachis hypogaea (PNA)	Gal y GalNac
Sambucus nigra (SNA)	NeuAc α 2,6Gal
Canavalia ensiformis (CON A)	Manosa

Tabla 13. PATRON DE UNION DE LECTINAS A CELULAS TRATADAS CON ANTIBIOTICOS INHIBIDORES DE LA GLICOSILACION

TRATAMIENTO	MAA	SNA	PNA	CON A
TUN (0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	-	-	-	-
DNM (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	+	+	+	++
DMM (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	-	-	-	+++
Vero normales	+++	+++	+	+

10^5 células Vero por mL fueron cultivadas 48 h sobre cubreobjetos en cajas de Petri, después fueron tratadas con los diferentes antibióticos y 8 h más tarde fueron procesadas para realizar la fluorescencia directa con lectinas. Las cruces indican la intensidad de la fluorescencia.

presentan los patrones de unión de cada lectina a células tratadas con antibióticos. Como se puede observar, las células Vero no tratadas expresan constitutivamente NeuAc(α 2,3)Gal, NeuAc(2,6)Gal, Gal/GalNAc y manosa, ya que fueron reconocidas por las lectinas MAA, PNA y CON A, respectivamente. El tratamiento de las células con tunicamicina inhibió el reconocimiento por todas las lectinas utilizadas. Por su parte, la desoxinojirimicina inhibió parcialmente la expresión de azúcares reconocidos por las lectinas del estudio.

Fluorescencia en células Vero tratadas con enzimas. Las lectinas conjugadas a compuestos fluorescentes se utilizaron también para determinar si se producían cambios en el reconocimiento de azúcares en células tratadas con las enzimas neuraminidasa y tripsina. el tratamiento con neuraminidasa disminuyó el reconocimiento por la lectina MAA y aumentó la unión de PNA, sin provocar cambios en el reconocimiento por Con A. Por su parte el tratamiento con tripsina incrementó notablemente el reconocimiento por la lectina MAA y disminuyó ligeramente el de Con A y PNA (Tabla 14). Los cambios en el reconocimiento de MAA correlacionaron adecuadamente con los cambios presentados en la infección después del tratamiento con las enzimas (Fig. 23).

Tabla 14. UNION DE LECTINAS A CELULAS VERO TRATADAS CON ENZIMAS.

TRATAMIENTO	MAA	SNA	PNA	LCA	Con A	ALA	WGA
Vero normal	++	+	+	-	+	-	-
Tripsina	++++	++	-	-	+-	-	-
Neuraminidasa	+-	+-	++	-	+	-	-
Tripsina + Neuraminidasa	+-	+-	+++	-	+-	-	-

10⁵ Células Vero por mL fueron cultivadas 48 h sobre cubreobjetos en cajas de Petri, después fueron tratadas 30 min a 37°C con 0.1 U/mL de neuraminidasa, 0.1 mg/mL de tripsina o por tratamiento consecutivo de tripsina y neuraminidasa. Las células fueron lavadas y se incubaron con las diversas lectinas conjugadas a fluorocromos. En este ensayo también se utilizaron las lectinas de *Lens culinaris* (LCA) que reconoce Man, Glc y GlcNAc; *Amaranthus leucocarpus* (ALA), GalNAc, NeuAc y *Triticus vulgaris* (WGA), GlcNAc, NeuAc.

Fig. 23a. INFECCION POR VIRUS LPM EN CELULAS VERO TRATADAS CON NEURAMINIDASA

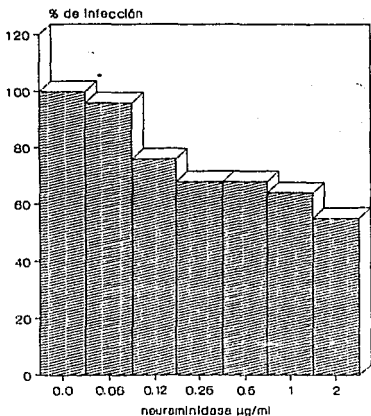
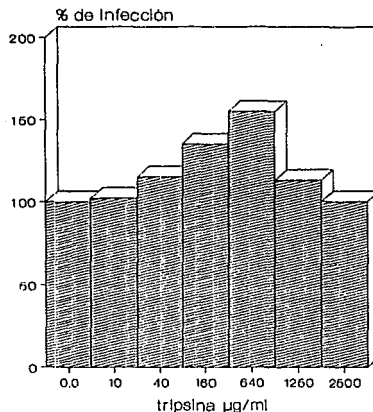


Fig. 23b INFECCION POR VIRUS LPM EN CELULAS VERO TRATADAS CON TRIPSINA



10^5 células Vero por mL fueron sembradas en placas de 96 pozos, 24 h después (antes de alcanzar la confluencia) las células fueron tratadas 30 min a 37°C , con diversas concentraciones de las enzimas neuraminidasa o tripsina. Las células fueron lavadas y después fueron infectadas con 100 UFS por pozo del virus LPM. La infección fué determinada de acuerdo al número de sincicios producidos. El porcentaje de infección está calculado en relación al testigo.

Fluorescencia directa en tejidos de cerdos neonatos. Para determinar la presencia de residuos NeuAc α 2,3Gal en tejidos porcinos, se obtuvieron cortes de tejido nervioso, respiratorio, digestivo y linfático de cerdos recién nacidos sanos. La expresión celular de azúcares se determinó con diversas lectinas conjugadas a fluoresceína. De los cortes estudiados, todos los de tejido nervioso y respiratorio reaccionaron fuertemente con la lectina MAA (que reconoce NeuAc α 2,3Gal) y débilmente con duodeno y bazo (Tabla 15). La interacción de la lectina MAA fué mayor con el epitelio de la mucosa bronquial, así como con la mayoría de la masa tisular de la corteza cerebral. También, la lectina MAA reaccionó fuertemente con células globulares en el tejido ocular. La lectina MAA no reaccionó con ningún componente del tejido en estómago y yeyuno de los cerdos estudiados, aunque mostró una reacción débil con algunas zonas del duodeno.

La lectina SNA reaccionó fuertemente con zonas restringidas de pulmón, duodeno y bazo. Por su parte, la lectina PNA marcó la mayor parte del tejido en estómago, duodeno y yeyuno y se observaron zonas de fluorescencia débil en cerebelo y pulmón, las cuales se incrementaron después del tratamiento con neuraminidasa. La lectina Con A se unió a sitios muy específicos de bulbo raquídeo y duodeno principalmente.

Tabla 15. PATRON DE UNION DE LECTINAS A TEJIDOS DE CERDOS NEONATOS

TEJIDO	MAA	SNA	PNA	CON A
SISTEMA NERVIOSO CENTRAL				
Corteza Cerebral	+++	-	-	-
Cerebelo	+++	+	+ *	-
Bulbo Raquídeo	++	-	-	+ *
Tálamo	++++	-	++	-
SISTEMA RESPIRATORIO				
Bronquio	++++	-	-	-
Pulmón	++	+++ *	+ *	-
SISTEMA DIGESTIVO				
Estómago	-	-	+++	-
Duodeno	+	+++ *	++	+ *
Yeyuno	-	-	+++	-
SISTEMA LINFATICO				
Bazo	+	+++ *	-	-
Timo				

Muestras de tejidos de cerdos neonatos, libres de la enfermedad del ojo azul. Los cortes de 5 µm de espesor se realizaron en criotomo con Tissue Tek OCT II y se conservaron en congelación. Los cortes fueron incubados 30 min a 37°C con las diferentes lectinas conjugadas a fluorocromos. Las cruces indican la intensidad de la fluorescencia. * indica que la fluorescencia se localizó a zonas limitadas del tejido.

Fluorescencia (+) debil (++) regular (+++) fuerte (*) focal

DISCUSION.

En el presente trabajo se planteó como objetivo determinar la naturaleza química del receptor celular del paramixovirus porcino LPM, virus identificado recientemente, que ha sido relacionado con la presentación de la enfermedad del ojo azul de los cerdos.

La inquietud por realizar este trabajo surgió por el conocimiento de varios datos, primero, los cerdos menores de 20 días de edad muestran una gran susceptibilidad a la enfermedad del ojo azul [Stephano et al 1981]. Segundo, las manifestaciones clínicas de la enfermedad parecen depender de la edad de los animales infectados, siendo basicamente de índole respiratorio y neurológico en cerdos neonatos y de tipo reproductivo en animales adultos [Stephano et al 1988]. Tercero, el cuadro clínico de la enfermedad sólo puede reproducirse experimentalmente en cerdos neonatos [Stephano et al. 1983]; en cerdos mayores a 30 días de edad la infección experimental no produce sintomatología apreciable [Stephano et al 1988, Hernández-Jáuregui observaciones no publicadas]. Dos interpretaciones se hicieron de estos hechos:

La primera fué que la infección natural o experimental tenía un control inmunológico adecuado en cerdos adultos y que este control no era efectivo, por inmadurez del sistema inmunitario, en el cerdo neonato. Sin embargo, cerdos de 45 días, sin trazas de anticuerpos contra el virus LPM, se mostraron refringentes a la infección ante una dosis de desafío con el virus LPM activo [Reyes-Leyva 1988]; el mismo virus produjo signología neurológica y la muerte de cerdos

neonatos [Hernández-Jáuregui et al. 1990].

La segunda interpretación de los datos anteriores fué que la susceptibilidad a la infección estaba determinada por la expresión, en cerdos neonatos, de moléculas que actuaban como receptores del virus LPM, moléculas que no eran expresadas, en igual grado, por los animales adultos. Las diferencias en las manifestaciones clínicas de la enfermedad relacionadas con la edad de los animales [Stephano et al. 1985], sugería la existencia de diferentes mecanismos de patogenicidad entre animales recién nacidos y adultos, apoyando la última hipótesis. Asimismo, el virus de la parotiditis humana tiene un comportamiento patológico parecido al del virus LPM, es decir, hay manifestaciones neurológicas en infantes y puede haber lesiones epididimotesticulares si la infección ocurre durante o después de la pubertad [Pomeroy y Jordan 1992]. Un control inmunológico de la parotiditis explicaría porque la susceptibilidad a la enfermedad es mayor en la infancia, pero no explica al presentarse la infección en individuos de mayor edad, por qué las alteraciones se presentan en órganos diferentes.

Otro dato, ha sido inquietante para nosotros, el hecho de que todos y cada uno de los paramixovirus tienen un rango de hospedero restringido y provocan infecciones graves en animales o humanos jóvenes [Fenner y White 1981, Kingsbury 1990]. Esto sugiere que existe una limitante para que cada virus reconozca a su hospedero natural, y otra, o la misma, que limite la infección a las etapas tempranas del desarrollo.

Presentadas estas inquietudes, dirigimos nuestro interés hacia el reconocimiento de las estructuras celulares que actúan como receptores para el paramixovirus porcino LPM en células y tejidos susceptibles.

La actividad viral se determinó mediante pruebas de hemaglutinación, en estos ensayos el virus LPM reaccionó con los eritrocitos de todas las especies estudiadas, incluyendo de mamíferos y aves, esto ha sido observado en trabajos anteriores [Correa et al 1985, Moreno-López et al. 1986, Stephano et al 1988], lo que indica que el virus reconoce una estructura ubicua a todos los eritrocitos. La reducción en el título de hemaglutinación observada al utilizar eritrocitos tratados con neuraminidasa nos indicó que el ácido siálico era importante en el proceso de reconocimiento. Este dato explica porque el virus ha aglutinado a todos los eritrocitos estudiados hasta el momento, ya que el ácido siálico es una molécula ampliamente distribuida en la naturaleza a todos los niveles de la escala evolutiva [Schauer 1982].

No obstante, no se observó una relación directa entre el título de hemaglutinación y el contenido de ácido O-acetil, N-acetil o N-glicolilneuramínico de cada tipo de eritrocitos (Tabla 3) [Schauer 1982]. Stephano et al. hicieron notar que el virus LPM también aglutinaba eritrocitos de caballo (los cuales tienen un alto contenido de ácido O-acetilneuramínico [Schauer 1982]) a diferencia del virus hemaglutinante de Japón (Sendai, P1-1) el cual en los

años 60's fué relacionado con manifestaciones de enfermedad neurológica en los cerdos [Stephano et al. 1988]. Esto sugiere indirectamente la existencia de diferencias en el reconocimiento del receptor específico entre el virus LPM y el virus Sendai.

Un paso importante fué determinar cual de los componentes virales era el responsable del reconocimiento del receptor celular, Para esto el virus LPM fué concentrado, sometido a choque térmico y la hemaglutinina fué separada por centrifugación en gradientes de sacarosa. Mediante este proceso logramos obtener semipurificada una proteína de aproximadamente 65 KDa la cual conservó la actividad hemaglutinante del virus. La observación de elución de los eritrocitos aglutinados por esta proteína a 23° y 37°C, puede ser ocasionada por la actividad neuraminidasa de la proteína que al romper el ácido siálico del receptor celular favorece la separación del virus y de los eritrocitos [Huang 1980]. Esta misma actividad fué observada en el virus completo (Tabla 10a). El virus también mostró actividad hemolítica, la cual no se presentó en los ensayos con la proteína HN. Esto indica que la actividad hemolítica, atribuida a la proteína de fusión [Kingsbury 1990], es independiente de la actividad neuraminidasa, aunque se ha propuesto la cooperación entre ambas proteínas para realizar la hemólisis [Xiaolei et al 1992].

Los datos de la actividad de la proteína aislada respaldan lo reportado por Sundqvist et al. en el sentido de la existencia de una glicoproteína (HN), en el virus LPM, con las dos actividades,

hemaglutinante y neuraminidasa. Aunque en ese trabajo [Sunqvist et al, 1990] y en otro anterior del mismo grupo [Moreno-López et al 1986] no se determinó experimentalmente que ambas actividades virales fueran realizadas por la misma molécula. En este sentido, nuestros resultados no son concluyentes, pero estamos desarrollando estrategias experimentales para determinar si la proteína de 65 KDa es o no responsable de la actividad neuraminidasa del virus.

Para determinar la especificidad de reconocimiento del virus LPM, se realizaron ensayos de inhibición de la hemaglutinación en los cuales se incubó al virus LPM o a la proteína HN con homólogos putativos de su receptor celular. De acuerdo a lo esperado, las estructuras que contenían ácido siálico inhibieron la actividad hemaglutinante del virus. Sin embargo y aún más importante fué que no todas las moléculas sialiladas lograron inhibir al virus. En este sentido, el virus LPM mostró una gran especificidad de reconocimiento ya que sólo los anómeros α del ácido siálico, fueron inhibidores. Aunado a esto, la actividad viral fué inhibida con sialil(α 2,3)lactosa pero no con sialil(α 2,6)lactosa, lo que refleja la importancia del tipo de enlace glicosídico en la interacción del virus con su receptor [Tardieu et al. 1982]. Estos últimos datos recuerdan la especificidad de la hemaglutinina del virus influenza, en la cual mutaciones en el sitio de unión al receptor son capaces de discriminar entre enlaces α 2,3 y α 2,6 neuraminicos y dan origen a variaciones en las cepas virales [Weis et al. 1988].

La actividad hemaglutinante también fue inhibida con las glicoproteínas SGP II de rata, orosomucoide e IgA humanas, estas últimas fueron los mejores inhibidores de la proteína HN y del virus completo; su actividad inhibidora puede ser reflejo de su contenido de oligosacáridos sialil(α 2,3)lactosaminicos [Montreuil 1984]. La glicoproteína orosomucoide muestra una actividad inhibidora mayor sobre el virus completo que sobre la proteína HN (tablas 7 y 9). Se ha reportado que el orosomucoide actúa como lectina reconociendo residuos de manosa en las proteínas de fusión de algunos paramixovirus, esta interacción parece favorecer la infección de células que no expresan el receptor sializado para las proteínas HN; en nuestro estudio, la actividad de lectina del orosomucoide sobre la glicoproteína de fusión podría incrementar inespecíficamente su actividad inhibidora sobre el virus LPM.

Otro dato de importancia fué que ninguno de los polisacáridos sulfatados inhibió la actividad hemaglutinante viral. Esto indica que la interacción de la hemaglutinina viral con su receptor no es dirigida por la fuerza iónica. Esto es respaldado por los resultados de los experimentos en presencia de cationes divalentes, en los cuales, ninguna de las soluciones utilizadas alteró el título de hemaglutinación. La participación de cationes en la estabilización de la conformación tridimensional de las hemaglutininas ha sido estudiada en otros virus [Tavakkol y Burness 1990]. En el caso del virus herpes simple se ha demostrado la gran afinidad de sus proteínas de envoltura por compuestos catiónicos

como el heparan-sulfato, al parecer, la atracción de cargas inducida por estas moléculas le permite al virus herpes estabilizar su unión a su receptor específico, el receptor de factores del crecimiento de fibroblastos [Licke et al. 1991].

Nuestros resultados en relación a la fuerza iónica, no descartan la posible participación de cargas negativas del grupo carboxilo del carbono 1 del ácido siálico en la conformación tridimensional de la hemaglutinina del virus LPM. Un punto controversial es que el ácido siálico se ha involucrado en la atracción de cationes hacia la membrana [Schauer 1982], por lo tanto queda la posibilidad de que la necesidad de cationes divalentes sea satisfecha a partir del propio eritrocito.

Un dato interesante es que se ha utilizado fetuina como sustrato para determinar la actividad neuraminidasa del virus LPM [Linné et al. 1992], sin embargo, esta glicoproteína no inhibió la actividad hemaglutinante de la proteína HN en nuestros ensayos de competencia. Esto sugiere que la proteína HN posee dos sitios funcionales con distinto reconocimiento conformacional, uno para la actividad hemaglutinante y otro para la actividad neuraminidasa. Esta duplicidad de sitios funcionales ha sido propuesta, utilizando anticuerpos monoclonales, para otros paramixovirus, entre ellos el virus Sendai [Portner et al 1987] y el NDV [Iorio y Bratt 1984]. Asimismo, esta duplicidad funcional ha dado origen a trabajos en los cuales se compara la proteína HN de los paramixovirus con la neuraminidasa [Colman et al. 1993] o con la hemaglutinina [Blumberg

et al. 1985] de los virus influenza. Las secuencias de aminoácidos reportadas como sitios funcionales en los trabajos anteriores son muy conservadas evolutivamente entre los diferentes paramixovirus [Morrison 1988] y fueron identificadas también en la proteína HN del virus LPM [Sundqvist et al. 1991]. El sitio con actividad neuraminidasa parece estar formado por una secuencia lineal de aminoácidos cercana a la región carboxilo terminal, mientras que el sitio con actividad hemaglutinina, está ubicado en la región amino terminal y parece ser formado por la conformación tridimensional ocasionada por el plegamiento de la cadena polipeptídica [Morrison 1988].

Al parecer la estructura mínima reconocida por el virus es el ácido siálico, ya que su eliminación de las células inhibe la hemaglutinación, sin embargo, la afinidad es mayor por moléculas sialil(α 2,3)lactosámicas, esto sugiere que la galactosa y posiblemente la N-acetilglucosamina incrementen la fuerza de unión entre el receptor y la proteína HN. Las glicoproteínas IgA y orosomucoide, con cadenas laterales de oligosacáridos sialil(α 2,3)-lactosámicos [Montreuil 1984], también inhibieron la actividad viral, respaldando la importancia de estos residuos en la interacción virus-célula. Sin embargo, no todas las estructuras que contenían ácido siálico o sialil(α 2,3)lactosa fueron inhibidores de la actividad viral. En este sentido, el sitio de unión de la proteína HN parece reconocer tanto la estructura química como la conformación tridimensional, ya que las moléculas con el ácido

siálico en posición terminal fueron inhibitoras en tanto que aquellas con el ácido siálico ubicado lateralmente [Montreuil 1984] no lo fueron. Datos similares han sido obtenidos con el virus Sendai, sin embargo, la especificidad de este virus parece estar dirigida hacia repeticiones del ácido neuramínico con enlaces $\alpha 2,8$ (poli NeuAca $2,8$ NeuAc, ácido colomínico) [Markwell 1981], en cambio, aunque el virus LPM interactúa con ácido colomínico, su especificidad es mucho mayor por residuos sialil($\alpha 2,3$)lactosa. Los resultados en células tratadas con tripsina, sugieren que el virus reconoce estructuras profundas, que son expuestas con el tratamiento, incrementándose el título de hemaglutinación y de infección. La correlación de estos resultados con los obtenidos en los ensayos de inhibición de la glicosilación con desoxinojirimicina (la cual inhibe también la glicosilación de lípidos) sugieren que estas moléculas profundas podrían ser glicolípidos (gangliósidos). La participación de los gangliósidos como receptores virales ha sido ampliamente estudiada [Holmgren et al. 1980, Suzuki et al. 1980, Markwell et al. 1981, Superti et al. 1986, Superti y Donelli 1991] No obstante, en nuestros ensayos de competencia, la mezcla de gangliósidos utilizada no inhibió la actividad viral. Esto no resta importancia a estas moléculas en la infección por el virus LPM, ya que los glicolípidos utilizados en el estudio presentan al ácido siálico ubicado lateralmente a la cadena oligosacarídica [Sonnino et al. 1983], mientras que el virus LPM parece reconocer una estructura oligosacarídica con el ácido siálico en forma longitudinal. En este mismo sentido, la

conformación y la accesibilidad de las moléculas parece ser de gran importancia ya que la mucina submaxilar bovina, una glicoproteína con un alto contenido de residuos NeuAc(α 2,3)Gal(β 1,3)GalNAc [Montreuil 1984] no fué inhibitor. Esto puede deberse al impedimento estérico provocado por la cercanía entre las moléculas del ácido siálico y la cadena peptídica, ya que las cadenas laterales de oligosacáridos de esta proteína son muy cortas [Montreuil 1984]. La incapacidad de la mucina de inhibir la actividad del virus LPM se contrapone con las funciones protectoras acreditadas a esta glicoproteína [Vázquez et al. 1992].

Los ensayos de hemaglutinación y de inhibición de la hemaglutinación nos permitieron acercarnos bastante a la definición de la naturaleza química del receptor para el virus LPM, sin embargo, se tenían que transpolar los datos obtenidos en eritrocitos a otras células, en las cuales el virus ocasionara una infección productiva. Para poder realizar esto teníamos que seleccionar células susceptibles, con las cuales se pudiera desarrollar un método cuantitativo, de fácil manejo, reproducible y adecuado a los ensayos planeados. Probamos algunas líneas celulares como PK-15, BHK-21 y MDCK con algunos métodos como la determinación del efecto citopático (lisis), hemadsorción a monocapas celulares y formación de placas líticas en agar. Sin embargo, la formación de sincicios en células de riñón de mono verde africano, Vero, resultó la mejor opción para realizar los ensayos planeados.

Hasta este momento de nuestro diseño experimental, los resultados indicaban que el ácido neuramínico y en especial sialil(α 2,3)-lactosa tenían una interacción tan fuerte con el virus LPM que lograban inhibir las actividades virales. Sin embargo, el siguiente paso era definir si la inhibición de la actividad viral con moléculas sialiladas se debía a una competencia real contra componentes semejantes expresados en las células susceptibles o era consecuencia exclusiva de un impedimento estérico en la interacción del virus con su receptor celular, es decir, cualquier otra molécula.

Nuevamente los datos aportados por el tratamiento enzimático sugerían que el ácido neuramínico era importante para la infección, sin embargo, esto podía interpretarse en dos sentidos. Primero, podía significar que el receptor celular estaba formado por ácido neuramínico. Segundo, la importancia del ácido neuramínico sólo residía en mantener una conformación adecuada del sitio receptor, como ha sido demostrado para otros virus [Tavakkol y Burness 1990]. Los ensayos de inhibición de la formación de sincicios con sialil(α 2,3)lactosa indicaban que el primer punto era el correcto, ya que nuevamente la actividad del virus LPM fué inhibida con estructuras sialiladas. La información existente sobre el receptor del virus Sendai, respaldaba nuestra hipótesis de que sialil(α 2,3)-lactosa era el receptor celular del virus LPM [Holmgren et al. 1980, Suzuki et al 1980, Markwell et al 1981, Markwell et al. 1984, Markwell et al. 1985]. Pero hasta el momento, los resultados

obtenidos sólo confirmaban una gran especificidad de reconocimiento entre el paramixovirus porcino LPM y moléculas sializadas. Sin embargo, no determinaban si estas moléculas era componentes reales de las superficies celulares. Para determinar la presencia de sialil(α 2,3)lactosa y otros azúcares, las células Vero fueron tratadas con antibióticos inhibidores de la glicosilación y después fueron infectadas con el virus LPM; mientras que en experimentos paralelos se determinó la expresión de azúcares en las células tratadas mediante ensayos de fluorescencia con lectinas. El tratamiento de células Vero con tunicamicina inhibió completamente la formación de sincicios, lo que indica que al inhibir el proceso de glicosilación, la tunicamicina evitó la expresión de los azúcares necesarios para la infección. Los tiempos y dosis utilizados en nuestro estudio, con células Vero, están de acuerdo a lo reportado anteriormente para otras líneas celulares. La incubación de células BHK-21 con tunicamicina durante 4 h provoca una inhibición de la glicosilación del 80%, sin alterar la síntesis peptídica; en tanto que la incubación por más de 12 h provoca también reducción en la síntesis de proteínas [Damsky et al. 1979]. En otras células, dosis de 1 μ g/ml presentes en el cultivo menos de 24 h produce el desprendimiento y la muerte de células transformadas por virus, sin alterar a las células normales; mientras que la aplicación prolongada puede conducir a daños irreversibles en ambos tipos de células [Duksin y Bornstein 1977]. Por otro lado, el uso de tunicamicina evitó la unión de las lectinas utilizadas en este estudio, lo que comprueba que la

glicosilación se inhibió completamente. Esto también concuerda con la falta de aglutinación celular con la lectina Con A obtenida después de tratamiento de células 3T3 con tunicamicina [Duksin y Bornstein 1977]. Otros inhibidores de la glicosilación se han utilizado para estudiar la función de las proteínas virales en el proceso de infección y difusión, sin embargo, son escasos los estudios en los que se intenta inhibir el receptor para un virus dado, como el trabajo con el virus HIV-1 y su receptor CD4, en el cual a pesar de que CD4 es una glicoproteína, el uso de castanoespermina (inhibidora de la glucosidasa I) no alteró el reconocimiento por la proteína gp120 del virus [Walker et al. 1987]. En nuestro estudio, el uso de desoxinójirimicina (inhibidora de las glucosidasas I y II) si logró afectar la expresión del receptor para el virus LPM y el reconocimiento por las lectinas. En nuestro estudio desoximanojirimicina no inhibió la infección, aunque provocó cambios en la expresión de azúcares.

Estos resultados controversiales pueden ser explicados por la existencia de un receptor secundario que puede estar actuando sobre la proteína de fusión del virus LPM, como ha sido postulado para el virus Sendai [Markwell et al. 1985].

En este sentido, la capacidad de los azúcares, reconocidos por la proteína HN, de inhibir la formación de sincicios que se supone es realizada por la proteína de fusión, se explica por los datos de varios trabajos donde se plantea el papel cooperador de la proteína HN en la producción de la fusión celular [Huang et al. 1980, Wild et al. 1991, Xialoei et al. 1992, Moscona y Peluso 1991 y 1992].

El tratamiento de las células Vero con enzimas y su posterior reacción con lectinas mostró una buena correlación entre la expresión de NeuAc(α 2,3)GAl y el título de infección en células tratadas y no tratadas con las enzimas. Así, la reducción de la expresión de NeuAc(α 2,3)GAl al usar neuraminidasa se correlacionó con la reducción de la infección. El tratamiento con tripsina incremento la infección y el reconocimiento por la lectina MAA (NeuAc(α 2,3)GAl). Esto nos lleva a proponer que hay dos niveles de receptores para el virus, uno externo formado posiblemente por las glicoproteínas extracelulares y otro profundo formado por los glicolípidos de membrana, como ha sido propuesto para otros virus [Markwell et al. 1981, Markwell et al. 1984,

Después de obtener indicios de la presencia en las superficies celulares de moléculas sialil(α 2,3)lactosa, faltaba aclarar el punto más importante: ¿Son las moléculas de sialil(α 2,3)lactosa estructuras celulares expresadas en tejidos de animales susceptibles a la infección por el virus LPM?. Si esto es cierto, ¿las moléculas de sialil(α 2,3)lactosa se expresan abundantemente en los sitios de exposición al virus, como para justificar su tropismo viral?.

Para dar respuesta a estas interrogantes se realizaron ensayos de fluorescencia directa con lectinas sobre cortes de tejidos de cerdos neonatos, los más susceptibles al virus LPM. Estos ensayos mostraron unos patrones de expresión de azúcares muy bien definidos. lo más importante de esto fué que la unión de la lectina

MAA, específica para NeuAc(α 2,3Gal), se manifestó principalmente en sistema respiratorio y nervioso. Esto explica las manifestaciones neurológicas y respiratorias de la infección [Stephano et al. 1983]. La falta de manifestaciones digestivas en la infección por virus LPM puede ser explicada por la ausencia de receptores sialil(α 2,3)lactosaminicos, a decir por la falta de reacción de la lectina MAA con estos tejidos.

Nuestros resultados están en acuerdo con la posibilidad de que el virus LPM reconozca estructuras que contienen altas concentraciones de sialil(α 2,3)lactosa, como los gangliósidos cerebrales [Sonnino et al. 1983, Schauer 1982] y aquellos observados en el epitelio ciliado bronquial [Loveless y Feizi 1989]. Se ha propuesto que las moléculas de carbohidratos sufren modificaciones en su expresión de acuerdo a la edad de los animales [Feizi 1985]. en este sentido se demostró que hay una expresión mayor de NeuAc(α 2,3)Gal en el cerebro de ratas en la etapa fetal y neonatal que en su etapa adulta [Finne 1982]. Más aún, el alto nivel de expresión de gangliósidos [Wiegandt 1985] así como de ácido colomínico (NeuAc(α 2,8)NeuAc) presente en las moléculas de adhesión de células neurales [Roth et al. 1983] puede fundamentar la mayor susceptibilidad a la infección por el virus LPM en cerdos jóvenes [Stephano 1981, Stephano 1983]. No se conoce cual es exactamente el patrón de expresión de los oligosacáridos sialilados en el cerdo, y tampoco si existen cambios relacionados al desarrollo, lo que deja la línea de investigación abierta para futuros trabajos.

CONCLUSIONES.

1. El paramixovirus porcino LPM reconoce estructuras celulares que contienen ácido siálico, ya que el tratamiento con neuraminidasa inhibió la hemaglutinación y la formación de sincicios.
2. El paramixovirus porcino LPM muestra gran especificidad por anómeros α del ácido siálico, en especial por sialil(α 2,3)lactosa.
3. La actividad hemaglutinante del paramixovirus LPM es realizada por una proteína de 65 KDa, que corresponde a la proteína HN reportada por Sundqvist et al. en 1990 y 1991.
4. La actividad hemaglutinante de la proteína HN es bloqueada por moléculas de ácido siálico y en especial por sialil(α 2,3)lactosa.
5. La interacción de la hemaglutinina viral con su receptor celular es independiente de la fuerza iónica, ya que los polisacáridos sulfatados no inhibieron la actividad viral.
6. La hemaglutinina viral mostró no depender fuertemente de cationes divalentes, ya que la presencia de cationes no alteró su actividad hemaglutinante.
7. La actividad de neuraminidasa del virus parece ser realizada por la hemaglutinina viral.
8. La actividad hemolítica del virus no es producida directamente por la proteína HN.
9. La proteína HN es termolábil, ya que la incubación a temperaturas de 56°C o mayores la inactivan.

10. La actividad formadora de sincicios del paramixovirus porcino LPM es bloqueada por moléculas de ácido siálico y en mayor grado por sialil(α 2,3)lactosa.

11. Las células Vero expresan constitutivamente moléculas sialil(α 2,3)lactosa, lo que las hace susceptibles a la infección por el paramixovirus porcino LPM. Estas moléculas se presentan en dos niveles uno muy superficial (glicoproteínas) y otro profundo (glicolípidos), a juzgar por los ensayos de tratamiento enzimático y de reconocimiento con lectinas.

12. La expresión de azúcares en la superficie de células Vero puede ser inhibida utilizando antibióticos inhibidores de la glicosilación, lo que a su vez disminuye la susceptibilidad a la infección por el paramixovirus porcino LPM.

13. Existe una relación directa entre la expresión de moléculas sialil(α 2,3)lactosa y la susceptibilidad a la infección celular.

14. Los tejidos nervioso y respiratorio de cerdos neonatos expresan moléculas sialil(α 2,3)lactosa. La expresión de estas moléculas es mayor en el tálamo, corteza cerebral y bronquios.

15. La alta expresión de moléculas sialil(α 2,3)lactosa en los tejidos de cerdos neonatos puede ser responsable de la susceptibilidad mostrada por estos animales a la infección por el paramixovirus porcino LPM.

PERSPECTIVAS DE INVESTIGACION.

Los posibles etapas que continuarían en esta línea de investigación serían:

A. Estudiar a fondo las características físico-químicas de la proteína HN a fin de determinar claramente como realiza su función de reconocimiento del receptor celular.

B. Continuar la caracterización del receptor celular, y de ser posible separarlo de la membrana para purificarlo y analizar así sus características. Esto permitirá un mayor conocimiento de su función celular y de las ventajas que obtiene el virus al utilizarlo como blanco durante la infección.

C. Estudiar la presencia de moléculas sialil(α 2,3)lactosa en el resto de los tejidos de cerdos neonatos y en cerdos de mayor edad, para establecer los cambios en su expresión relacionados con el desarrollo de los animales.

D. Ampliar los ensayos de inhibición de la glicosilación al estudio de las glicoproteínas del paramixovirus porcino LPM, con el fin de determinar el papel sus oligosacáridos en la infección y en el ciclo replicativo del virus.

E. Por último, se pretende analizar la existencia de factores reguladores de replicación viral en diferentes modelos in vivo e in vitro, con el fin de contestar a la pregunta: ¿por qué cada paramixovirus tiene un rango de hospedero tan restringido, siendo que la mayoría de ellos utilizan un receptor común?

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

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 Paramyxoviruses. *J Gen Virol* 72: 1045-1050.

Berg M, Hjertner B, Moreno-López J and 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: 1195-1200.

Blumberg B, Giorgi C, Roux L, Raju K, Dowling P, Cholet A and Kolakofsky D (1985) Sequence determination of the Sendai virus HN gene and its comparison to influenza glycoproteins. *Cell* 41: 269-278.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt Biochem* 72: 248-259.

Campos HRF y Carbajal SM (1991) Transtornos reproductivos en los sementales de una granja porcina de ciclo completo ante un brote de ojo azul. XXVI Reunión Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, Manzanillo, Colima, México, p. 62-64.

Carreón R, Fuentes M, Stephano HA y Ramírez MH (1989) Estudios preliminares del paramixovirus del ojo azul en la República Mexicana. En: Doperto JM y Pérez PF (Eds.) Memorias Curso de Actualización en Enfermedades del Cerdo. Ed. UNAM-AMVEC. Mexico, p. 78-82.

Cavanagh D and Horzinek MC (1993) Genus *Torovirus* assigned to the *Coronaviridae*. *Arch Virol* 128: 395-396.

Co MS, Fields BN and Greene MI (1986) Viral Receptors Serving Host Functions. In: Notkins AL and Oldstone NBA (Eds.) *Concepts in Viral Pathogenesis II*. Springer-Verlag, New York, p. 117-125.

Colman PM, Hoynes PA and Lawrence MC (1993) Sequence and structure alignment of paramyxovirus Hemagglutinin-Neuraminidase with influenza virus Neuraminidase. *J Virol* 67: 2972-2980.

Cruz GH, Martínez LA, Correa GP y Colinas TA (1988) Viabilidad del paramixovirus porcino de La Piedad Michoacán (PP LPM) a diferentes temperaturas. XXIII Reunión Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, Leon, Gto., México, p. 84-86.

Christianson WT (1991) Mystery disease agent identified. *Pig International* 12: 33-34

Eppstein DA, Marsh YV, Schreiber AB, Newman SR, Todaro GJ and Nestor JJ (1985) Epidermal growth factor receptor occupancy inhibits vaccinia virus infection. *Nature* 312: 763-768.

Feizi T (1985) Demonstration by monoclonal antibodies that carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids are onco-developmental antigens. *Nature* 314: 53-57.

Wiegandt, H. (1985) Glycolipids. *New Comp. Biochem.* 10:1-314.

Fenner F and White DO (1984) *Virología Médica*. 1a reimpression en español de la 2a ed. (1981) en inglés. La Prensa Médica Mexicana, México, D.F., p. 40.

Fingeroth JD, Weis JJ, Tedder TF, Strominger JL, Biro PA and Fearon DT (1984) Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the CD3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 4510-4514.

Finne J (1982) *J Biol Chem* 257: 11966-11970.

Fuentes M, Carreón R, Stephano A and Trujillo M (1990) Frequency of Blue Eye Paramyxovirus in México Pigs. *Proceedings 11th Congress, International Pig Veterinary Society, Lausanne, Suiza 1990.*

Gottschalk, B.A. (1972) In *The Glycoproteins*, pp. 810-829. Edited by B. A. Gottschalk. Amsterdam: Elsevier.

Hernández-Jáuregui P, Sundqvist A, Fuentes M, Díaz-Orea A y Moreno-López J (1990) Evaluación de una vacuna experimental para el paramixovirus del síndrome del ojo azul. XXV Reunión Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, Puerto Vallarta, Jal., México, p. 57-60.

Hernández-Jáuregui P, Sundqvist A, Fuentes M, Díaz-Orea A, Reyes-Leyva J, Moreno-López J y Hernández-Baumgarten E (1992) Correlación entre las pruebas de virus neutralización, inhibición de la hemaglutinación y ELISA en sueros vacunales y de brote para anticuerpos contra el Paramixovirus del síndrome del ojo azul en cerdos. *Vet Méx* 23: 217-222.

Hernández LR y Hernández RM (1990) Inmunidad humoral inducida por una vacuna inactivada contra el paramixovirus del ojo azul del cerdo: Prueba de Campo. Tesis de Licenciatura Medicina Veterinaria y Zootecnia, ESMVZAC, Puebla.

Herrler G, Rott R, Klenk H-D, Muller H-P, Shukla AK and Schauer R (1985) The receptor destroying enzyme of influenza C virus is neuraminidase-O-acetyltransferase. *EMBO J* 4: 1503-1506.

Holmgren J, Svennerholm L, Elwing H, Fredman P and Strannegård O (1980) Sendai virus receptor: proposed recognition structure based on binding to plastic-adsorbed gangliosides. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 1947-1950.

Huang RTC, Rott R, Wahn K, Klenk H-D and Kohama T (1980) The function of the Neuraminidase in Membrane Fusion Induced by Myxoviruses. *Virology* 107: 313-319.

Hudson L and Hay F (1989) *Practical Immunology*. 3rd. ed. Blackwell Scientific Publications, Boston, p. 34-40.

Iorio R and Bratt M (1984) Monoclonal antibodies as functional probes of the HN glycoprotein of Newcastle disease virus: antigenic separation of the hemagglutinating and neuraminidase sites. *J Immunol* 133: 2215-2219.

Klenk H-D (1990) Influence of glycosylation on antigenicity of viral proteins. In: van Regenmortel MHV and Neurath AR (Eds.) *Immunochemistry of Viruses*, 11. The basis for serodiagnosis and vaccines. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1990, p. 25-37.

Kingsbury DW (1990) Paramyxoviridae and their replication. In: Fields BN, Knipe DM et al. (Eds.) *Virology*, 2nd ed., Raven Press, New York, p. 945-961.

Kornfeld R and Kornfeld S (1985) Assembly of Asparagine-Linked Oligosaccharides. *Ann Rev Biochem* 54: 631-661.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Laitinen L (1987) Griffonia simplicifolia lectins bind specifically to endothelial cells and some epithelial cells in mouse tissues. *Histochem J* 19: 225-234.

Lentz TL, Burrage TH, Smith AL, Crick J and Tignor GH (1982) Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor? *Science* 215: 182-184.

Licke E, Johansson M, Svennerholm B and Lindahl U (1991) Binding of herpes simple virus to cellular heparan sulphate, an initial step in the adsorption process. *J Gen Virol* 72: 1131-1137.

Linné T, Berg M, Bergvall A-Ch, Hjertner and Moreno-López J (1992) The molecular biology of the porcine paramyxovirus LPMV. *Adv Vet Virol* in press.

Lis H and Sharon N (1986) Lectins as Molecules and as tools. *Ann Rev Biochem* 55: 35-67.

Loveless RW and Feizi T (1989) Sialo-Oligosaccharides of Poly-N-Acetyllactosamine Series are Polarized at the Cilia and Apical-Microvilliar Domains of the Ciliated Cells in Human Bronchial Epithelium. *Infect Immun* 57: 1235-1239.

Markwell MAK, Svennerholm L and Paulson JC (1981) Specific gangliosides function as host cell receptors for Sendai virus. Proc Natl Acad Sci USA 78: 5406-5410.

Markwell MAK, Fredman P and Svennerholm L (1984) Receptor ganglioside content of three host for Sendai virus MDBK, HeLa, and MDCK cells. Biochim Biophys Acta 775: 7-16.

Markwell MAK, Portner A and Schwartz AL (1985) An Alternative Route of Infection for Viruses: Entry by means of the Asialoglycoprotein Receptor of the Sendai Virus Mutant Lacking its Attachment Protein. Proc Natl Acad Sci USA 82: 978-982.

Martínez LA, Correa-Giron P, Fajardo MR y Garibay M (1985) Aislamiento y estudio de un virus porcino parecido a los Paramixovirus. En: Morilla A, Correa P y Stephano A (Eds.) Avances en las Enfermedades del Cerdo. Ed. AMVEC-UNAM, México, D.F., p. 313-319.

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 and Ericsson A (1986) Characterization of a paramyxovirus isolated from the brain of a piglet in Mexico. Arch Virol 91: 221-231.

Morrison TG (1988) Structure, function and intracellular processing of Paramyxovirus membrane proteins. Virus Res 10: 113-136.

Moscona A and Peluso R (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.

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.

Nag S (1985) Ultrastructural localization of lectin receptors on cerebral endothelium. Acta Neuropathol 66: 105-110.

Osawa T and Matsumoto I (1972) Corse (*Ulex europaeus*) phytohemagglutinin. Methods Enzymol 28: 323-327.

Pastan IH and Willingham MC (1981) Journey to the center of the cell, role of the receptosome. Science 214: 504-509.

Pérez PF, Stephano HA y Gay GM (1988) Estudio histológico en lechones inoculados experimentalmente con el paramixovirus de ojo azul. XXIII Reunión Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, León, Gto., México, p. 81-83.

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

Portner A, Scroggs R and Metzgen D (1987) Distinct functions of antigenic sites of the HN glycoprotein of Sendai virus. Virology 158: 61-68.

Ray R and Compans RW Paramixovirus. In: van Regenmortel MHV and Neurath AR (Eds.) Immunochemistry of Viruses, II. The Basis for Serodiagnosis and Vaccines. Elsevier Science Publishers B.V., p. 217-236.

Ravindranath RMH and Graves MC (1990) Attenuated murine citomegalovirus binds to N-Acetylglucosamine, and shift to virulence may involve recognition of sialic acids. J Virol 64: 5430-5440.

Reyes-Leyva JR (1988) Evaluación de la respuesta humoral inducida por 2 vacunas experimentales contra el paramixovirus porcino LPM. Tesis de Licenciatura, Medicina Veterinaria y Zootecnia, ESMVZAC, Puebla.

Rockborn G, Klingeborn B and Junti N (1990) Diagnostic Virology, 2nd part: Guidebook to procedures. Moreno-López J (Ed.), SUAS-SIDA. Uppsala, p. 3-18.

Roizman B (1990) Multiplication of viruses, an overview. In: Fields BN, Knipe DM et al. (Eds.) Virology, 2nd ed., Raven Press, New York, p. 87-94.

Rosales EF, Martínez LA y Correa GP (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 del ojo azul". Tec Pec Méx 26: 304-311.

Roth J, Zuber C, Wagner P, Taatjes DJ, Weisgerber C, Heitz PU, Goridis C and Bitter-Suermann D (1988) Reexpression of poly(sialic acid) units of the neural cell adhesion molecule in Willms tumor. Proc Natl Acad Sci USA 85: 2999-3003.

Rueckert RR (1990) Picornaviridae and their replication. In: Fields BN, Knipe DM et al. (Eds.) Virology, 2nd ed., Raven Press, New York, p. 507-542.

Sharon N and Lis H (1989) Lectins as Cell Recognition Molecules. Science 246: 227-234.

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

Shimizu H, Tsuchie H, Honma H, Yoshida K, Tsuruoka T, Ushijima H and Kitamura T (1990) Effect of N-(3-Phenyl-2-Propenyl)-1-Deoxinojirimycin on the Lectin binding to HIV-1 Glycoproteins. *Jpn J Med Sci Biol* 43: 75-87.

Smith TF (1974) Virology. In: Washington JA (Ed.) *Laboratory Procedures in Clinical Microbiology*. Little, Brown & Co. 1st ed., New York, p. 217-277.

Sonnino S, Ghidoni R, Chigomo V, Masserini M and Tettamanti G (1983) Recognition by two-dimensional thin-layer chromatography and densitometric quantification of alcali-labile gangliosides from the brain of different animals *Analyt Biochem* 128: 104-114.

Stallcup KC and Fields BN (1981) The Replication of Measles Virus in the Presence of Tunicamycin. *Virology* 108: 391-404.

Stephano HA, Gay GM, Ramírez TC y Maqueda AJJ (1981) Estudio de un brote de encefalitis en lechones por un virus hemaglutinante. *Memorias XVII Reunión, Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, Ixtapa-Zihuatanejo, México*, p. 97.

Stephano HA y Gay GM (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 GM (1985) Síndrome del Ojo Azul. En: Morilla A, Correa P y Stephano A (Eds.) *Avances en las Enfermedades del Cerdo*. Ed. AMVEC, México, D.F., p. 299-311.

Stephano HA, Gay M and Ramirez TC (1988) Encephalomyelitis, Reproductive Failure and Corneal Opacity (Blue Eye) in Pigs, Associated with a Paramyxovirus Infection. *Vet Rec* 122: 6-10.

Stephano HA, Fuentes RM, Hernández-Jauregui P, Herradora LM y Carreón R (1988b) Encefalitis y opacidad de la córnea en cerdos destetados, inoculados experimentalmente con Paramyxovirus del Ojo Azul. *XXIII Reunión, Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, León, Gto., México*, p. 90-92.

Stephano A, 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 Pig Veterinary Society, Lausanne, Suiza* p. 99.

Sundqvist 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 (1991) The Haemagglutinin-Neuraminidase glycoprotein of the porcine paramyxovirus LPMV: comparison with other paramyxoviruses revealed the closest relationship to simian virus 5 and mumps virus. *Arch Virol* 122: 331-340.

Superti F y Donelli G (1991) Gangliosides as binding sites in SA-11 rotavirus infection of LLC-MK2 cells. *J Gen Virol* 72: 2467-2474.

Superti F, Hauttecouer B, Morelec M-J, Goldoni P, Bizzini B and Tsiang H (1986) Involvement of gangliosides in rabies virus infection. *J Gen Virol* 67: 47-56.

Suzuki Y, Morioka T and Matsumoto M (1980) Action of Ortho- and Paramyxovirus Neuraminidase on Gangliosides: Hydrolysis of Ganglioside Gml by Sendai Virus Neuraminidase. *Biochim Biophys Acta* 619: 632-639.

Tardieu M, Epstein RL and Weiner HL (1982) Interaction of viruses with cell surface receptors. *Int Rev Cytol* 80: 27-61.

Tavakkol A and Burness ATH (1990) Evidence for a direct role for sialic acid in the attachment of encephalomyocarditis virus to human erythrocytes. *Biochemistry* 29: 10684-10690.

Vázquez L, Jaramillo L, Reyes-Leyva J, Montaña LF y Zenteno E (1992) Análisis estructural de las mucinas y su relevancia como receptor de agentes infecciosos. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 5: 134-140.

Vlasak R, Luytjes W, Spaan W, and Palese P (1988) The human and bovine coronavirus recognize sialic acid containing receptors similar to those of influenza C viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 4526-4529.

Weis W, Brown JH, Cusack S, Paulson JC, Skehel JJ and Wiley DC (1988) Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature* 333: 426-431.

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.

WuDunn D and Spear PG (1989) Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulphate. *J Virol* 63: 52-58.

Xiaolei H, Ray R and Compans R (1992) Functional interactions between the fusion protein and hemagglutinin-neuraminidase of human parainfluenza viruses. *J Virol* 66: 1528-1534.

Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P and Ornitz DM (1991) Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* 64: 841-848.